



2020
número
28
2ª série

Observações

— Boletim Epidemiológico

sumário_

Editorial

Alimentação, um determinante de saúde p03
Food, a health determinant
Isabel Castanheira

Artigos breves

Biomonitorização humana e biomarcadores

1_ Avaliação da exposição das mulheres portuguesas em idade fértil a mercúrio: a perspetiva da biomonitorização humana p05
Exposure assessment of Portuguese women of childbearing age to mercury: a human biomonitoring perspective

Susana Santiago, Sónia Namorado, Carlos Matias Dias, Carla Martins, Mariana Santos, Isabel Castanheira, Cristina Carvalho, Ricardo Assunção

2_ Biomarcador de alcoolismo crónico – transferrina deficiente em carboidratos (CDT): parâmetro bioquímico de diagnóstico e monitorização para utilização no sistema de saúde p10
Chronic alcoholism biomarker – carbohydrate-deficient transferrin (CDT): a biochemical parameter for the diagnosis and monitoring the patients for use in the health system

Filomena Gomes, Paulo Boto, Pedro Aguiar, Miguel Vasconcelos, Ana Vieira da Silva

Avaliação da qualidade laboratorial

3_ Avaliação da fase pré-analítica na área da morfologia parasitária, PNAEQ 2019 p15
Evaluation of the pre-analytical phase in parasitic morphology area, PNAEQ 2019

Lúcia de Jesus, Cláudia Júlio, Ana Cardoso, Catarina Ventura, Sílvia Viegas, Teresa Baptista Fernandes, Quirina Santos Costa, Guilhermina Moutinho, Ana Faria

Saúde ambiental

4_ O paradigma da contaminação fecal de águas balneares, nem sempre o humano é culpado p19
The paradigm of bathing water faecal contamination, humans are not always to blame

Maria Leonor Santos, João Brandão, Elisabete Valério

5_ Análise de contaminantes inorgânicos em alimentos provenientes de áreas ardidas na região Centro de Portugal p24
Analysis of inorganic contaminants in food from burnt areas in Central Portugal

Sandra Gueifão, Catarina Sequeira, Mariana Ribeiro, Tiago Moreira, Marta Ventura, Inês Delgado, Andreia Rego, Inês Coelho, José Armando L. da Silva, Isabel Castanheira

Alimentação e nutrição

6_ Teor de sal em sopas prontas para consumo disponíveis em Portugal: comparação entre 2018 e 2019 p30
Salt content in ready to eat soups available in Portugal: comparison between 2018 and 2019

Paulo Fernandes, Andreia Lopes, Roberto Brazão, M. Graça Dias

7_ Monitorização da energia e dos teores de açúcar e sal na categoria de alimentos batatas fritas e snacks: a realidade portuguesa em 2019 p34
Monitoring energy, sugar and salt content in the food category chips and snacks: Portuguese reality in 2019

Andreia Lopes, Paulo Fernandes, Roberto Brazão, M. Graça Dias

8_ Conhecimento e atitude face à redução gradual da quantidade de sal no pão: inquérito realizado numa amostra de pais/tutores de crianças e jovens em idade escolar, 2019 p39
Knowledge and attitude towards gradual salt reduction in bread in an enrolled school children' parents survey, 2019

Alexandra Costa, Roberto Brazão, Mariana Santos, Paula Braz, Joana Santos, Joana Alves, Teresa Caldas de Almeida, Luciana Costa

Doenças hereditárias do metabolismo

9_ Hemocromatose hereditária associada ao gene HFE: resultados do diagnóstico molecular, correlação genótipo-fenótipo e importância da qualidade laboratorial p45
Hereditary hemochromatosis associated with the HFE gene: results of the molecular diagnosis, genotype-phenotype correlations, and importance of laboratory quality

Pedro Fonseca, Pedro Loureiro, Susana Gomes, Paula Faustino, João Gonçalves





10_ Fenilcetonúria em Portugal: 40 anos de rastreio neonatal p 50
(1979-2019)

Phenylketonuria in Portugal: 40 years of neonatal screening
(1979-2019)

Filipa Ferreira, Luísa Azevedo, Carmen Sousa, Raquel Neiva, Helena Fonseca, Ana Marcão, Hugo Rocha, Célia Carmona, Sónia Ramos, Anabela Bandeira, Esmeralda Martins, Teresa Campos, Esmeralda Rodrigues, Paula Garcia, Luísa Diogo, Ana Cristina Ferreira, Sílvia Sequeira, Francisco Silva, Luísa Rodrigues, Ana Gaspar, Patrícia Janeiro, António Amorim, Laura Vilarinho

Saúde mental

11_ Bem-estar subjetivo da população portuguesa em 2018: p 58
um estudo sobre o florescimento psicológico

Subjective well-being of the Portuguese population in 2018: a study about Psychological Flourishing

Ana João Santos, Ana Rita Torres, Ausenda Machado, Mariana Neto



Alimentação, um determinante de saúde

Food, a health determinant

O botânico Jonh Parkinson descrevia em 1629, no *Paradisi in Sole Paradisus Terrestris*, o sumo de maçã “como um bom tratamento de doenças como a melancolia, estimulando a alegria e expulsando a tristeza”. Sabe-se hoje, séculos depois, que os componentes bioativos das maçãs são responsáveis por este bem-estar e acalmia. Porém, foram necessários também vários séculos até que a alimentação ganhasse o estatuto de determinante para a saúde das populações.

Hoje, na presidência de Ursula von der Leyen, a saúde e a alimentação estão reunidas numa única pasta dirigida pela cipriota Stella Kyriakides. O plano da Saúde Europeia, apresentado pela Senhora Ministra da Saúde Doutora Marta Temido, no âmbito da Presidência Portuguesa do Conselho da União Europeia, define, entre outras matérias, a promoção de hábitos alimentares saudáveis e a redução da ingestão de substâncias nocivas como elementos-chave desta estratégia. Este plano de trabalhos mais abrangente do que os tempos da pandemia que vivemos reflete o que hoje, infelizmente, a evidência científica demonstra: uma correlação positiva entre a obesidade e a infeção por SARS-COV-2. Estes dados de infeção combinada com a obesidade, são transversais a todos os grupos etários e reforçam a necessidade, em cada país, de uma intervenção nutricional como vetor prioritário para o aumento da esperança de vida.

Enquadrado nas linhas estratégicas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), o Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN) assenta os seus objetivos em tarefas que se irão desenvolver no primeiro semestre de 2021 associadas a um conjunto de projetos de investigação, de monitorização, e de observação que consubstanciam estudos de intervenção e de caracterização alimentar. Assim, tem vindo a decorrer, no INSA, em colaborações interdepartamentais um conjunto de estudos relativos à exposição humana a mercúrio. A contribuição de cada um

dos departamentos permite integrar vários níveis de intervenção conducentes à mitigação do mercúrio nos meios de exposição. O seu objetivo é a proteção da saúde humana e do meio ambiente das emissões antrópicas de mercúrio e compostos de mercúrio. As estratégias implantadas no nosso Instituto foram desenhadas para identificar as populações cuja exposição a mercúrio é mais elevada, bem como os seus agentes causais. Estes projetos estão, também, avançados na Convenção de Minamata, o protocolo assinado por Portugal conjuntamente com 127 países, e integrado no Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (UNEP). Mas, enquanto unidade orgânica do INSA, o DAN que tem como principal missão a abordagem da alimentação como determinante de saúde, tem como dever avaliar o impacto de outras catástrofes na saúde dos consumidores. Portugal foi avassalado em 2017 por fogos florestais. Importa, por isso, monitorizar o impacto da acumulação ao longo do tempo de substâncias nocivas nos alimentos cultivados nestas regiões e consumidos frequentemente pelas populações locais e produtoras desses alimentos. Este projeto que o INSA coordena em cooperação com a Administração Regional de Saúde do Centro, engloba três vetores: o perfil de contaminantes, a frequência de consumo destes alimentos e a biomonitorização das populações. Neste número, publicamos parte do estudo de caracterização desta exposição, reservando para números posteriores os resultados da frequência alimentar e da respetiva biomonitorização, realizados por dois dos departamentos do INSA, designadamente o Departamento de Alimentação e Nutrição e o Departamento de Epidemiologia.

A reformulação dos produtos alimentares visando a redução da ingestão de componentes nocivos como o sal, o açúcar e as gorduras trans, continua a ser uma das grandes prioridades da Organização Mundial da Saúde (OMS). Em Portugal, a indústria alimentar, o sistema científico, e as entidades governamentais têm vindo, através da EIPAS – a Estratégia Integrada para a Promoção da Alimentação Saudável – a envidar esforços para a redução destes componentes nos alimentos disponíveis para consumo. A reformulação é uma



matéria complexa, e exige também uma vigilância constante como forma de validação efetiva perante terceiros. A contribuição do INSA nesta abordagem tem vindo a ser faseada e sempre articulada com os restantes atores. Neste número do *Boletim Epidemiológico Observações* (BEO) reportamos alguns dos aspetos desta caminhada bem-sucedida.

Em súpula, esta edição do BEO divulga, nestes tempos de pandemia e de confinamento, outros tópicos onde temos estado envolvidos ativamente e que ultrapassam os imperativos da turbulência dos tempos, mas que continuam o legado deixado pelo nosso patrono e fundador, o Professor Ricardo Jorge.

Isabel Castanheira

*Coordenadora do Departamento de Alimentação e Nutrição
Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge*



Avaliação da exposição das mulheres portuguesas em idade fértil a mercúrio: a perspetiva da biomonitorização humana

Exposure assessment of Portuguese women of childbearing age to mercury: a human biomonitoring perspective

Susana Santiago^{1,2}, Sónia Namorado^{3,4}, Carlos Matias Dias^{3,4}, Carla Martins^{1,5}, Mariana Santos¹, Isabel Castanheira¹, Cristina Carvalho², Ricardo Assunção^{1,5}

susana.santiago@insa.min-saude.pt

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

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

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

(4) Escola Nacional de Saúde Pública, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, Portugal

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

_Resumo

Privilegiado pela sua situação geográfica, Portugal tem como tradição alimentar o consumo de peixe. Contudo, este consumo está também associado à presença de mercúrio, na forma de metilmercúrio. A elevada suscetibilidade de alguns grupos populacionais a este composto, nomeadamente as mulheres grávidas pelas consequências desta exposição para os fetos, torna imperativo conhecer o risco destes grupos populacionais. Assim, o presente estudo, através de uma abordagem de biomonitorização humana, teve como objetivo principal avaliar a exposição das mulheres portuguesas em idade fértil ao mercúrio. Foram selecionadas aleatoriamente 300 mulheres em idade fértil (25-44 anos) participantes no Inquérito Nacional de Saúde com Exame Físico (INSEF), um estudo transversal de prevalência representativo a nível nacional e regional, e estimada a sua exposição a mercúrio através da determinação do teor de mercúrio total (THg) em amostras de sangue total por espectrofotometria de absorção atómica com decomposição térmica e amalgamação. Os resultados obtidos revelaram a presença de mercúrio em 298 amostras, com valores entre 0,6 e 32,0µg/L, e um valor médio de 5,9 ± 4,2µg/L. Verificou-se que 48% das amostras apresentaram valores de concentração de mercúrio superiores a 5,0µg/L e cerca de 13% apresentaram valores superiores a 10,0µg/L, representando, por isso, um risco de danos para a saúde. Com base nos resultados obtidos, é recomendável reduzir a exposição das mulheres portuguesas em idade fértil ao mercúrio, nomeadamente, se este corresponder a um período em que se planeie gravidez, por forma a prevenir potenciais consequências para a saúde. Estratégias de informação e comunicação do risco deverão ser desenvolvidas, testadas e implementadas em Portugal, por forma a contribuir para escolhas mais saudáveis e evitar a exposição a mercúrio.

_Abstract

Privileged by its geographical situation, Portugal has a dietary tradition that includes a high consumption of fish. The presence of mercury in this foodstuff, in the form of methylmercury and the high susceptibility of some population groups to this compound, such as pregnant women due to the consequences of this exposure for fetuses, makes it imperative to know the risk of these population groups. Thus, the present study, using a human biomonitoring approach, aimed to evaluate the exposure

of Portuguese women of childbearing age to mercury. 300 women of childbearing age (25-44 years old) participating in the National Health Examination Survey (INSEF), a cross-sectional study of representative prevalence at national and regional level, were randomly selected, and their exposure to mercury was estimated by determining the total mercury content (THg) in whole blood by atomic absorption spectrophotometry with thermal decomposition and amalgamation. The obtained results revealed the presence of mercury in 298 samples, with values ranging between 0.6 and 32.0µg/L, and an average value of 5.9 ± 4.2µg/L. It was found that 48% of the samples had a mercury concentration value greater than 5.0µg/L and about 13% had values greater than 10.0µg/L, thus representing a risk of damage to health. Based on the results obtained, it is recommended to reduce the exposure of Portuguese women of childbearing age to mercury, especially if it corresponds to a period in which pregnancy is planned, to prevent potential health consequences. Risk information and communication strategies must be developed, tested and implemented in Portugal, in order to contribute to healthier choices and avoid exposure to mercury.

_Introdução

O consumo de peixe é uma fonte particularmente importante de compostos com efeito benéfico para a saúde, como, por exemplo, dos ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa-ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosaexaenoico (DHA) – fundamentais para o neurodesenvolvimento, particularmente no período inicial de migração neuronal (1,2), bem como de outros nutrientes essenciais, como o selénio e o iodo. Contudo, o consumo de peixe está também associado a um risco de exposição a poluentes químicos e é considerado a maior fonte de exposição humana ao metilmercúrio



na Europa (3,4), a forma mais tóxica de mercúrio para os humanos (5).

O mercúrio inorgânico chega ao ambiente marinho por fontes naturais ou antropogênicas (6), onde é transformado por microrganismos em metilmercúrio entrando assim na cadeia alimentar aquática (7,8). Através de processos de bioacumulação e biomagnificação a sua concentração aumenta (6,7), sendo maior em espécies de peixes predadoras, como o atum ou o espadarte (6). O metilmercúrio representa cerca de 90% do mercúrio total presente no peixe e no marisco (9).

Portugal apresenta o maior consumo de produtos da pesca e da aquicultura na União Europeia (UE) com 57kg/pessoa/ano, acima da média da UE (24kg/pessoa/ano) e mundial (20kg/pessoa/ano), sendo apenas superado na Europa pela Islândia (90kg/pessoa/ano) (10,11).

Uma vez ingerido, o metilmercúrio é rápido e quase completamente absorvido (95%) através do intestino humano (5,7). O principal alvo do metilmercúrio é o sistema nervoso central (7,12) e a exposição aguda a este composto resulta em sintomas como parestesia nas mãos, pés e lábios, ataxia, constrição concêntrica do campo visual, disartria e diminuição de audição (12,13), tendo sido reportados alguns casos de coma e morte em níveis mais elevados de exposição (12,14,15).

As crianças são mais suscetíveis à exposição ao metilmercúrio do que os adultos devido à imaturidade do sistema nervoso central, apresentando uma maior sensibilidade aos efeitos neurotóxicos. É reconhecido que o cérebro do feto poderá sofrer danos, mesmo que a mãe não apresente sinais de intoxicação, em consequência da exposição a metilmercúrio. A vulnerabilidade particular associada à exposição pré-natal pode ser justificada pela menor capacidade de metabolização dos compostos de mercúrio nesta fase de desenvolvimento (5). A exposição fetal e de crianças a doses elevadas está associada a um risco aumentado de morte intrauterina e na primeira infância. Essa exposição pode ocorrer no útero, como resultado da presença de mercúrio no organismo materno nas fases pré-concepcional e da capacidade que os compostos de mercúrio têm de atravessar a barreira placentária (5,15).

Reconhecendo o risco de exposição ao metilmercúrio e os benefícios para a saúde relacionados com o consumo de peixe, várias agências reguladoras estabeleceram doses toleráveis de ingestão semanal deste composto. A *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) em 2007 reviu em baixa a dose semanal tolerável de ingestão provisória (PTWI) de metilmercúrio em 1,6µg/kg de peso corporal, devido aos seus efeitos neurotóxicos no desenvolvimento das crianças (o valor anterior era 3,3µg/kg de peso corporal) (16). Em 2012, a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA, na sigla em inglês), através do Painel CONTAM (*Panel on Contaminants in the Food Chain*), propôs uma ingestão semanal tolerável (TWI) de 1,3µg/kg de peso corporal (17).

A biomonitorização humana tem sido cada vez mais utilizada para quantificar a exposição humana a compostos químicos, permitindo obter dados ao nível individual e contribuindo para a obtenção de informação importante para a saúde pública, nomeadamente para a avaliação do risco e, assim, fornecer dados para uma adequada gestão do risco (18).

_Objetivo

Este estudo teve como principal objetivo avaliar a exposição das mulheres portuguesas em idade fértil (25-44 anos) ao mercúrio, através de um estudo de biomonitorização humana, utilizando como biomarcador de exposição a concentração de mercúrio total no sangue.

_Material e métodos

As amostras utilizadas no presente estudo foram obtidas no âmbito do Inquérito Nacional de Saúde com Exame Físico (INSEF), um estudo transversal de prevalência representativo a nível nacional e regional, desenvolvido em 2015 em Portugal (19). O INSEF incluiu três componentes principais: exame físico (medição da pressão arterial e de medidas antropométricas), colheita de sangue (sangue total) e entrevista com questionário geral de saúde que incluiu recolha de informação sociodemográfica, de saúde e estilo de vida, como idade, região de saúde, nível de escolaridade, entre outros. A participação foi formalizada através de consenti-



mento escrito (informado, livre, explícito, específico e documentado) antes da recolha de dados e amostras, de acordo com os Princípios Éticos para Pesquisa Médica envolvendo seres humanos expressos na Declaração de Helsínquia e na legislação aplicável.

Para o presente estudo foram selecionados aleatoriamente 300 indivíduos entre os 976 participantes do INSEF potencialmente elegíveis (mulheres residentes em Portugal continental ou nas Regiões Autónomas dos Açores e da Madeira, entre os 25 e 44 anos). Esta seleção teve em consideração: i) os efeitos neurotóxicos que o metilmercúrio pode causar na descendência após a exposição da mulher grávida a este composto; ii) o período fértil usual para mulheres; e, iii) as faixas etárias já estabelecidas no INSEF.

O INSEF foi aprovado pela Comissão de Ética para a Saúde do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (CES-INSA) e pela Comissão Nacional de Proteção de Dados (Autorização nº 199/2011) e o presente estudo teve aprovação da CES-INSA (Autorização nº 92/2019).

O teor de mercúrio total (THg) nas amostras de sangue foi determinado por espectrofotometria de absorção atómica com decomposição térmica e amalgamação (TDA/AAS).

A interpretação dos dados de biomonitorização foi realizada por comparação entre os níveis de exposição determinados e os valores de referência para biomonitorização estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que considera que a concentração normal média de mercúrio total no sangue, em indivíduos sem consumo de peixes contaminados, é de 5 a 10µg/L (20).

Resultados e discussão

A análise das 300 amostras de sangue total das participantes revelou a presença de mercúrio em 298 amostras, com valores entre 0,6 e 32,0µg/L, conforme apresentado no gráfico 1, e um valor médio de $5,9 \pm 4,2\mu\text{g/L}$. Dois indivíduos apresentaram valores inferiores ao limite de quantificação (0,5µg/L).

Se se considerar os valores de referência da OMS (20), das 300 amostras analisadas, 52% apresentaram valores de concentração de mercúrio abaixo de 5µg/L. No entanto, 48% das

amostras apresentaram um teor de mercúrio superior a 5,0µg/L e cerca de 13% apresentaram teores superiores a 10,0µg/L, representando um risco para a saúde.

Os resultados obtidos evidenciaram concentrações de mercúrio total mais elevadas em mulheres na faixa etária 35-44 anos (gráfico 2), podendo ser justificado pela capacidade que este composto tem de se acumular no organismo humano e também pelo facto do consumo de peixe aumentar com a idade (21).

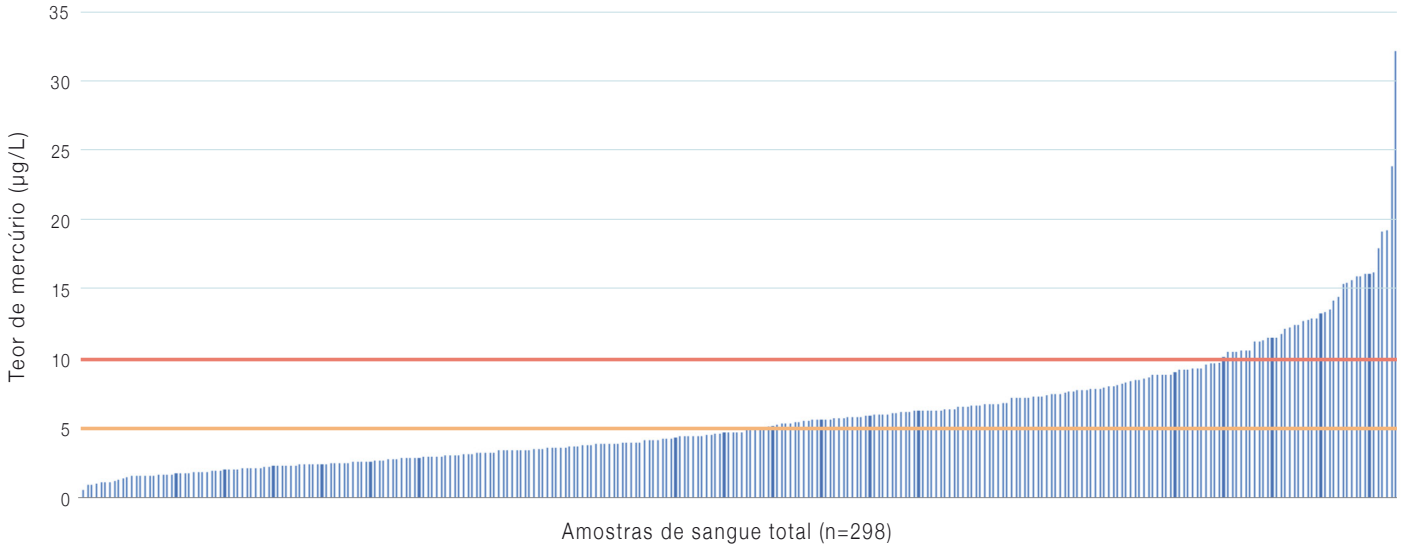
As participantes com um nível educacional mais elevado (ensino superior vs. ensino fundamental) apresentaram concentrações mais elevadas de mercúrio (gráfico 2). O peixe é entendido como um alimento benéfico para a saúde e por esse motivo o seu consumo poderá aumentar com o nível de escolaridade (21) e, como consequência, aumentar também a exposição ao mercúrio.

A exposição a mercúrio revelou concentrações mais elevadas nas participantes da Região Autónoma da Madeira (gráfico 2), onde é reconhecido que existe a tradição de consumo de peixes como o peixe-espada e o atum fresco, que são espécies predadoras e como tal apresentam níveis mais elevados de metilmercúrio. Foi também nesta região que se encontrou o valor mais elevado de concentração de mercúrio no sangue. A elevada exposição a metilmercúrio nesta região já tinha sido reportada num estudo realizado anteriormente (22).

As mulheres grávidas (3,7%, n=11) apresentaram menor concentração de mercúrio no sangue do que as não grávidas. No entanto, 27% das participantes grávidas apresentaram concentração de mercúrio superior a 5,0µg/L.



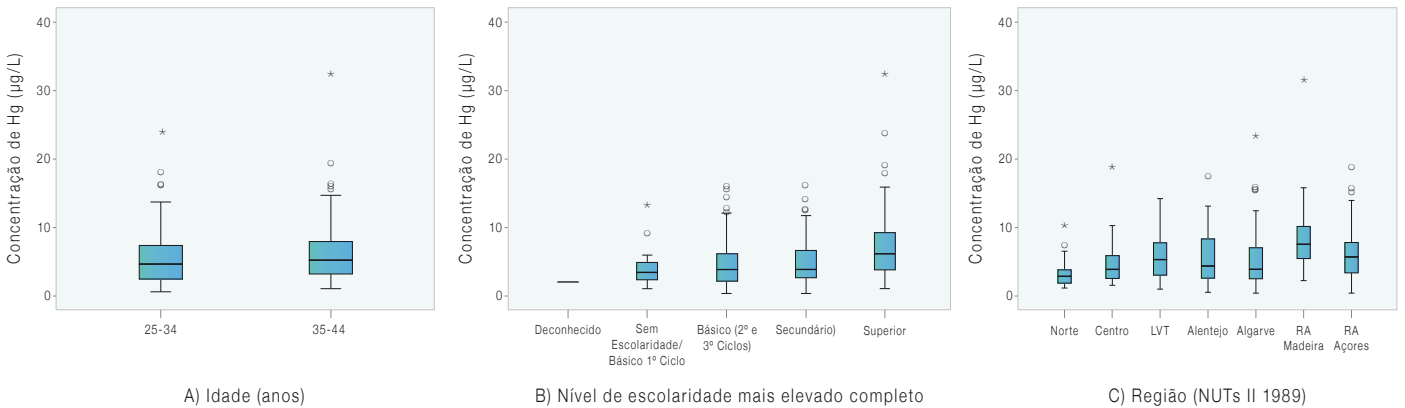
Gráfico 1: Teores de mercúrio total nas amostras de sangue das participantes do estudo.



Apenas estão representadas as amostras com valores quantificáveis de mercúrio.

As linhas laranja e vermelha representam os valores de referência (5 a 10 µg/L) estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde para a biomonitorização da concentração de mercúrio total no sangue, em indivíduos sem consumo de peixes contaminados ⁽²⁰⁾.

Gráfico 2: Distribuição da concentração de mercúrio total no sangue das participantes do estudo, por grupos etários, níveis de escolaridade e região.



Os círculos (o) representam *outliers* médios e os asteriscos (*) representam *outliers* extremos. RA: Região autónoma; LVT: Lisboa e Vale do Tejo.

Conclusões

Os resultados deste estudo mostraram a ocorrência de níveis elevados de mercúrio total no sangue de mulheres portuguesas em idade fértil, de acordo com os valores de referência para biomonitorização da OMS. Assim, considerando que o consumo de peixe é a principal via de exposição a metilmercúrio, futuras medidas de prevenção da exposição a este

composto deverão considerar os níveis de contaminação no pescado e seus produtos.

No sentido de reduzir a exposição dos grupos de risco a mercúrio (crianças, bebés, mulheres em idade fértil e grávidas), o estabelecimento de recomendações relativas ao consumo de pescado é altamente recomendável, informando quais as espécies que deverão ser evitadas por esta população



e quais as que deverão ser privilegiadas. Estratégias de informação e comunicação do risco deverão ser desenvolvidas, testadas e implementadas, em Portugal, por forma a contribuir para escolhas mais saudáveis e, por conseguinte, evitar a exposição a mercúrio e as potenciais consequências para a saúde que lhe possam estar associadas.

Financiamento:

Apoio financeiro da Fundação para a Ciência e a Tecnologia /MCTES e CESAM - Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (UIDP/50017/2020 + UIDB/50017/2020), através de fundos nacionais.

Referências bibliográficas:

- (1) Julvez J, Méndez M, Fernandez-Barres S, et al. Maternal Consumption of Seafood in Pregnancy and Child Neuropsychological Development: a Longitudinal Study Based on a Population With High Consumption Levels. *Am J Epidemiol*. 2016 Feb 1;183(3):169-82. <https://doi.org/10.1093/aje/kwv195>
- (2) EFSA Scientific Committee. Statement on the benefits of fish/seafood consumption compared to the risks of methylmercury in fish/seafood. *EFSA J*. 2015;13(1):3982. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.3982>
- (3) Višnjevec AM, Kocman D, Horvat M. Human mercury exposure and effects in Europe. *Environ Toxicol Chem*. 2014 Jun;33(6):1259-70. <https://doi.org/10.1002/etc.2482>
- (4) Mergler D, Anderson HA, Chan LH, et al; Panel on Health Risks and Toxicological Effects of Methylmercury. Methylmercury exposure and health effects in humans: a worldwide concern. *Ambio*. 2007 Feb;36(1):3-11. [https://doi.org/10.1579/0044-7447\(2007\)36\[3:meahei\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1579/0044-7447(2007)36[3:meahei]2.0.co;2)
- (5) World Health Organization. Children's Exposure to Mercury Compounds. Geneva: WHO; 2010. https://www.who.int/ceh/publications/children_exposure/en/
- (6) Okpala COR, Sardo G, Vitale S, et al. Hazardous properties and toxicological update of mercury: From fish food to human health safety perspective. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2018;58(12):1986-2001. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1291491>
- (7) Clarkson TW, Magos L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit Rev Toxicol*. 2006 Sep;36(8):609-62. <https://doi.org/10.1080/10408440600845619>
- (8) Mason RP, Abbott ML, Bodaly RA, et al. Monitoring the response to changing mercury deposition. *Environ Sci Technol*. 2005 Jan 1;39(1):14A-22A. <https://doi.org/10.1021/es053155l>
- (9) Regulamento (CE) N.º 1881/2006 da Comissão de 19 de dezembro. Fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. *JO* 20.12.2006: L 364/5-24. <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:PT:PDF>
- (10) European Market Observatory for Fisheries and Aquaculture Products. The EU Fish Market. Brussels: EUMOFA, 2019. https://www.eumofa.eu/documents/20178/314856/EN_The+EU+fish+market_2019.pdf/
- (11) Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of World Fisheries and Aquaculture: meeting the sustainable development goals. Rome: FAO, 2018. <http://www.fao.org/documents/card/en/c/19540EN/>
- (12) Rustam H, Von Burg R, Amin-Zaki L, et al. Evidence for a neuromuscular disorder in methylmercury poisoning. *Arch Environ Health*. 1975 Apr;30(4):190-5. <https://doi.org/10.1080/00039896.1975.10666674>
- (13) Crespo-López ME, Lima de Sá A, Herculano AM, et al. Methylmercury genotoxicity: a novel effect in human cell lines of the central nervous system. *Environ Int*. 2007 Feb;33(2):141-6. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.08.005>
- (14) Barbone F, Rosolen V, Mariuz M, et al. Prenatal mercury exposure and child neurodevelopment outcomes at 18 months: Results from the Mediterranean PHIME cohort. *Int J Hyg Environ Health*. 2019 Jan;222(1):9-21. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2018.07.011>
- (15) European Commission, DG Environment/Science Communication Unit, University of the West of England. Science for Environment Policy: Tackling mercury pollution in the EU and worldwide (In-depth report 15). Bristol: European Union, 2017. https://ec.europa.eu/environment/chemicals/mercury/pdf/tackling_mercury_pollution_EU_and_worldwide_IR15_en.pdf
- (16) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, International Programme on Chemical Safety (67th Meeting, 2006). Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Geneva: World Health Organization, 2007. (WHO food additives series; 58). <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43645>
- (17) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. *Eur Food Saf Auth J*. 2012;10(12):2985. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2985>
- (18) Saravanabhavan G, Werry K, Walker M, et al. Human biomonitoring reference values for metals and trace elements in blood and urine derived from the Canadian Health Measures Survey 2007-2013. *Int J Hyg Environ Health*. 2017 Mar;220(2 Pt A):189-200. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.10.006>
- (19) Santos AJ, Gil AP, Kislaya I, et al. 1o Inquérito Nacional de Saúde com Exame Físico (INSEF 2015): relatório metodológico. Lisboa: INSA, 2016. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/3832>
- (20) World Health Organization, United Nations Environment Programme. Guidance for Identifying Populations At Risk From Mercury Exposure. Geneva: WHO/UNEP, 2008. <https://www.who.int/foodsafety/publications/risk-mercury-exposure/en/>
- (21) Lopes C, Torres D, Oliveira A, et al. Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física. IAN-AF 2015-2016: relatório de resultados. Porto: Universidade do Porto, 2017. <https://ian-af.up.pt/relatorios>
- (22) Caetano T, Branco V, Cavaco A, et al. Risk assessment of methylmercury in pregnant women and newborns in the island of Madeira (Portugal) using exposure biomarkers and food-frequency questionnaires. *J Toxicol Environ Health A*. 2019; 82(14):833-44. <https://doi.org/10.1080/15287394.2019.1658859>



Biomarcador de alcoolismo crónico – transferrina deficiente em carboidratos (CDT): parâmetro bioquímico de diagnóstico e monitorização para utilização no sistema de saúde

Chronic alcoholism biomarker – carbohydrate-deficient transferrin (CDT): a biochemical parameter for the diagnosis and monitoring the patients for use in the health system

Filomena Gomes¹, Paulo Boto^{2,3}, Pedro Aguiar^{2,3}, Miguel Vasconcelos⁴, Ana Vieira da Silva⁵

filomena.gomes@insa.min-saude.pt

(1) Unidade Laboratorial de Diagnóstico e Referência. Departamento de Promoção da Saúde e Doenças não Transmissíveis, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

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

(3) Comprehensive Health Research Center. Faculdade de Ciências Médicas, NOVA Medical School, Lisboa, Portugal

(4) Divisão de Intervenção nos Comportamentos Aditivos e Dependências, Administração Regional de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo, Lisboa, Portugal

(5) Unidade de Alcoologia de Lisboa, Administração Regional de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo, Lisboa, Portugal

_Resumo

No âmbito da saúde pública torna-se importante compreender a problemática do diagnóstico e monitorização dos doentes com síndrome de dependência do álcool, pelos problemas de saúde e sociais relacionados com o consumo excessivo, mas também pelos custos imputados ao sistema de saúde. Existem vários biomarcadores específicos do alcoolismo, mas na sua maioria ainda não estão devidamente estandardizados, têm limitações de acesso à amostra biológica, ou são tecnicamente dispendiosos para uso no referido sistema. Tendo em consideração os resultados de uma revisão sistemática da literatura sobre o biomarcador específico transferrina deficiente em carboidratos (CDT), realizado no âmbito do Curso de Mestrado em Gestão da Saúde na Escola Nacional de Saúde Pública em 2019, pode concluir-se que a utilização deste parâmetro bioquímico é efetivo no diagnóstico e monitorização dos doentes com síndrome de dependência do álcool.

_Abstract

For Public Health it is important to understand how to improve the diagnosis and monitoring of patients with alcohol dependence syndrome, given the health problems related to excessive consumption, and also the costs imputed to the health system. There are several biomarkers specific to alcoholism but most either haven't been standardized yet, have limited access to biological sample, or are technically expensive to use in a healthcare system. Considering the results of a systematic literature review on the specific biomarker carbohydrate deficient transferrin, carried out within the framework of the Master's Course in Healthcare Management at National School of Public Health in 2019, we concluded that the use of this biochemical parameter is effective in diagnosis and monitoring of patients with alcohol dependence syndrome.

_Introdução

As perturbações relacionadas com o consumo abusivo do álcool são significativas, devido aos impactos económicos devastadores nos sistemas de saúde, às comorbilidades associadas e aos efeitos diretos sobre diversos órgãos e sistemas (1).

A medicina laboratorial é parte integrante de muitas decisões clínicas sobre prevenção, diagnóstico, tratamento e controle da síndrome de dependência do álcool (SDA) (2).

Ao longo dos anos tem-se procurado analisar parâmetros indicadores da presença de consumos abusivos de álcool no sangue, urina, cabelo e unhas, mas muitos deles só são possíveis de estudar no âmbito da medicina forense, porque exigem acesso a uma diversidade de amostras biológicas em diferentes órgãos, são dispendiosos e têm ainda algumas limitações analíticas (3).

No âmbito da saúde pública, há que desenvolver estratégias de fácil acesso a biomarcadores indicativos do estado do doente, não só que suportem o diagnóstico, mas também que tenham o menor custo possível para o sistema e que possam ser incorporados em árvores de decisão clínica (4).

Tanto o questionário AUDIT – *Alcohol Use Disorders Identification Test* como o ASSIST – *The Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test* não reportam a realidade bioquímica do organismo, a adaptação metabólica e/ou a adaptação dos recetores membranares cerebrais ao consumo abusivo de álcool, por isso é necessário moni-



zar o doente com SDA de forma a obter informação sobre os consumos através de biomarcadores específicos (5).

A transferrina humana é uma glicoproteína que possui uma cadeia simples polipeptídica com duas cadeias de polissacáridos não ligantes (6). É sintetizada nos hepatócitos e pode surgir com diferentes formas isomorfos no plasma. Enquanto num indivíduo saudável são detetáveis no plasma as isoformas penta, tetra e trisialo, num indivíduo com consumo abusivo de álcool estão também presentes as formas asialo, monosialo e disialotransferrina, designadas por isoformas da transferrina deficiente em carboidratos (CDT) (7).

O Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) foi pioneiro em estudos sobre a CDT em Portugal, realizados em 1987 no Laboratório de Bioquímica. Em 1990, realizou outro estudo em colaboração com o serviço de Gastroenterologia do Hospital de Santo António dos Capuchos (8) e outro em 1996/97 em colaboração com o Centro Regional de Alcoologia (CRAS) (9). Entre 2003 e 2006, o Centro de Biopatologia do INSA (atual Departamento de Promoção da Saúde e Doenças não Transmissíveis, DPS) realizou um estudo longitudinal com 107 amostras de doentes com SDA, em colaboração com o CRAS, sendo direcionado para o estudo da CDT e de alguns parâmetros de *stress oxidativo* (antes e depois do internamento).

O DPS implementou uma nova metodologia analítica para determinação deste biomarcador, onde foi possível separar todas as frações de forma rigorosa. Contudo, não foi possível realizar uma abordagem com evidência estatística, devido à falta de consenso na bibliografia à época sobre o valor de *cut-off* para a CDT. Alguns autores utilizavam um *cut-off* de 2,2% (10), outros 2,6% (11) e outros 3% (12). No seu conjunto estes estudos sugeriram um possível papel da CDT como biomarcador para o consumo excessivo de álcool.

_Objetivos

Avaliar a evidência sobre a efetividade da transferrina deficiente em carboidratos (CDT) como biomarcador de monitorização dos doentes com síndrome de dependência do álcool (SDA) e qual a sua utilização noutros sistemas de saúde.

_Metodologia

Foi realizada uma revisão sistemática da bibliografia em 2018/19, no âmbito do mestrado em Gestão da Saúde na Escola Nacional de Saúde Pública, de forma a verificar se existia evidência estatística que apoiasse a utilização da CDT na monitorização de doentes com SDA e conhecer se outros países da Europa também a utilizam, sobretudo países com padrões de consumo semelhantes a Portugal.

A referida revisão sistemática da literatura foi elaborada segundo critérios adaptados do PRISMA *statement* (13), a partir de pesquisas realizadas nas bases de dados *PubMed*, *Scopus* e *Web of Science*, publicadas no período entre 2013 a 2018, em inglês e português e em estudos realizados em humanos.

Após eliminação dos duplicados comuns às três bases de dados (tabela 1), foram selecionadas 95 publicações focadas na pergunta de investigação inicial: “Se a CDT seria eficaz como biomarcador de monitorização dos doentes com SDA e qual o seu potencial de utilização nos sistemas de saúde?”

De acordo com a metodologia escolhida, foram definidos critérios de elegibilidade e exclusão e, após aplicação dos mesmos, foram selecionados três estudos com evidência estatística sobre o tema e que constituíram a amostra deste estudo (14-16).

Tabela 1: ↓ Artigos científicos identificados nas bases de dados consultadas: *PubMed*, *Scopus* e *Web of Science*, entre 2013 e 2018.

Base de dados	N.º de artigos científicos identificados (2013-2018)	Repetidos	Publicações elegíveis
<i>PubMed</i>	45	1	44
<i>SCOPUS</i>	79	36	43
<i>Web of Science</i>	27	19	8
Total	151	56	95



A avaliação da qualidade desta amostra foi realizada através do sistema GRADE (17).

_Resultados

Das 95 publicações incluídas nesta análise, verificou-se que a maioria dos países da Europa já utilizam a CDT nos seus sistemas de saúde. Foram encontrados também outros biomarcadores específicos para o alcoolismo, mas na maioria estes têm limitações no acesso à amostra biológica, ainda não estão devidamente estandardizados para uso no diagnóstico clínico ou são demasiado dispendiosos e morosos para prestação de serviços à comunidade (18).

Na amostra estudada neste trabalho, constaram dois estudos realizados em Itália (13,15) e um na Bélgica (14), sendo o primeiro um estudo transversal onde a amostragem foi por *screening* prévio, e o segundo e terceiro estudos longitudinais, com amostragem randomizada.

Os autores eliminaram da amostragem os doentes que possuíam anomalia hereditária da transferrina, que variou entre 0,4% (15) e 2,7% (14). Salienta-se que os doentes portadores de anomalia hereditária da transferrina são identificadas no traçado cromatográfico (19) e representam apenas cerca de 1,1% da população caucasiana e 4,1% da população asiática (20).

Os grupos estudo de Bortolotti *et al.* (14) e de Reccia *et al.* (16) apresentaram uma média para a CDT de 2,56% e 2,02% respetivamente, utilizando o valor de 1,9% de *cut-off* para a CDT, enquanto Maenhout *et al.* (15) apresentaram uma média da CDT de 1,9%, utilizando um *cut-off* de 1,6%.

Os estudos de Bortolotti *et al.* (14) e Reccia *et al.* (16) analisaram apenas o biomarcador CDT, enquanto Maenhout *et al.* (15) contemplaram outros parâmetros bioquímicos, como a δ -GT, o VGM, a AST e a ALT. Este estudo mostrou um baixo valor preditivo destes parâmetros isolados para o diagnóstico clínico da SDA.

Testando-se a hipótese nula de não existência de diferenças entre o grupo controlo e grupo estudo, *versus* hipótese alternativa, de existência de diferenças, rejeitando-se a hipótese

nula a favor da alternativa, conclui-se que nos três estudos referidos existiram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudo e controlo, apresentando nos artigos de Bortolotti *et al.* (2015) e Maenhout *et al.* (2013) $p < 0,001$ e no estudo de Reccia *et al.* (2017) $p < 0,01$. Sendo nos três estudos o $p < 0,05$, o que corresponde ao usual nível de significância usado em estudos epidemiológicos, em conformidade com P. Aguiar (21).

Contudo, a ingestão de terapêutica destoxicante pelos doentes dos grupos estudos, pode ter enviesado os resultados e ter diminuído os valores da CDT, que poderiam ter sido ainda mais elevados e consequentemente os estudos apresentarem maior evidência estatística.

Face a estes resultados, conseguiu-se responder à pergunta de investigação inicial, nomeadamente reunindo evidência para a efetividade da CDT como biomarcador de alcoolismo crónico.

_Discussão e conclusões

Deste estudo conclui-se que a CDT pode ser utilizada como um biomarcador específico de alcoolismo crónico e/ou de consumo excessivo, de fácil acesso e baixo custo, indicando retrospectivamente o consumo abusivo de álcool até seis semanas. Pode ser utilizada no diagnóstico e na monitorização destes doentes, uma vez que já foi validada para o uso no diagnóstico, pela *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (IFCC) em 2014 (22,23). Outros biomarcadores específicos para detetar o excesso de consumo de álcool, ainda não estão validados para uso nos laboratórios de Patologia Clínica.

Bortolotti *et al.* (2015) e Reccia *et al.* (2017) sugeriram nas conclusões dos seus estudos, a diminuição do *cut-off* da CDT de 1,9% para o 1,7%, de modo a evitar a perda de falsos negativos, o que está em conformidade com o *cut-off* recomendado pelo IFCC para os laboratórios de Patologia Clínica (20). Isto significa que valores da CDT acima de 1,7%, são considerados de risco e o doente deve ser monitorizado.

Os autores destes estudos revelam ainda a importância dos sistemas de saúde terem várias ferramentas para detetar e



diagnosticar os doentes com SDA, pois acarretam grandes custos para os sistemas com as suas comorbilidades.

A CDT permite ao médico obter informação sobre os consumos do doente de forma retrospectiva, podendo adequar melhor a terapêutica de acordo com a metabolização de cada doente e a sua suscetibilidade hereditária.

O DPS do INSA disponibiliza-se a realizar estudos em parceria com outras instituições sobre o biomarcador CDT, prestando serviços à comunidade e originando ganhos em saúde, tanto para o doente como para o sistema de saúde.

Referências bibliográficas:

- (1) Niemelä O. Biomarker-Based Approaches for Assessing Alcohol Use Disorders. *Int J Environ Res Public Health*. 2016 Jan 27;13(2):166. <https://doi.org/10.3390/ijerph130201661>
- (2) Hallworth MJ, Epner PL, Ebert C, et al; IFCC Task Force on the Impact of Laboratory Medicine on Clinical Management and Outcomes. Current evidence and future perspectives on the effective practice of patient-centered laboratory medicine. *Clin Chem*. 2015 Apr;61(4):589-99. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.232629>
- (3) Wurst FM, Thon N, Yegles M, et al. Ethanol metabolites: their role in the assessment of alcohol intake. *Alcohol Clin Exp Res*. 2015 Nov;39(11):2060-72. <https://doi.org/10.1111/acer.12851>
- (4) Pletcher MJ, Pignone M. Evaluating the clinical utility of a biomarker: a review of methods for estimating health impact. *Circulation*. 2011 Mar 15;123(10):1116-24. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.110.943860>
- (5) Nanau RM, Neuman MG. Biomolecules and Biomarkers Used in Diagnosis of Alcohol Drinking and in Monitoring Therapeutic Interventions. *Biomolecules*. 2015 Jun 29;5(3):1339-85. <https://doi.org/10.3390/biom5031339>
- (6) Kohler I, Augsburg M, Rudaz S, et al. New insights in carbohydrate-deficient transferrin analysis with capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Forensic Sci Int*. 2014 Oct;243:14-22. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.03.014>
- (7) Bean P, Liegmann K, Løvli T, et al. Semiautomated procedures for evaluation of carbohydrate-deficient transferrin in the diagnosis of alcohol abuse. *Clin Chem*. 1997 Jun;43(6 Pt 1):983-9.
- (8) Peneda JA, Fonseca A, Neves M, et al. Asialotransferrina discriminante do consumo excessivo activo de álcool, sub-agudo e crónico. Utilidade clínica na doença hepática. *Acta Med Port*. 1996 Feb-Mar;9(2-3):103-11. <https://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/2561/1974>
- (9) Peneda J, Fonseca A, Ribeiro C, et al. A abstinência no alcoolismo. Comportamento da transferrina deficiente em carbo-hidratos (CDT). *Medicina Interna*. 1998;5(4):224-31. https://www.spmi.pt/revista/vol05/vol5_n4_1998_224-231.pdf
- (10) Daepfen JB, Anex F, Favrat B, et al. Carbohydrate-deficient transferrin measured by capillary zone electrophoresis and by turbidimetric immunoassay for identification of young heavy drinkers. *Clin Chem*. 2005 Jun;51(6):1046-8. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.044461>
- (11) Miller PM, Spies C, Neumann T, et al. Alcohol biomarker screening in medical and surgical settings. *Alcohol Clin Exp Res*. 2006 Feb;30(2):185-93. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2006.00029.x>
- (12) Hock B, Schwarz M, Domke I, et al. Validity of carbohydrate-deficient transferrin (%CDT), gamma-glutamyltransferase (gamma-GT) and mean corpuscular erythrocyte volume (MCV) as biomarkers for chronic alcohol abuse: a study in patients with alcohol dependence and liver disorders of non-alcoholic and alcoholic origin. *Addiction*. 2005 Oct;100(10):1477-86. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2005.01216.x>
- (13) Ottawa Hospital Research Institute-University of Oxford. PRISMA – Transparent Reporting of Systematic Reviews and Meta-analyses [Internet]. [consult. 10/12/2020] <http://www.prisma-statement.org/>
- (14) Bortolotti F, Micciolo R, Canal L, et al. First objective association between elevated carbohydrate-deficient transferrin concentrations and alcohol-related traffic accidents. *Alcohol Clin Exp Res*. 2015 Nov;39(11):2108-14. <https://doi.org/10.1111/acer.12879>
- (15) Maenhout TM, Poll A, Vermassen T, et al; ROAD Study Group. Usefulness of indirect alcohol biomarkers for predicting recidivism of drunk-driving among previously convicted drunk-driving offenders: results from the recidivism of alcohol-impaired driving (ROAD) study. *Addiction*. 2014 Jan;109(1):71-8. <https://doi.org/10.1111/add.12372>
- (16) Reccia LA, Morelli RA, Boccella SB, et al. Clinical determination of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) in alcohol addicts: a random sample of the general population in Naples, Italy. *Heroin Addict Relat Clin Probl*. 2017;19(4):41-46.
- (17) Atkins D, Best D, Briss PA, et al.; GRADE Working Group. Grading quality of evidence and strength of recommendations. *BMJ*. 2004 Jun 19;328(7454):1490. <https://doi.org/10.1136/bmj.328.7454.1490>
- (18) Kummer N, Wille SM, Poll A, et al. Quantification of EtG in hair, EtG and EtS in urine and PEth species in capillary dried blood spots to assess the alcohol consumption in driver's licence regranting cases. *Drug Alcohol Depend*. 2016 Aug 1;165:191-7. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2016.06.012>
- (19) Bortolotti F, Sorio D, Bertaso A, et al. Analytical and diagnostic aspects of carbohydrate deficient transferrin (CDT): A critical review over years 2007-2017. *J Pharm Biomed Anal*. 2018 Jan 5;147:2-12. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.09.006>
- (20) Helander A, Wielders J, Anton R, et al.; International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Working Group on Standardisation of Carbohydrate-Deficient Transferrin (IFCC WG-CDT). Reprint of Standardisation and use of the alcohol biomarker carbohydrate-deficient transferrin (CDT). *Clin Chim Acta*. 2017 Apr;467:15-20. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.03.018>
- (21) Aguiar P. Estatística em investigação epidemiológica SPSS: guia prático de medicina. Vila Franca de Xira: Climepsi Editoras, 2007.
- (22) Weykamp C, Wielders J, Helander A, et al.; IFCC Working Group on Standardization of Carbohydrate-Deficient Transferrin. Harmonization of measurement results of the alcohol biomarker carbohydrate-deficient transferrin by use of the toolbox of technical procedures of the International Consortium for Harmonization of Clinical Laboratory Results. *Clin Chem*. 2014 Jul;60(7):945-53. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.221531>
- (23) Schellenberg F, Wielders J, Anton R, et al. IFCC approved HPLC reference measurement procedure for the alcohol consumption biomarker carbohydrate-deficient transferrin (CDT): Its validation and use. *Clin Chim Acta*. 2017 Feb;465:91-100. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.12.022>



Avaliação da fase pré-analítica na área da morfologia parasitária, PNAEQ 2019

Evaluation of the pre-analytical phase in parasitic morphology area, PNAEQ 2019

Lúcia de Jesus¹, Cláudia Júlio², Ana Cardoso³, Catarina Ventura³, Sílvia Viegas³, Teresa Baptista Fernandes⁴, Quirina Santos Costa⁵, Guilhermina Moutinho^{6,7}, Ana Faria³

luciadejesus@hotmail.co.uk

(1) Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

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

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

(4) Laboratório de Microbiologia Clínica e Biologia Molecular. Serviço de Patologia Clínica, Centro Hospitalar Lisboa Ocidental, Lisboa, Portugal

(5) iMedULisboa. Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

(6) PharmSci Lab – Innovative Solutions in Pharmaceutical Sciences, Instituto Universitário Egas Moniz, Monte de Caparica, Portugal

(7) Centro de Investigação Interdisciplinar Egas Moniz, Instituto Universitário Egas Moniz, Monte de Caparica, Portugal

_Resumo

Para garantir um diagnóstico clínico adequado, os procedimentos da fase pré-analítica não podem ser negligenciados. A implementação de um sistema de garantia da qualidade permite detetar, monitorizar, e reduzir ou eliminar os erros laboratoriais. O Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade (PNAEQ), inserido no Departamento de Epidemiologia do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, incluiu, em 2019, a área da morfologia parasitária no programa de Avaliação da Fase Pré-Analítica. A taxa de participação foi reduzida, correspondendo a 10% dos laboratórios inscritos na área clínica e os resultados evidenciaram ausência de harmonização de procedimentos, bem como a necessidade de avaliação e monitorização da fase pré-analítica, para consolidação da informação disponibilizada, levando à melhoria dos resultados laboratoriais e ao aumento da segurança dos utentes.

_Abstract

To ensure an adequate clinical diagnosis, the pre-analytical phase procedures cannot be neglected. The implementation of a quality assurance system allows detecting, monitoring, and reducing or eliminating the laboratory errors. The National Program of External Quality Assessment (PNAEQ) integrated in the Epidemiology Department of the National Health Institute Dr Ricardo Jorge, included, in 2019, the parasitic morphology area in the Pre-Analytical Phase Evaluation program. The participation rate was reduced, corresponding to 10% of the laboratories registered in the clinical area and the results revealed an absence of harmonization of procedures, as well as the need to evaluate and monitor the pre-analytical phase, to consolidate the information provided, leading to improved laboratory results and increased patient's safety.

_Introdução

As parasitoses são um importante problema de saúde pública e apesar de serem mais prevalentes nos países em desenvolvimento (1-3), também ocorrem nos outros, principalmente, devido ao aumento da mobilidade das populações (1,3,4) e da globalização dos géneros alimentícios (5).

O diagnóstico é maioritariamente efetuado por deteção e identificação microscópica das estruturas parasitárias, nos produtos biológicos (1,6) e a fase pré-analítica não pode ser negligenciada, pois qualquer condição que possa ocultar ou alterar a morfologia dos parasitas, pode contribuir para um diagnóstico incorreto (6). O sistema da qualidade implementado deve incluir a participação em programas de Avaliação Externa da Qualidade (AEQ) que verifiquem todo o processo analítico (fases pré-analítica, analítica e pós-analítica), como recomendado na norma NP EN ISO 15189:2014 (7).

Tendo isto em consideração, o PNAEQ, em 2019, desenvolveu metodologias para avaliar os procedimentos da fase pré-analítica, na área da morfologia parasitária.

_Objetivo

Avaliação da participação dos laboratórios inscritos no programa da Fase Pré-Analítica do Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade, em 2019, para apreciação dos procedimentos da fase pré-analítica na área da morfologia parasitária.



_Material e métodos

As metodologias desenvolvidas pelo grupo de trabalho da Pré-Analítica (PNAEQ) visaram a identificação e monitorização de indicadores da qualidade, a realização de auditoria presencial e a aplicação do cliente mistério aos participantes inscritos no programa.

Monitorização de indicadores da qualidade – foram selecionados oito indicadores para monitorizar a qualidade das amostras de fezes. As ocorrências foram registadas tendo em consideração o local de entrega da amostra: laboratório central; postos de colheita ou locais de internamento de doentes.

Auditoria presencial – realização de uma auditoria presencial à área pré-analítica, em dois momentos distintos: 2º e 4º trimestres. O auditor deveria presenciar a entrega de amostras de fezes para exame parasitológico e registar os dados, seguindo uma lista de verificação.

Cliente mistério – realizaram-se dois ensaios: o “Cliente Mistério A” simulando um utente com questões sobre a pesquisa de oxiúros (*Enterobius vermicularis*) e o “Cliente Mistério B” simulando um clínico solicitando informações sobre a pesquisa de *Plasmodium* spp. Para cada ensaio foram realizadas duas chamadas telefónicas anónimas a cada participante com base num guião, em diferentes períodos. Avaliou-se a percentagem de respostas discrepantes entre as duas chamadas e a sua adequabilidade.

No “Cliente Mistério A” foram solicitadas as seguintes informações: instruções de colheita; horário de entrega das amo-

stras; envio destas informações por *email* ou disponíveis no *website* do laboratório. Atribuiu-se *score* entre 0 e 3, para avaliar a adequabilidade das instruções de colheita fornecidas: duas respostas não adequadas (chamada 1 e chamada 2) ou uma resposta não adequada e uma chamada sem resposta – *score* 0; uma resposta adequada e uma resposta não adequada – *score* 1; uma resposta adequada e uma chamada sem resposta – *score* 2 e duas respostas adequadas – *score* 3. Consideraram-se respostas adequadas: a utilização de uma zaragatoa de algodão humedecida em soro fisiológico ou a realização do teste de fita-cola perianal.

No “Cliente Mistério B” foi avaliada a adequabilidade para as seguintes questões: realização de esfregaço; realização de gota espessa; identificação da espécie e quantificação da parasitémia. Consideraram-se adequadas as respostas afirmativas para cada uma das questões.

_Resultados

A taxa de participação e os resultados de desempenho dos participantes para cada uma das ferramentas foram os seguintes:

Monitorização de indicadores da qualidade

O número de laboratórios inscritos em cada trimestre variou entre 18 e 19. Foram validadas oito respostas para a monitorização dos indicadores aplicados à área da morfologia parasitária. Os resultados obtidos encontram-se descritos na [tabela 1](#).

Tabela 1: Média anual (%) de ocorrências registadas para os oito indicadores, aplicado a amostras de fezes, recolhidas no laboratório central (LC) e postos de colheitas/internamento (P/I).

Indicador	LC (%)	P/I (%)
Amostras não identificadas	0,004	0,007
Amostras mal identificadas	0,001	0,001
Pedido de repetição de colheita devido a:		
– Amostra insuficiente por volume insuficiente	0,001	0,000
– Natureza da amostra incorreta (tubo ou recipiente inapropriado)	0,008	0,009
– Confirmação de resultado	0,000	0,000
Incorreta conservação das amostras até à entrega no laboratório (temperatura)	0,000	0,000
Incorreto acondicionamento de produtos biológicos (derrame)	0,001	0,011
Incorreta estabilidade das amostras no transporte (tempo)	0,001	0,000



Auditoria presencial

Foram validadas 10 participações na auditoria do 2º e 4º trimestres para o procedimento de receção de amostras de fezes do exame parasitológico. Observou-se a entrega de 25 amostras a 25 colaboradores diferentes e 60 amostras a 18 colaboradores diferentes, respetivamente.

O gráfico 1 apresenta os resultados obtidos nas duas auditorias. Relativamente ao item de rejeição de amostra, apenas foi avaliado na auditoria do 4º trimestre. O motivo de rejeição das amostras (5%) apresentado pelos participantes foi, nomeadamente, extravasamento (67%) e recipiente inadequado (33%).

Cliente mistério

No “Cliente Mistério A” para a avaliação da concordância das respostas obtidas entre as duas chamadas, foram validados 16 participantes, tendo sido excluídos 3 por não terem atendido uma das chamadas, após três tentativas.

Em média, em 38% das informações facultadas pelos colaboradores, não existiu coerência entre as duas chamadas telefónicas. Foram validados 17 participantes para atribuição de score e excluídos 2 que só utilizam requisições internas. O score 0 foi atribuído a 76% dos participantes e apenas 6% obtiveram o score máximo (gráfico 2).

Gráfico 1: Respostas (%) obtidas nas auditorias presenciais do 2º e 4º trimestres relativamente à receção de amostras de fezes para exame parasitológico.

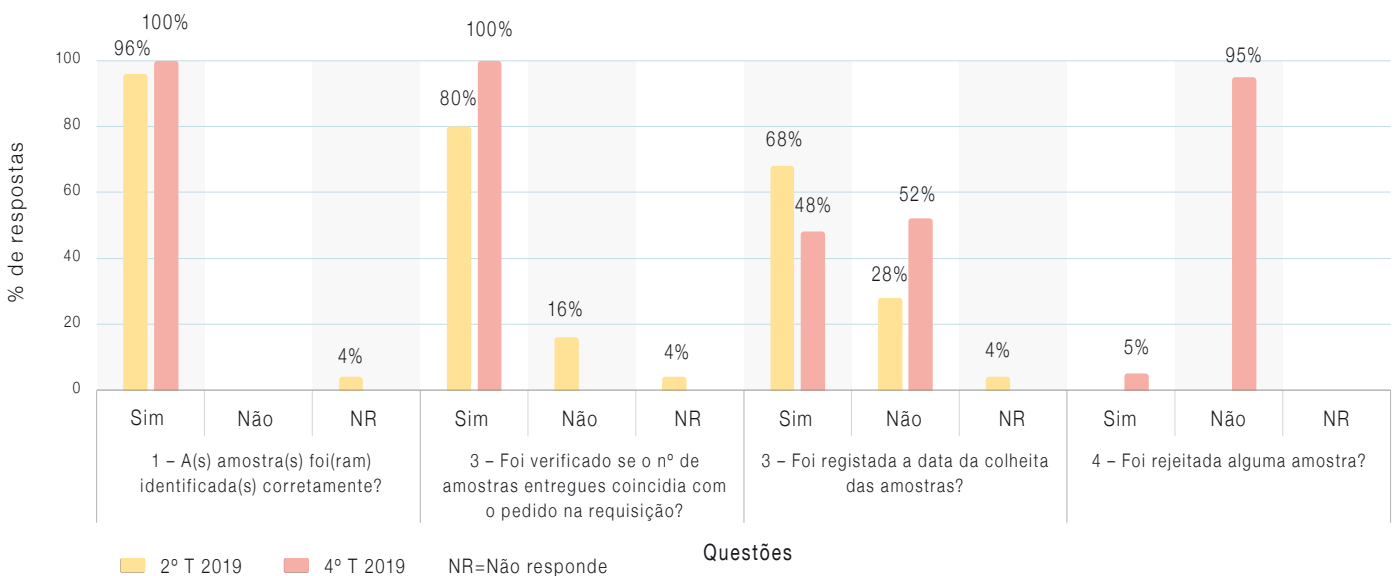
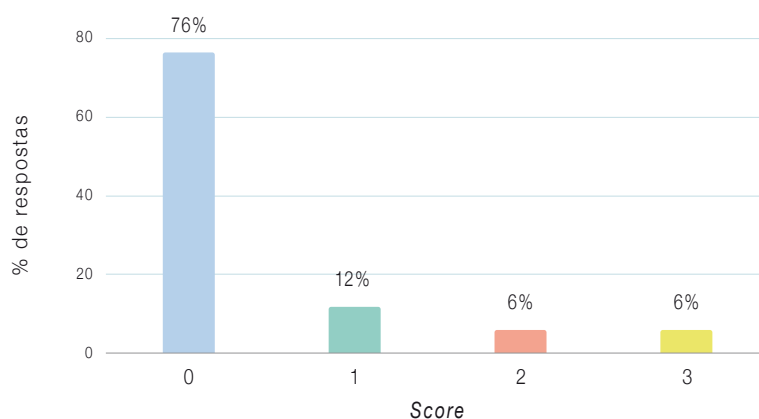


Gráfico 2: Distribuição do score (%) atribuído aos participantes, no “Cliente Mistério A”.





No “Cliente Mistério B” para a aferição da coerência das respostas foram validados 17 participantes, e excluídos 2 por não atenderem uma das chamadas, após três tentativas. Em cerca de 24% das respostas não existiu coerência nas informações facultadas. Dos participantes que declararam realizar a análise em ambas as chamadas: 75% afirmaram realizar esfregaço e gota espessa; 50% declararam identificar a espécie; 25% afirmaram quantificar a parasitêmia e apenas 13% declararam realizar todos os procedimentos recomendados (gráfico 3).

Discussão

Foi reduzida a taxa de participação no programa de Avaliação da Fase Pré-Analítica, uma vez que dos cerca de 200 participantes inscritos em programas da área clínica, somente 10% se inscreveram neste programa.

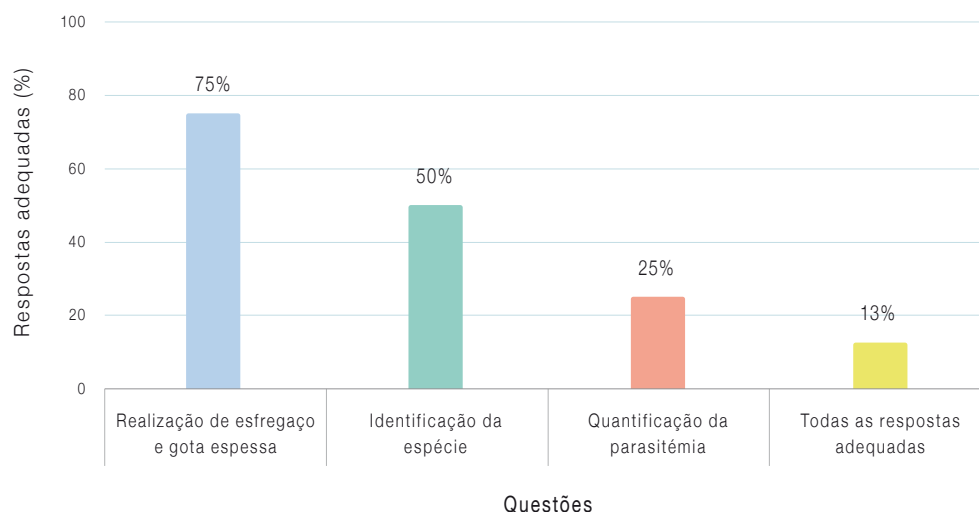
Relativamente à avaliação quantitativa pela monitorização de indicadores da qualidade, foi obtido pior desempenho para os casos relacionados com a colheita de amostras de fezes em recipiente inapropriado, e o incorreto acondicionamento de produtos biológicos, por derrame. A continuação da monitorização em anos subsequentes, irá permitir a implementação de um plano de ação para minimizar ou eliminar o número destas ocorrências.

As auditorias presenciais promovem o envolvimento do laboratório no processo de autoavaliação e monitorização. Nas auditorias ao procedimento de receção de amostras de fezes para exame parasitológico, verificou-se que efetuar o registo da data da colheita das amostras não é uma prática consolidada entre os colaboradores auditados. A data da colheita é relevante dado que as amostras devem ser colhidas em dias não consecutivos e é necessário considerar o intervalo de tempo que medeia a colheita e o exame, principalmente se forem utilizados recipientes sem conservante (2,6,8-10), estando esta prática de acordo com os requisitos normativos (norma NP EN ISO 15189:2014) (7).

O “Cliente Mistério” simula situações reais para avaliar a qualidade do atendimento aos clientes, pela entidade organizadora de AEQ, quanto à adequabilidade e constância da informação fornecida, ou se o seu conteúdo está dependente do colaborador do laboratório.

No “Cliente Mistério A”, verificou-se que os colaboradores dos laboratórios desconhecem a pesquisa de *E. vermicularis*, só identificando a pesquisa de oxiúros, pelo que foi necessário alterar a questão presente no guião. A maioria das instruções de colheita facultadas não eram adequadas. No “Cliente Mistério B” as percentagens mais elevadas de respostas discrepantes foram obtidas para as questões sobre a identificação da espécie de Plasmódio e a quanti-

Gráfico 3: ↓ Respostas (%) adequadas, em ambas as chamadas telefónicas, dos participantes, no “Cliente Mistério B”.





ficação da parasitemia. A metodologia de referência, compreende a observação microscópica de esfregaço e gota espessa sanguíneos, com a identificação da espécie e a quantificação da parasitemia (11-16), constituindo informação indispensável para a seleção e o controlo da terapêutica (12-15). Os resultados obtidos mostram que apenas 13% dos participantes realizam todos os procedimentos recomendados.

_Conclusão

A análise global dos resultados evidenciou a necessidade de harmonização de procedimentos entre colaboradores do mesmo laboratório e entre laboratórios, bem como a necessidade de avaliação e monitorização da fase pré-analítica na área da morfologia parasitária. A consolidação da informação disponibilizada aos utentes, contribui para o aumento da fiabilidade dos resultados laboratoriais e aumenta a segurança dos utentes.

Por outro lado, a análise dos resultados demonstrou ser adequada a aplicação destas ferramentas, nomeadamente, a quantificação de indicadores, a autoavaliação e os casos simulados, com ação corretiva imediata e ao longo do tempo, permitindo a monitorização do desempenho, aquisição de competências e implementação de boas práticas laboratoriais.

O PNAEQ deverá motivar os participantes a incluírem a avaliação da fase pré-analítica no plano anual de participação em AEQ e promover ações de sensibilização e formação aos laboratórios clínicos sobre a importância desta fase na obtenção de resultados confiáveis, disponibilizando sempre que possível, as ferramentas que facilitem a recolha de dados de uma forma interativa entre os participantes e o programa.

Agradecimentos:

À Edna Pereira, à Helena Correia, à Marina Cordeiro e à Neuza Gomes, colaboradoras do PNAEQ, todo o trabalho desenvolvido.

Referências bibliográficas:

- (1) Ricciardi A, Ndao M. Diagnosis of parasitic infections: what's going on? *J Biomol Screen*. 2015 Jan;20(1):6-21. Epub 2014 Aug 28. <https://doi.org/10.1177/1087057114548065>
- (2) Roberts L, Zeigib E. Specimen Collection and Processing. In: *Clinical Parasitology: a practical approach*. 2nd ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2013. p. 14-40.
- (3) Claus PE, Ceuppens AS, Cool M, et al. *Ascaris lumbricoides*: challenges in diagnosis, treatment and prevention strategies in a European refugee camp. *Acta Clin Belg*. 2018 Dec;73(6):431-34. <https://doi.org/10.1080/17843286.2018.1436956>
- (4) Marchese V, Beltrame A, Angheben A, et al. Schistosomiasis in immigrants, refugees and travellers in an Italian referral centre for tropical diseases. *Infect Dis Poverty*. 2018 Jun 16;7(1):55. <https://doi.org/10.1186/s40249-018-0440-5>
- (5) Ortega YR, Sanchez R. Update on *Cyclospora cayentanensis*, a food-borne and waterborne parasite. *Clin Microbiol Rev*. 2010 Jan;23(1):218-34. <https://doi.org/10.1128/cmr.00026-09>
- (6) Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical Microbiology*. 8th ed. Philadelphia, PA: Elsevier, 2015.
- (7) NP EN ISO 15189 2014 : laboratórios clínicos : requisitos para a qualidade e competência. 2ª ed. Instituto Português da Qualidade, 2014.
- (8) Garcia LS, Arrowood M, Kokoskin E, et al. Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Laboratory Diagnosis of Parasites from the Gastrointestinal Tract. *Clin Microbiol Rev*. 2017 Nov 15;31(1):e00025-17. <https://doi.org/10.1128/cmr.00025-17>
- (9) Garcia LS. *Diagnostic Medical Parasitology*. 6th ed. Washington, D.C.: ASM Press, 2016.
- (10) Clinical and Laboratory Standards Institute. Procedures for the recovery and identification of parasites from the intestinal tract (approved guideline). 2nd ed. Wayne, PA: CLSI, 2005. (CLSI document M28-A2).
- (11) Centers for Disease Control and Prevention. DPDx - Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern - Malaria [Internet]. 2019 [consult. 6/3/2020]. <https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html>
- (12) Direção-Geral da Saúde. Orientação n.º 008/2017 de 17/05/2017. Malária ou Paludismo.
- (13) Murphy SC, Shott JP, Parikh S, et al. Malaria diagnostics in clinical trials. *Am J Trop Med Hyg*. 2013 Nov;89(5):824-39. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0675>
- (14) Bailey JW, Williams J, Bain BJ, et al; General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology. Guideline: the laboratory diagnosis of malaria. General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol*. 2013 Dec;163(5):573-80. <https://doi.org/10.1111/bjh.12572>
- (15) Thomson S, Lohmann RC, Crawford L, et al. External quality assessment in the examination of blood films for malarial parasites within Ontario, Canada. *Arch Pathol Lab Med*. 2000 Jan;124(1):57-60. [https://doi.org/10.1043/0003-9985\(2000\)124%3C0057:eqaite%3E2.0.co;2](https://doi.org/10.1043/0003-9985(2000)124%3C0057:eqaite%3E2.0.co;2)
- (16) Yin J, Yan H, Li M, et al. Competency and challenges in malaria microscopy in China. *Biosci Trends*. 2017;11(6):702-705. <https://doi.org/10.5582/bst.2017.01275>



_O paradigma da contaminação fecal de águas balneares, nem sempre o humano é culpado

The paradigm of bathing water faecal contamination, humans are not always to blame

Maria Leonor Santos, João Brandão, Elisabete Valério

elisabete.valerio@insa.min-saude.pt

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

_Resumo

E. coli, coliformes, enterococos intestinais, estas bactérias foram durante décadas a luz do sol na luta contra a propagação de doenças transmissíveis por águas de consumo e recreativas. A sua presença em massas de água correlaciona-se diretamente com a doença humana. No entanto, essa correlação não é total. Há uma percentagem de casos em que a sua presença não tem implicações na saúde humana. Como resolver estes casos, de forma a identificar as fontes de contaminação fecal? A Biotecnologia respondeu a esta questão. O genoma das *Bacteroides* spp., bactérias pertencentes à flora intestinal de animais de sangues quentes e difíceis de cultivar em laboratório, apresentam pequenas variações de acordo com espécies que colonizam, indicando assim se a presença do seu material genético numa água é de origem humana, bovina, canídea, suína ou avícola, por exemplo. A sua pesquisa para determinar fontes de contaminação fecal em massas de água denomina-se de *Microbial Source Tracking*. Este método não veio substituir a utilização das bactérias intestinais tradicionais, que são indicadores simples e eficientes, mas veio dar resposta à procura das fontes biológicas de uma contaminação fecal.

_Abstract

E. coli, coliforms, intestinal enterococci, these bacteria have been for decades the sunshine of the struggle against the propagation of waterborne diseases. Its presence in water bodies correlates directly with human disease. Yet, this correlation is not complete; there is a percentage of presence that has no implications in human health. How can these cases be resolved in such a way that the sources of faecal contamination be identified? Biotechnology answered this question. The genome of *Bacteroides* spp., which are bacteria that belong to the intestinal flora of warm-blooded animals, hardly cultivable in laboratory, vary according to the animal species which they colonise. Due to this characteristic, the presence of its genetic material in water may be tracked to have originated, for example, in humans, bovines, canines, swine or fowl. The determination of sources of faecal contamination in water bodies is named "Microbial Source Tracking". It does not replace the traditional use of intestinal bacteria, which are simple and efficient indicators, but it does respond to the search for biological sources of faecal contamination.

_Introdução

O papel da água na vida

A água é um recurso natural essencial à vida ⁽¹⁾, fazendo parte de diversos processos físicos, químicos e biológicos ^(2,3). Esta é uma fonte imprescindível para a vida e a sua manutenção, desempenhando um papel crucial não só para o homem como para as suas inúmeras atividades, como tarefas diárias, de lazer e de turismo ^(1,2).

Saúde ambiental

Tudo o que é introduzido na água passa pelo ambiente e chega ao homem. Sendo por isso crucial, de modo a alcançar uma boa saúde pública, protegê-la e assegurar a sua disponibilidade e qualidade para os diversos fins a que se destina. Para tal, é necessário que existam um conjunto de estratégias e leis associadas à gestão sustentável, monitorização e proteção das águas e dos seus ecossistemas. Deste modo, consegue-se alcançar uma boa qualidade, já que um controlo ineficiente das fontes de poluição, ou uma incorreta gestão, poderá afetar as massas de água destinadas ao consumo doméstico ⁽⁴⁾ ou a qualidade das águas balneares, e as usadas para outros fins recreativos.

Problemas que advêm das águas

Recursos hídricos contaminados representam não só um elevado risco para a saúde humana, devido à possibilidade de ingestão e de transmissão de doenças parasitárias e infecciosas, mas também pode afetar o ambiente e a economia, já que pode originar o encerramento de áreas recreativas, como praias, zonas de pesca e de aquacultura, assim como outros locais de lazer que envolvam massas de água contaminadas ^(3,5-9).



saúde pública associados à mesma (5,9,12,14,16-19). Estas são caracterizadas por um grupo heterogéneo de taxa bacterianos, definidos por características fenotípicas que permitem a sua deteção e quantificação (12). Os principais FIB usados mundialmente são atualmente *E. coli* e *Enterococcus* (8,10,17,18,20,21), que foram selecionados com base nas vantagens que apresentam na sua capacidade indicatória de contaminação fecal (16,17).

Por exemplo, em Portugal, a avaliação da qualidade das águas balneares rege-se pelos critérios da Diretiva 2006/7/CE, e do Decreto-lei n.º 113/2012 (22,23). Esta é realizada com base na análise bacteriológica para identificação de *Enterococos* intestinais e *Escherichia coli*. De acordo com os resultados dessas análises bacteriológicas, cada água balnear é classificada como “excelente”, “boa”, “aceitável”, ou “má” (22,23).

No entanto, a utilização destas FIB apresenta algumas limitações, por um lado não é necessariamente representativa de todos os agentes patogénicos possíveis, em todos os momentos no tempo, por outro lado, e mais relevante, não permite saber qual a sua fonte biológica, ou seja, qual a origem da contaminação fecal. Esta é uma enorme desvantagem, sobretudo na caracterização do risco para a saúde pública, na implementação de medidas corretivas e processos de mitigação (5,8,14,16-18,20,21).

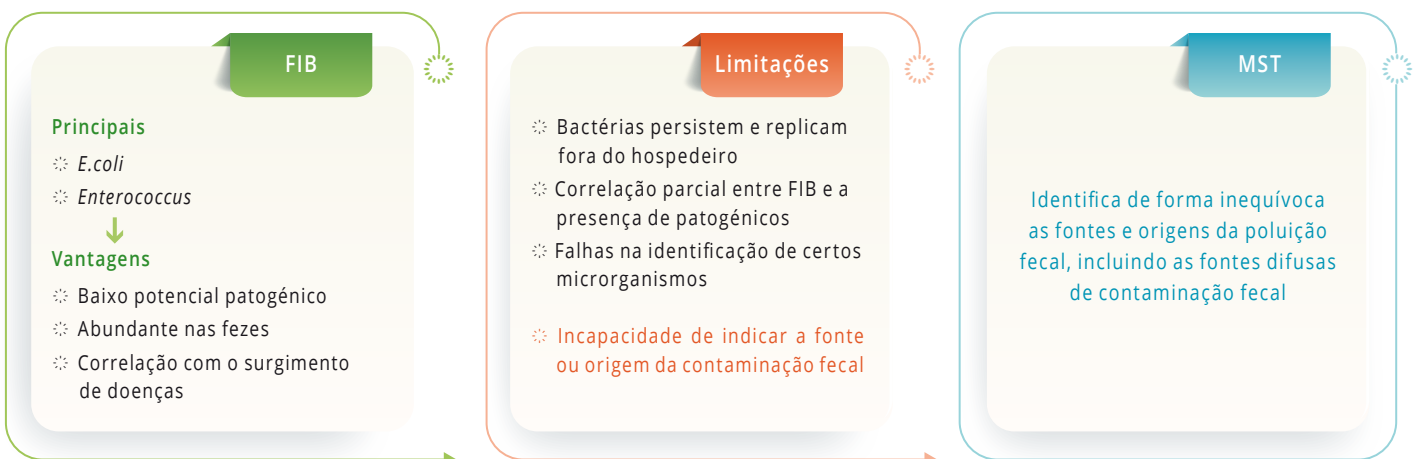
Na figura 3 está representado um esquema simplificado do surgimento do conceito de *Microbial Source Tracking* (MST), que permite complementar a informação gerada pela utilização das FIB – pois permite identificar os grupos biológicos que originam a poluição fecal.

As técnicas de rastreamento molecular da fonte microbiana (MST), do inglês *Microbial Source Tracking*, surgiram no final do século XX (17) e têm sido desenvolvidas na última década, de modo a dar resposta à limitação indicada anteriormente: identificar de forma inequívoca as fontes e origens da poluição fecal, incluindo as fontes difusas de contaminação fecal (7-9,11,12,14,16,17,19-21,24-26). Esta identificação é crucial para avaliar a qualidade da água e o risco associado à saúde humana, de forma a alocar verbas e a reformular as legislações em vigor, já que estas poderão ser cruciais na interrupção da transmissão de agentes patogénicos que irão afetar a saúde pública (7,9,16,17,19,20,24,25). Geralmente, são necessários grandes esforços e investimentos financeiros para mitigar as fontes de contaminação, como tal, a identificação das fontes de contaminação, facilita a sua resolução e definição dos recursos necessários (7,20,24,25).

Como funciona a técnica MST

A premissa da técnica MST baseia-se na associação de certos microrganismos fecais com um hospedeiro em particular, dado que cada organismo possui um conjunto

Figura 3: Esquema simplificado do aparecimento do conceito do *Microbial Source Tracking* (MST), que surge de modo a colmatar as limitações indicadas pela ferramenta FIB.





de microrganismos específicos no seu trato intestinal e estes tendem a passar para as massas de água pelas fezes (5,7-9,12,14,16,17,20,21,24,26).

Os métodos de MST independentes de bibliotecas de dados (LI-MST) são preferencialmente utilizados, pois visam uma característica particular de uma espécie ou tipo específico de patógeno, tornando-se assim mais apelativos para a identificação ao nível da espécie contaminante. Alguns destes métodos recorrem a cultura, sendo baseados pelo crescimento de vírus, bacteriófagos ou bactérias específicas da fonte e mtDNA (5,9,17,20). Por outro lado, caso sejam independentes de cultura, serão utilizados os testes químicos (como a deteção de cafeína, esteróis e estanois fecais, pesticidas e policíclicos) e moleculares (como a extração dos ácidos nucleicos dos alvos em questão) (5,9,20).

As bactérias usadas em MST apresentam quantidades e características distintas, como padrões de resistência a antibióticos (11,13,17,20,26) ou fragmentos específicos de um gene que está inequivocamente associado a um hospedeiro (11,12). Esta especificidade deve-se a processos evolutivos (11) e ao facto de as espécies de microrganismos diferirem com a dieta, fatores socioeconómicos e culturais, fisiologia e anatomia do hospedeiro, como a idade, genética e estado de saúde, e com a localização geográfica do hospedeiro (5,7,12,18,19,24,27). Ao conhecer essas relações, que variam dentro de uma população ao longo do tempo e entre diferentes populações no espaço, é possível identificar a fonte de contaminação fecal, já que muitos dos métodos que compõem esta técnica dependem de uma sequência específica de DNA, a que se designa de marcador molecular (7,8,11,12,14,17,19-21,24-26).

Aplicabilidade dos marcadores moleculares em MST

Os marcadores moleculares usados em MST são sequências de DNA que pertencem a microrganismos específicos de um hospedeiro (17). Usualmente, recorre-se a vários marcadores para um único hospedeiro e a métodos de combinação, com o objetivo de aumentar a discriminação e precisão ou para confirmar os resultados (9,17,20,24).

De forma a caracterizar o seu desempenho e aplicabilidade, os marcadores podem ser testados através de métodos qualitativos e quantitativos (24,19). Estes são avaliados conforme a especificidade e sensibilidade que apresentam (7,12,17,24). Um marcador específico é um marcador que pertence exclusivamente a um hospedeiro, o que permite indicar com elevada precisão a fonte de contaminação, já a sua sensibilidade consiste na sua capacidade de detetar fezes do hospedeiro, quando estas se encontram presentes nos recursos hídricos (11,24). A especificidade ao hospedeiro é definida com base nos resultados verdadeiramente negativos das análises quando se analisa material genético de hospedeiros não-alvo. Porém, é de destacar que nenhum dos marcadores bacterianos exhibe especificidade absoluta, provavelmente não só devido à fisiologia, dietas semelhantes e coabitação dos organismos, mas também graças à possibilidade de haver homologia entre algumas regiões do genoma de genes marcadores, com outros microrganismos que não os esperados. Devem, portanto, ser sempre validados para uma zona geográfica antes de serem usados rotineiramente.

Apesar dos marcadores virais apresentarem especificidade absoluta ao hospedeiro, de um modo geral, estes são menos prevalentes que os bacterianos nas amostras fecais (7,14,17,19,20,24,28).

A sensibilidade do método é definida pela proporção de amostras verdadeiramente positivas em que o marcador é detetado, ou seja, é a capacidade que o marcador tem de ser detetado em amostras fecais, mistas ou puras.

A escolha dos marcadores tem, então, como base a especificidade e sensibilidade do método selecionado e o que se sabe até à data sobre as fontes de contaminação na área de estudo (24). O uso de diversos marcadores permitirá determinar a principal fonte biológica de contaminação fecal.

_Conclusões

A abordagem *Microbial Source Tracking* (MST) é relevante no contexto da contaminação fecal de águas fluviais e balneares. Esta ferramenta de MST é extremamente útil para a prevenção e no estabelecimento de medidas de mitigação,



pois ao se fazer a associação a um culpado, de todos os possíveis suspeitos que andam entre nós, é possível tomar as medidas mais indicadas para a gestão do problema.

Apesar do MST ser uma técnica promissora para identificar a fonte de contaminação fecal, deve-se, sempre que possível, apostar numa abordagem combinada, onde se recorre às bactérias indicadoras fecais (FIB), à MST e à quantificação de marcador, pois só assim é que se terão informações mais confiáveis sobre a qualidade da água e riscos para a saúde pública.

Referências bibliográficas:

- (1) Comissão Europeia. A Directiva-quadro da Água: algumas informações. Luxemburgo: Serviço das Publicações Oficiais das Comunidades Europeias, 2002. http://apambiente.pt/dqa/assets/brochure_dqa.pdf
- (2) Instituto da Água. Implementação da directiva quadro da água: 2000-2005. Lisboa: Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional, 2006. https://apambiente.pt/dqa/assets/publ_portugal_dqa.pdf
- (3) Soares E, Ferreira R. Avaliação da qualidade da água e a importância do saneamento básico no Brasil. *Revista Meio Ambiente E Sustentabilidade*. 2017;13(6):50-76. <https://doi.org/10.22292/mas.v13i6.762>
- (4) Decreto-Lei n.º 306/2007, de 27 de agosto. DR Série I, n.º 164 (2007-08-27):5747-65. Estabelece o regime da qualidade da água destinada ao consumo humano, revendo o Decreto-Lei n.º 243/2001, de 5 de Setembro, que transpôs para a ordem jurídica interna a Directiva n.º 98/83/CE, do Conselho, de 3 de Novembro. <https://data.dre.pt/eli/dec-lei/306/2007/08/27/p/dre/pt/html>
- (5) Oliveira S. Avaliação da presença de biomarcador molecular de contaminação fecal hospedeiro específico em águas de recreação costeira no estado do Rio de Janeiro. (Dissertação de mestrado em Vigilância Sanitária, apresentada ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. 2014).
- (6) Purnell S, Halliday A, Newman F, et al. Pathogen infection risk to recreational water users, associated with surface waters impacted by de facto and indirect potable reuse activities. *Sci Total Environ*. 2020 Jun 20;722:137799. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137799>
- (7) Ballesté E, Demeter K, Masterson B, et al. Implementation and integration of microbial source tracking in a river watershed monitoring plan. *Sci Total Environ*. 2020 Sep 20;736:139573. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139573>
- (8) Holcomb DA, Knee J, Sumner T, et al. Human fecal contamination of water, soil, and surfaces in households sharing poor-quality sanitation facilities in Maputo, Mozambique. *Int J Hyg Environ Health*. 2020 May;226:113496. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2020.113496>
- (9) Brondani, G. Identificação das fontes de contaminação fecal nas águas superficiais do Rio Tejo (Dissertação de mestrado em Genética Molecular e Biomedicina, apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa, 2015)
- (10) Derose K, Roche L, Lile D, et al. Microbial Water Quality Conditions Associated with Livestock Grazing, Recreation, and Rural Residences in Mixed-Use Landscapes. *Sustainability*. 2020;12(12):5207. <https://doi.org/10.3390/su12125207>
- (11) Unno T, Staley C, Brown CM, et al. Fecal pollution: new trends and challenges in microbial source tracking using next-generation sequencing. *Environ Microbiol*. 2018 Sep;20(9):3132-3140. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14281>
- (12) García-Aljaro C, Blanch AR, Campos C, et al. Pathogens, faecal indicators and human-specific microbial source-tracking markers in sewage. *J Appl Microbiol*. 2019 Mar;126(3):701-717. <https://doi.org/10.1111/jam.14112>
- (13) Lee S, Suits M, Wituszynski D, et al. Residential urban stormwater runoff: A comprehensive profile of microbiome and antibiotic resistance. *Sci Total Environ*. 2020 Jun 25;723:138033. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138033>
- (14) Buma E. Identificação e distinção de fonte de poluição fecal na bacia hidrográfica ribeirão João Leite por metodologias moleculares (Dissertação de mestrado em medicina tropical e saúde pública, apresentada à Universidade Federal de Goiás, 2017)
- (15) United Nations. Water, Sanitation and Hygiene [Internet] (consult. 20/8/2020). <https://www.unwater.org/water-facts/water-sanitation-and-hygiene/>
- (16) Vadde KK, McCarthy AJ, Rong R, et al. Quantification of Microbial Source Tracking and Pathogenic Bacterial Markers in Water and Sediments of Tiaoxi River (Taihu Watershed). *Front Microbiol*. 2019 Apr 24;10:699. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00699>
- (17) Harwood VJ, Staley C, Badgley BD, et al. Microbial source tracking markers for detection of fecal contamination in environmental waters: relationships between pathogens and human health outcomes. *FEMS Microbiol Rev*. 2014 Jan;38(1):1-40. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12031>
- (18) Staley ZR, Boyd RJ, Shum P, et al. Microbial Source Tracking Using Quantitative and Digital PCR To Identify Sources of Fecal Contamination in Stormwater, River Water, and Beach Water in a Great Lakes Area of Concern. *Appl Environ Microbiol*. 2018 Oct 1;84(20):e01634-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01634-18>
- (19) Zhang Y, Wu R, Lin K, et al. Performance of host-associated genetic markers for microbial source tracking in China. *Water Res*. 2020 May 15;175:115670. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115670>
- (20) Field KG, Samadpour M. Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. *Water Res*. 2007 Aug;41(16):3517-38. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.056>
- (21) McKee BA, Molina M, Cyterski M, et al. Microbial source tracking (MST) in Chatahochee River National Recreation Area: Seasonal and precipitation trends in MST marker concentrations, and associations with E. coli levels, pathogenic marker presence, and land use. *Water Res*. 2020 Mar 15;171:115435. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115435>
- (22) Decreto-Lei n.º 113/2012 de 23 de maio. DR Série I n.º 100 (23/5/2012):2715-26. Procede à primeira alteração ao Decreto-Lei n.º 135/2009, de 3 de junho, que estabelece o regime de identificação, gestão, monitorização e classificação da qualidade das águas balneares. <https://data.dre.pt/eli/dec-lei/113/2012/05/23/p/dre/pt/html>
- (23) Diretiva 2006/7/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 15 de Fevereiro de 2006 relativa à gestão da qualidade das águas balneares e que revoga a Directiva 76/160/CEE. JO 4.3.2006: L 64/37-51. <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2006/7/oj>
- (24) Ahmed W, Gyawali P, Feng S, et al. Host Specificity and Sensitivity of Established and Novel Sewage-Associated Marker Genes in Human and Nonhuman Fecal Samples. *Appl Environ Microbiol*. 2019 Jul 1;85(14):e00641-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.00641-19>
- (25) Layton BA, Cao Y, Ebentier DL, et al. Performance of human fecal anaerobe-associated PCR-based assays in a multi-laboratory method evaluation study. *Water Res*. 2013 Nov 15;47(18):6897-908. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.05.060>
- (26) Stoeckel DM. Selection and application of microbial source tracking tools for water-quality investigations. Washington DC: US Geological Survey, 2005 (Techniques and Methods; 2-A3). https://pubs.usgs.gov/tm/2005/tm2a3/pdf/Book2_Collection%20of%20Environmental%20Data.pdf
- (27) Xue J, Feng Y. Comparison of microbial source tracking efficacy for detection of cattle fecal contamination by quantitative PCR. *Sci Total Environ*. 2019 Oct 10;686:1104-1112. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.091>
- (28) Cao Y, Raith MR, Griffith JF. Droplet digital PCR for simultaneous quantification of general and human-associated fecal indicators for water quality assessment. *Water Res*. 2015 Mar 1;70:337-49. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.12.008>



Análise de contaminantes inorgânicos em alimentos provenientes de áreas ardidas na região Centro de Portugal

Analysis of inorganic contaminants in food from burnt areas in Central Portugal

Sandra Gueifão^{1,2}, Catarina Sequeira¹, Mariana Ribeiro^{1,2}, Tiago Moreira¹, Marta Ventura¹, Inês Delgado^{1,2}, Andreia Rego^{1,2}, Inês Coelho^{1,2}, José Armando L. da Silva³, Isabel Castanheira¹

sandra.gueifao@insa.min-saude.pt

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

(2) Departamento de Engenharia Química, Instituto Superior Técnico, Lisboa, Portugal

(3) Centro de Química Estrutural, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

_Resumo

Portugal é um dos países europeus onde ocorre maior número de incêndios florestais e com a mais vasta área ardida. Os incêndios ocorridos em 2017, nos concelhos de Pedrógão Grande, Castanheira de Pera e Figueiró dos Vinhos, evidenciaram o enorme impacto destas catástrofes ambientais na saúde das populações, no seu bem-estar e no seu modo de vida. Este trabalho teve como objetivo a análise de seis elementos inorgânicos, nomeadamente bromo (Br), arsénio (As), níquel (Ni), cádmio (Cd), chumbo (Pb) e cromo (Cr), em amostras de couves, batatas e ovos provenientes de hortas familiares dos três concelhos afetados, em dois períodos de tempo diferentes, após a ocorrência dos incêndios. Os resultados deste estudo foram comparados com valores obtidos para os mesmos alimentos colhidos nas mesmas áreas, antes dos incêndios (amostra controlo de couves) e com valores referidos na literatura (batatas e ovos). Quando possível, e aplicável, os resultados foram também comparados com valores limite reportados na legislação em vigor. A determinação foi realizada por Espectrometria de Massa acoplada a Plasma Indutivo (ICP-MS). Os ensaios foram realizados mediante procedimentos analíticos em conformidade com a norma ISO 17025:2005. Os resultados mostraram que as amostras de couves, colhidas após os incêndios, e a amostra controlo apresentam diferenças significativas no As, Ni, Cd, Cr e Br. Relativamente ao Pb, não foram encontradas diferenças significativas entre as amostras das duas colheitas e a amostra de controlo. Por outro lado, os elementos analisados apresentam valores abaixo dos referidos na literatura e/ou na legislação em vigor, para as três matrizes estudadas. No entanto, foram encontradas exceções para o As e Cr, nos ovos, e para o As, nas batatas da 2ª colheita, em que os valores encontrados estão acima dos referidos na literatura.

_Abstract

Portugal is one of the European countries with the highest number of forest fires and the largest burned area. In 2017, the fires in the municipalities of Pedrógão Grande, Castanheira de Pera and Figueiró dos Vinhos, showed the enormous impact of these environmental catastrophes on the health of the population, on their well-being and on their way of life. This work aimed to analyze six inorganic elements, namely bromine (Br), arsenic (As), nickel (Ni), cadmium (Cd), lead (Pb) and chromium (Cr), in samples of cabbages, potatoes and eggs from home gardens in the three

affected counties, in two different periods, after the fires occurred. The values obtained from this study were compared with values obtained for the same foods harvested in the same areas, before fires (cabbages) or with values reported in the literature (potatoes and eggs). When possible, and applicable, the results were also compared with limit values reported in the legislation. The determination was performed by Mass Spectrometry coupled to Inductive Plasma (ICP-MS). The tests were performed using analytical procedures in accordance with the ISO 17025: 2005 standard. The results showed that the cabbage samples, collected after the fires, and the control sample present significant differences in As, Ni, Cd, Cr and Br. Regarding Pb, there were no significant differences between the samples from the two harvests and the control sample. On the other hand, results showed that the analyzed elements present values below those mentioned in the literature and/or in the legislation in force, for the three matrices studied. However, exceptions were found for As and Cr in eggs and As in potatoes from the 2nd harvest, in which the values found are above those reported in the literature.

_Introdução

Os incêndios florestais são fenómenos que constituem um problema ambiental com impactos adversos e diversificados nos ecossistemas atmosférico, terrestre e aquático, com repercussões económicas e sociais, e significativo impacto na flora (1). Durante os incêndios florestais são libertados diferentes compostos químicos para a atmosfera, resultantes da queima da madeira e da vegetação.

Segundo a Direção-Geral da Saúde, o fumo resultante dos incêndios florestais possui altos níveis de partículas e toxinas que podem causar doenças cancerígenas, respiratórias, oftalmológicas, cardiovasculares, neurológicas, diabetes,



hipertensão, lesões de pele entre outras, sendo as partículas suspensas, com contaminantes, os principais poluentes com impacto direto na saúde (2).

Por outro lado, os incêndios florestais podem desempenhar um papel importante na distribuição ambiental dos elementos traço, inclusive por meio da sua mobilização por transporte associado de solo e partículas de cinza (1).

Além disso, foram encontrados incêndios florestais que liberam e depositam contaminantes na superfície do solo, seja diretamente pela combustão da vegetação e mineralização da matéria orgânica do solo, seja indiretamente por meio de interações de cinzas (3). Esse facto pode levar à adição de quantidades potencialmente significativas desses elementos ao solo e, com isso, alterar as propriedades químicas iniciais do mesmo.

_Objetivo

Este trabalho, desenvolvido no âmbito do projeto Contaminantes químicos provenientes dos fogos florestais com impacto nos alimentos da região (CONFFIAR), teve como objetivo avaliar o teor de elementos inorgânicos (bromo (Br), arsénio (As), níquel (Ni), cádmio (Cd), chumbo (Pb) e cromo (Cr)) em amostras de couves, batatas e ovos recolhidas em dois períodos de tempo diferentes (agosto e dezembro de 2017), após a ocorrência de incêndios florestais.

_Materiais e métodos

O plano de amostragem concebido para a colheita de alimentos do projeto CONFFIAR teve no total seis campanhas de colheita de amostras que decorreram entre 2017 e 2019. Neste trabalho apresentam-se os resultados das duas primeiras campanhas de colheita realizadas em agosto e dezembro de 2017.

A colheita de alimentos foi realizada em oito hortas familiares distribuídas por três municípios (Pedrógão Grande, Castanheira de Pera e Figueiró dos Vinhos), tendo sido recolhidos três alimentos por produtor. Para ter representatividade de amostras, recolheram-se três amostras por alimento que, após homogeneização, constituíram uma *pool*. No total foram

preparadas para análise 48 *pools* em dois períodos de tempo diferentes (agosto e dezembro de 2017). Os alimentos escolhidos neste estudo foram couves, batatas e ovos. A preparação das amostras consistiu, previamente, na cozedura das batatas e ovos, enquanto que as couves não sofreram tratamento culinário. Posteriormente, todas as amostras foram liofilizadas antes de serem analisadas.

Como amostra controlo, utilizou-se para a matriz couves uma amostra composta por várias subamostras, provenientes das zonas ardidas em estudo, e recolhidas antes dos incêndios. Para as matrizes ovos e batatas não existiam amostras recolhidas antes dos incêndios. Assim, optou-se por comparar os valores obtidos para as amostras em estudo com valores reportados na literatura e na legislação em vigor.

Os elementos Br, As, Ni, Cd, Pb e Cr foram determinados por espectrometria de massa com plasma indutivo acoplado (ICP-MS). Previamente, as amostras sofreram uma digestão ácida (As, Ni, Cd, Pb e Cr) ou digestão básica (Br) em bloco de aquecimento de grafite com um programa de tempo e temperatura validados (4,5).

Os resultados foram obtidos através de procedimentos analíticos que refletiram os requisitos de garantia da qualidade, descritos na norma ISO 17025:2005 (6). A concentração foi expressa em $\mu\text{g}/\text{kg}$ ou mg/kg .

O tratamento estatístico foi realizado utilizando o *software* SPSS. As diferenças entre as amostras das duas colheitas e a amostra controlo foram verificadas com a análise ANOVA e o teste da menor diferença significativa (LSD) com um nível de significância igual a 5% ($\alpha=0,05$). Foi também realizada a análise descritiva para validar a tendência verificada entre colheitas (tabela 2).

_Resultados e discussão

Os resultados analíticos obtidos encontram-se apresentados na tabela 1.

Arsénio

Os teores de As nas amostras de couves tiveram um coeficiente de variação (CV%) de 37% na 1ª colheita e 32% na 2ª colheita, sendo a média dos valores obtidos na 2ª colheita



Tabela 1: ▾ Variação da concentração média de As, Ni, Cd, Pb e Cr em $\mu\text{g}/\text{kg}$ e Br em mg/kg em a) Couves, b) Ovos e c) Batatas.

a)

Amostra		Couves					
Produtor	Colheita	As ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Ni ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Cd ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Pb ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Cr ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Br (mg/kg)
A	1	28,4 ± 6,6	156 ± 28	20,3 ± 4,2	5,9 ± 1,3	42,3 ± 8,4	12,8 ± 3,2
B	1	48 ± 11	88 ± 16	9,3 ± 1,9	<LQ (5)	6,3 ± 1,2	3,2 ± 0,8
C	1	48 ± 11	126 ± 22	11,2 ± 2,3	4,5 ± 1,0	40,0 ± 7,9	2,73 ± 0,68
D	1	26,7 ± 6,2	82 ± 15	2,71 ± 0,56	<LQ (5)	44,5 ± 8,8	7,3 ± 1,8
E	1	23,7 ± 5,5	132 ± 23	23,1 ± 4,8	<LQ (5)	33,7 ± 6,7	2,65 ± 0,67
F	1	36,1 ± 8,4	171 ± 30	23,5 ± 4,8	<LQ (5)	33,7 ± 6,7	3,07 ± 0,77
G	1	15,4 ± 3,6	109 ± 19	6,9 ± 1,4	4,27 ± 0,96	60 ± 12	3,27 ± 0,82
H	1	24,8 ± 5,8	104 ± 18	9,7 ± 2,0	<LQ (5)	43,0 ± 8,5	3,62 ± 0,91
A	2	60 ± 14	64 ± 11	16,4 ± 3,4	3,78 ± 0,85	27,8 ± 5,5	4,6 ± 1,2
B	2	77 ± 18	69 ± 12	5,8 ± 1,2	13,2 ± 3,0	32,0 ± 6,3	6,9 ± 1,7
C	2	69 ± 16	107 ± 19	8,1 ± 1,7	<LQ (5)	26,7 ± 5,3	2,88 ± 0,72
D	2	25,6 ± 6,0	70 ± 12	11,9 ± 2,5	<LQ (5)	21,6 ± 4,3	1,76 ± 0,44
E	2	49 ± 11	100 ± 18	45,7 ± 9,4	4,01 ± 0,90	24,4 ± 4,8	3,38 ± 0,85
F	2	49 ± 12	121 ± 21	14,9 ± 3,1	<LQ (5)	24,2 ± 4,8	2,29 ± 0,57
G	2	36,3 ± 8,5	53,8 ± 9,5	2,94 ± 0,61	<LQ (5)	28,5 ± 5,6	5,4 ± 1,4
H	2	55 ± 13	68 ± 12	4,32 ± 0,89	<LQ (5)	28,0 ± 5,5	4,6 ± 1,1
Amostra controle		<LQ (3)	<LQ (5)	5,3 ± 1,1	<LQ (5)	22,7 ± 4,5	0,51 ± 0,13

b)

Amostra		Ovos					
Produtor	Colheita	As ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Ni ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Cd ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Pb ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Cr ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Br (mg/kg)
A	1	12,3 ± 2,0	12,3 ± 1,9	<LQ (3)	<LQ (6)	66 ± 21	4,4 ± 1,3
B	1	15,8 ± 2,6	<LQ (6)	<LQ (3)	13,0 ± 3,5	63 ± 20	4,3 ± 1,3
C	1	15,0 ± 2,5	<LQ (6)	<LQ (3)	<LQ (6)	65 ± 21	2,19 ± 0,68
D	1	15,1 ± 2,5	7,3 ± 1,1	<LQ (3)	<LQ (6)	56 ± 18	2,9 ± 1,0
E	1	9,3 ± 1,5	8,8 ± 1,4	<LQ (3)	<LQ (6)	60 ± 19	2,9 ± 1,0
F	1	12,8 ± 2,1	7,4 ± 1,2	<LQ (3)	<LQ (6)	63 ± 20	<LQ (0,05)
G	1	5,96 ± 0,98	7,3 ± 1,1	<LQ (3)	<LQ (6)	55 ± 18	3,8 ± 1,2
H	1	14,0 ± 2,3	5,9 ± 1,0	<LQ (3)	<LQ (6)	55 ± 17	3,8 ± 1,2
A	2	15,9 ± 2,6	11,4 ± 1,8	<LQ (3)	<LQ (6)	60 ± 19	3,9 ± 1,2
B	2	15,7 ± 2,6	12,7 ± 2,0	<LQ (3)	30,2 ± 8,1	66 ± 21	4,2 ± 1,3
C	2	14,9 ± 2,4	12,1 ± 1,9	<LQ (3)	<LQ (6)	60 ± 19	2,41 ± 0,74
D	2	52,4 ± 8,6	7,3 ± 1,1	<LQ (3)	<LQ (6)	57 ± 18	4,1 ± 1,3
E	2	15,7 ± 2,6	10,4 ± 1,6	<LQ (3)	<LQ (6)	69 ± 22	3,2 ± 1,0
F	2	16,7 ± 2,7	12,5 ± 1,9	<LQ (3)	<LQ (6)	77 ± 24	3,1 ± 1,0
G	2	19,6 ± 3,2	13,9 ± 2,2	<LQ (3)	<LQ (6)	75 ± 24	4,8 ± 1,5
H	2	16,8 ± 2,7	10,1 ± 1,6	<LQ (3)	<LQ (6)	70 ± 22	3,3 ± 1,0

c)

Amostra		Batatas				
Produtor	Colheita	As ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Ni ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Cd ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Pb ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Cr ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
A	1	2,77 ± 0,65	53,4 ± 9,4	10,4 ± 2,1	<LQ(4)	52 ± 10
B	1	2,25 ± 0,52	32,3 ± 5,7	15,8 ± 3,3	<LQ(4)	41,4 ± 8,2
C	1	<LQ(2)	42,6 ± 7,5	13,4 ± 2,8	<LQ(4)	30,4 ± 6,0
D	1	<LQ(2)	103 ± 18	11,5 ± 2,4	<LQ(4)	27,1 ± 5,4
E	1	2,41 ± 0,56	27,3 ± 4,8	17,5 ± 3,6	4,4 ± 1,0	32,5 ± 6,4
F	1	5,1 ± 1,2	42,8 ± 7,6	14,9 ± 3,1	<LQ(4)	34,8 ± 6,9
G	1	2,13 ± 0,50	66 ± 12	13,2 ± 2,7	5,0 ± 1,1	38,3 ± 7,6
H	1	2,55 ± 0,60	61 ± 11	11,1 ± 2,3	<LQ(4)	27,9 ± 5,5
A	2	15,3 ± 3,6	17,6 ± 3,1	12,0 ± 2,5	15,7 ± 3,5	37,7 ± 7,5
B	2	32,0 ± 7,5	47,1 ± 8,3	17,7 ± 3,6	7,8 ± 1,7	52 ± 10
C	2	20,6 ± 4,8	18,3 ± 3,2	17,6 ± 3,6	17,5 ± 3,9	20,6 ± 4,1
D	2	19,4 ± 4,5	136 ± 24	13,5 ± 2,8	<LQ(4)	28,2 ± 5,6
E	2	28,8 ± 6,7	36,3 ± 6,4	16,6 ± 3,4	13,0 ± 2,9	37,1 ± 7,3
F	2	23,1 ± 5,4	101 ± 18	21,6 ± 4,5	5,2 ± 1,2	34,0 ± 6,7
G	2	21,9 ± 5,1	21,0 ± 3,7	13,8 ± 2,8	28,4 ± 6,4	33,6 ± 6,6
H	2	17,8 ± 4,2	39,0 ± 6,9	18,9 ± 3,9	<LQ(4)	34,8 ± 6,9

LQ – Limite de quantificação



Tabela 2: ↘ Variação da concentração média de As, Ni, Cd, Pb e Cr em µg/kg e Br em mg/kg em a) Couves, b) Ovos e c) Batatas, observada entre colheitas.

Elementos	Couves	Ovos	Batatas
As	↗	↗	↗
Ni	↘	↗	≈
Cd	≈	≈	↗
Pb	≈	↗	↗
Cr	↘	↗	≈
Br	≈	≈	X

↗ aumentou; ↘ diminuiu; ≈ não foram encontradas diferenças significativas entre colheitas de acordo com o teste LSD (p -value (p)>0,05); X sem resultado

superior à média da 1ª colheita (tabela 2). Os teores de As obtidos para as amostras de couves recolhidas, em ambas as colheitas, são significativamente superiores aos obtidos para a amostra controlo e estatisticamente diferentes entre si.

Para os ovos, o CV% de As foi de 27% na 1ª colheita e 61% na 2ª colheita, apresentando diferenças significativas entre produtores em ambas as colheitas. Comparando com a literatura, os valores encontrados estão acima dos reportados (cerca de 9µg/kg) (7).

Apesar de terem sido encontrados, para todas as matrizes em estudo, teores de As significativamente superiores aos reportados na literatura (ovos e batatas) e amostra controlo (couves), nenhum dos valores obtidos se encontra acima do valor máximo legislado para arroz (único alimento com valores máximos admissíveis legislados, pelo Regulamento (EU) 2015/1006) enquanto alimento para crianças (100µg/kg) (8).

Níquel

Quanto ao Ni, e relativamente às amostras de couves, o CV% foi de 26% na 1ª colheita e 30% na 2ª colheita. Segundo o teste LSD, os resultados de Ni das amostras recolhidas nas áreas ardidas encontram-se acima do valor encontrado para uma amostra controlo de couves, em ambas as colheitas. Segundo o teste LSD, as amostras controlo de couves são estatisticamente diferentes das amostras recolhidas nas áreas ardidas.

Em relação às amostras de ovos, verifica-se um CV% de 27% na 1ª colheita e 18% na 2ª colheita havendo um aumento na concentração média deste elemento da 1ª para a 2ª colheita (tabela 2), verificando-se assim que apresenta diferenças significativas entre produtores. Todos os resultados obtidos são inferiores ao valor encontrado na literatura (38 µg/kg) (9).

Por outro lado, as amostras de batatas apresentaram um CV% de 45% na 1ª colheita e 83% na 2ª colheita. Todos os valores de Ni obtidos nas amostras em estudo são inferiores ao valor encontrado na literatura (260µg/kg) (9).

Cádmio

O CV% do teor de Cd nas amostras de couves foi de 59% na 1ª colheita e 100% na 2ª colheita. Na sua maioria, os resultados obtidos para as amostras recolhidas encontram-se acima do valor encontrado para uma amostra controlo de couves, encontrando-se, no entanto, todos abaixo do limite legal de 200µg/kg, estipulado para este contaminante (11) para o grupo dos produtos hortícolas de folha. Segundo o teste LSD, a amostra controlo de couves apresenta diferenças significativas deste elemento quando comparada com as amostras em estudo.

Quanto às amostras de ovos, os valores de Cd foram inferiores ao LQ (3µg/kg) em todas as amostras. Estes valores são inferiores aos reportados na literatura (18 µg/kg) (10).

Nas amostras de batatas, o CV% foi de 18% na 1ª colheita e 19% na 2ª colheita. Todos os valores estão abaixo do valor encontrado na literatura (211µg/kg) (10) bem como do limite máximo de 100µg/kg estipulado no Regulamento n.º 488/2014 para o grupo das raízes e tubérculos (11).

Chumbo

No que respeita à concentração de Pb nas amostras de couves, o valor mais alto foi encontrado no local B, na 2ª colheita, com 13µg/kg. Na maioria dos locais, o teor de Pb encontrado foi sempre inferior ao LQ. Apesar de alguns valores encontrados para as amostras das duas colheitas serem superiores aos obtidos para a amostra controlo, estes são muito inferiores ao legislado para o grupo dos produtos hortícolas de folha (300µg/kg) (11). Segundo o teste LSD, as amostras das áreas ardidas e a amostra controlo de couves não apresentam diferenças significativas entre si.



Quanto à matriz ovos, os teores de Pb apenas apresentaram valores quantificáveis no caso do produtor B (1ª e 2ª colheitas), todos os restantes apresentaram-se abaixo do LQ. Os valores determinados são inferiores aos encontrados na literatura (205µg/kg) (12).

Em relação às amostras de batatas, foram encontrados teores quantificáveis na 1ª colheita apenas para os produtores E e G. Por outro lado, na 2ª colheita, apenas dois locais, D e H, apresentaram valores de Pb inferiores ao LQ. O CV% do teor deste elemento foi de 9% na 1ª colheita e 56% na 2ª colheita. Os resultados obtidos são inferiores ao valor encontrado na literatura (223µg/kg) (12) e aos teores máximos estabelecidos pelo Regulamento n.º 1881/2006 para o grupo das raízes e tubérculos (100µg/kg) (13).

Cromo

Relativamente ao teor de Cr, o CV% nas amostras de couves foi de 40% na 1ª colheita e 12% na 2ª colheita. A maioria dos teores de Cr obtidos para as amostras recolhidas nas duas colheitas encontram-se ligeiramente acima do valor obtido para uma amostra controlo de couves. Segundo o teste LSD, as amostras controlo apresentam diferenças significativas deste elemento quando comparadas com as amostras de couves da 1ª colheita.

No que diz respeito às amostras de ovos, verifica-se um CV% de 8% na 1ª colheita e 11% na 2ª colheita. Todos os teores de Cr obtidos para as amostras recolhidas em ambas as colheitas são superiores ao valor encontrado na literatura (30µg/kg) (14). Por outro lado, este elemento apresenta diferenças significativas entre produtores nas duas colheitas.

Nas amostras de batatas, o CV% encontrado foi de 23% na 1ª colheita e de 26% na 2ª colheita. Para este elemento verificou-se que não existem diferenças significativas entre produtores de ambas as colheitas. Todos os teores de Cr obtidos para as amostras recolhidas nas duas colheitas encontram-se abaixo do valor encontrado na literatura (70µg/kg) (14).

Bromo

No que respeita ao teor de Br, as amostras de couves obtiveram um CV% de 74% na 1ª colheita e 43% na 2ª colheita. Todos os locais da 1ª e 2ª colheitas apresentaram teores superiores ao valor obtido para uma amostra controlo de couves. Segundo o teste LSD, as amostras controlo apresentaram diferenças significativas deste elemento quando comparadas com as amostras da 1ª colheita das áreas ardidas.

Relativamente às amostras de ovos, este elemento apresentou um CV% de 24% na 1ª colheita e 21% na 2ª colheita. Os valores encontrados para Br não apresentam diferenças significativas entre produtores.

No que respeita aos resultados das amostras em estudo dos ovos, batatas e couves, estes são todos inferiores ao valor encontrado na literatura (15).

_Conclusões

Sendo este estudo pioneiro, conclui-se que as amostras de couves após os incêndios e a amostra controlo apresentam diferenças significativas nos níveis de As, Ni, Cd, Cr e Br. Relativamente ao Pb, não existem diferenças significativas entre as amostras das duas colheitas e a amostra de controlo.

Para as matrizes ovos e batatas, conclui-se que, com exceção do As e Cr nos ovos e As na 2ª colheita das batatas, todos os elementos inorgânicos apresentam valores abaixo da literatura.

Apesar da dificuldade em tirar conclusões definitivas, os resultados apresentados sugerem que os teores de As, Cr, Ni e o Br aumentaram em alguns dos alimentos em estudo como consequência dos incêndios. No entanto os elementos analisados apresentam, em geral, valores abaixo dos referidos na literatura e/ou na legislação em vigor para as três matrizes estudadas.

Os resultados agora publicados serão complementados pelos resultados das restantes quatro campanhas que irão ser apresentados brevemente, os quais permitirão esclarecer com mais clareza as tendências verificadas neste trabalho.



Agradecimento:

Os autores gostariam de fazer um agradecimento especial à ARS Centro pela cooperação no projeto, nomeadamente no plano de amostragem e na colheita das amostras selecionadas.

Financiamento:

Este trabalho foi financiado pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, no âmbito do projeto CONFFIAR (2019DAN1611).

Referências bibliográficas:

- (1) Campos I, Abrantes N, Keizer JJ, et al. Major and trace elements in soils and ashes of eucalypt and pine forest plantations in Portugal following a wildfire. *Sci Total Environ*. 2016 Dec 1;572:1363-76. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.190>
- (2) Centro de Emergências em Saúde Pública-Direção-Geral da Saúde. Impacte na Saúde da inalação de fumo resultante de incêndios florestais. 2016. (consult. 30/9/2018). https://www.dgs.pt/ficheiros-de-upload-2013/calor_impacte-na-saude-da-inalacao-de-fumo-resultante-de-incendios-florestais-pdf.aspx
- (3) Zavala LM, De Celis R, Jordán A. How wildfires affect soil properties: a brief review. *Cuad. Investig. Geográfica*. 2014;40(2):311-31. <https://publicaciones.unirioja.es/ojs/index.php/cig/article/view/2522>
- (4) Coelho I, Gueifão S, Matos AS, et al. Experimental approaches for the estimation of uncertainty in analysis of trace inorganic contaminants in foodstuffs by ICP-MS. *Food Chem*. 2013 Nov 1;141(1):604-11. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.040>
- (5) Ventura M, Cardoso C, Bandarra NM, et al. Bromine, arsenic, cadmium, and lead in several key food groups: an assessment of relative risk. *Int J Environ Anal Chem*. 2018;98(15):1398-1412. <https://doi.org/10.1080/03067319.2018.1559307>
- (6) ISO/IEC 17025:2005 – General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
- (7) European Food Safety Authority. Dietary exposure to inorganic arsenic in the European population. *EFSA J*. 2014;12(3):3597. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3597>
- (8) Regulamento (UE) 2015/1006 da Comissão de 25 de junho de 2015, que altera o Regulamento (CE) n.º 1881/2006 no que diz respeito aos teores máximos de arsénio na forma inorgânica nos géneros alimentícios. JO 26.6.2015: L 161/14-16. <http://data.europa.eu/eli/reg/2015/1006/oj>
- (9) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of nickel in food and drinking water. *EFSA J*. 2015;13(2):4002. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4002>
- (10) European Food Safety Authority (EFSA). Cadmium in food - Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *EFSA J*. 2009;7(3):980. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.980>
- (11) Regulamento (UE) n.º 488/2014 da Comissão, de 12 de maio de 2014, que altera o Regulamento (CE) n.º 1881/2006 no que diz respeito aos teores máximos de cádmio nos géneros alimentícios. JO. 13.5.2014:L 138/75-79. <http://data.europa.eu/eli/reg/2014/488/oj>
- (12) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific Opinion on Lead in Food. *EFSA J*. 2010;8(4):1570. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1570>
- (13) Regulamento (CE) n.º 1881/2006 da Comissão de 19 de dezembro de 2006, que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. JO 20.12.2006:L 364/5-24. <http://data.europa.eu/eli/reg/2006/1881/oj>
- (14) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of chromium in food and drinking water. *EFSA J*. 2014;12(3):3595. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3595>
- (15) Fernandes AR, Mortimer D, Rose M, et al. Bromine content and brominated flame retardants in food and animal feed from the UK. *Chemosphere*. 2016 May;150:472-78. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.12.042>



Teor de sal em sopas prontas para consumo disponíveis em Portugal: comparação entre 2018 e 2019

Salt content in ready to eat soups available in Portugal: comparison between 2018 and 2019

Paulo Fernandes, Andreia Lopes, Roberto Brazão, M. Graça Dias

paulo.fernandes@insa.min-saude.pt

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

_Resumo

Sendo reconhecida a associação entre o consumo excessivo de alguns nutrientes ou componentes alimentares, como o açúcar e o sal, e o desenvolvimento de doenças crónicas, foi aprovada em Portugal, em 2017, a Estratégia Integrada para a Promoção da Alimentação Saudável (EIPAS), assente na promoção de um padrão de alimentação saudável que, entre outros objetivos, pretende uma redução progressiva do consumo diário de sal por parte da população em geral, para 5g por dia, por indivíduo, em 2020. Enquadrada na sua missão de contribuir para os ganhos em saúde pública, o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, através do seu Departamento de Alimentação e Nutrição, realiza a monitorização dos dados relativos aos géneros alimentícios presentes no mercado português, nomeadamente os referentes à composição nutricional. Os dados utilizados neste trabalho foram recolhidos durante os anos de 2018 e 2019 nas lojas *online* de hipermercados presentes em Portugal e referem-se fundamentalmente ao teor de sal de sopas prontas para consumo. As medianas de valores do teor de sal encontrados para as 86 sopas consideradas foram de 0,62g/100g para 2018 e de 0,60g/100g para o 2019. Comparando os valores obtidos com os valores preconizados na EIPAS, 100% das sopas estavam rotuladas com teores de sal superiores aos desejáveis 0,2g/100g.

_Abstract

The association between the excessive consumption of some nutrients or food components, such as sugar and salt, and the development of chronic diseases is recognized, therefore the Integrated Strategy for the Promotion of Healthy Eating (EIPAS) was created, based on the promotion of healthy eating habits that aims at a progressive reduction in the daily salt consumption by the general population, to 5 g per day, per individual, in 2020. Pursuing its mission to contribute to public health gains, the National Institute of Health Doutor Ricardo Jorge, through its Department of Food and Nutrition, monitors data related to foodstuffs present in the national market. The data used in this work were collected during the years 2018 and 2019 in the main supermarket online stores present in Portugal, and are fundamentally directed for the salt content of soups ready for consumption. The median values for the salt content of the 86 soups considered were 0.62g/100g for 2018 and 0.60g/100g for 2019. Comparing the obtained values with the recommended values in EIPAS, 100% of the soups were labeled with salt levels higher than the desirable 0.2g/100g.

_Introdução

Os resultados obtidos pelo Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física, 2015-2016 (IAN-AF) reportam um consumo médio nacional, por pessoa, de 7,4g de sal por dia. Aproximadamente, 3,7 milhões de mulheres (63,2%) e 4,4 milhões de homens (88,9%) apresentam uma ingestão de sódio acima do nível máximo tolerado (2300mg/dia) ⁽¹⁾.

Para a promoção da saúde, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reforça que adultos que pratiquem uma dieta rica em frutos e cereais e pobre em gorduras, açúcar e sal apresentam menor risco de desenvolver uma ou mais doenças cardiovasculares e certos tipos de cancro ⁽²⁾.

Assim, no contexto português, a Estratégia Integrada para a Alimentação Saudável (EIPAS), em vigor desde 30 de dezembro de 2017, incentiva a reformulação dos géneros alimentícios presentes no mercado nacional, com o objetivo de reduzir o consumo de alguns componentes alimentares, nomeadamente açúcar e sal. Esta Estratégia estabelece teores máximos de sal de 0,2g/100g para sopas e pratos principais e de 0,3g/100g para os restantes alimentos ⁽³⁾.

_Objetivos

Monitorizar os componentes energia, lípidos e ácidos gordos saturados e sal de sopas pré-embaladas, vendidas em superfícies comerciais como prontas para consumo, no ano 2019. Avaliar a evolução no teor de sal em relação à recolha de dados do ano de 2018, tendo em consideração as metas preconizadas pela Estratégia Integrada para a Alimentação Saudável.



_Materiais e métodos

Procedeu-se à recolha do teor de sal de géneros alimentícios correspondentes à categoria alimentar de sopa pré-embalada pronta para consumo, no ano de 2018. Durante o ano de 2019 foi feita a recolha da energia, teores de lípidos e ácidos gordos saturados, para além do teor de sal, da mesma categoria de alimentos, como suporte para trabalhos posteriores.

Esta recolha de dados foi efetuada através da consulta da informação constante dos rótulos disponibilizados por duas cadeias de supermercados a operar no mercado português nas respetivas lojas *online*. Foram considerados todos os produtos pertencentes à categoria em estudo, independentemente do seu país de proveniência.

Os valores obtidos foram comparados com as recomendações apresentadas na EIPAS, de teor de sal de 0,2g/100g. Foi feita, também, uma comparação dos valores recolhidos em 2018 com os resultantes da recolha de 2019.

A monitorização da composição dos géneros alimentícios presentes no mercado português decorre das atribuições do Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge com vista a conhecer o ponto de situação da realidade nacional atual quanto a esta matéria, disponibilizando dados que poderão apoiar as autoridades de saúde na definição e avaliação das medidas de saúde pública, já implementadas ou a implementar, relacionadas com a alimentação.

_Resultados e discussão

Recolheram-se os dados de composição relativos ao teor de sal de 86 sopas pré-embaladas prontas para consumo, 40 durante o ano de 2018 e 46 durante 2019. O teor de sal variou entre 0,33 e 1,0g/100g em 2018 e entre 0,29 e 1,2g/100g em 2019. A média dos teores de sal foi de 0,65g/100g para 2018 e de 0,60g/100g para 2019 e as medianas de 0,62 e 0,60g/100g para 2018 e 2019, respetivamente.

Todos os produtos considerados, para os dois anos em estudo, na categoria sopas pré-embaladas, prontas para consumo, apresentaram teores de sal superiores à recomendação de 0,2g/100g, indicada na EIPAS (**tabela 1**, **gráfico 1**).

Para as sopas cujos dados foram recolhidos em 2019, os valores de energia variaram entre 16 e 233kcal/100g, com uma média de 47,0kcal/100g.

Observou-se que as três sopas com o teor de sal mais elevado foram as que apresentam também o maior valor de energia (**gráfico 2**).

Ainda relativamente à informação nutricional recolhida em 2019, para as sopas, obtiveram-se as medianas de 1,1g/100g para os lípidos totais e de 0,2g/100g para os ácidos gordos saturados (**tabela 2**).

Importa destacar que, para este trabalho, foram consideradas as informações relativas a todas as sopas pré-embaladas e prontas para consumo, disponíveis nas lojas *online* nos dois momentos de recolha de dados. Assim, não é possível verificar se os resultados obtidos se devem apenas à reformulação dos produtos ou se também se podem dever ao lançamento de novos produtos e à descontinuação de outros anteriormente presentes no mercado.

_Conclusões

Todas as sopas pré-embaladas, prontas para consumo, consideradas neste trabalho e disponíveis no mercado eletrónico das grandes superfícies em Portugal, nos anos de 2018 e 2019, apresentaram teores de sal superiores ao valor preconizado na EIPAS para este alimento, de 0,2g/100g. De facto, o teor mínimo de sal encontrado no conjunto dos dois anos foi de 0,29g/100g. Este valor excessivo face ao recomendado é ainda mais evidente considerando as medianas de 0,62g/100g para 2018 e de 0,60g/100g para 2019.

Embora a média do teor de sal nas sopas consideradas tenha sido ligeiramente inferior em 2019 face a 2018, o valor encontra-se ainda muito acima do valor recomendado na EIPAS que, para ser atingido necessitará ainda de uma redução de mais de 60%. Esta redução será um desafio contínuo para a indústria alimentar e será verificada em trabalhos posteriores, aquando do tratamento dos dados da composição das sopas nos próximos anos. A continuação da recolha desta informação permitirá identificar as tendências da evolução dos teores de sal em sopas, podendo os seus resultados ser



Tabela 1: Média, mediana, máximo e mínimo do teor de sal (g/100g), em sopas pré-embaladas, prontas para consumo, nos anos de 2018 e 2019.

	2018	2019
N	40	46
Máximo	1,0	1,2
Mínimo	0,33	0,29
Média	0,65	0,60
Mediana	0,62	0,60

Gráfico 1: Teor de sal em sopas pré-embaladas, prontas para consumo, nos anos de 2018 e 2019.

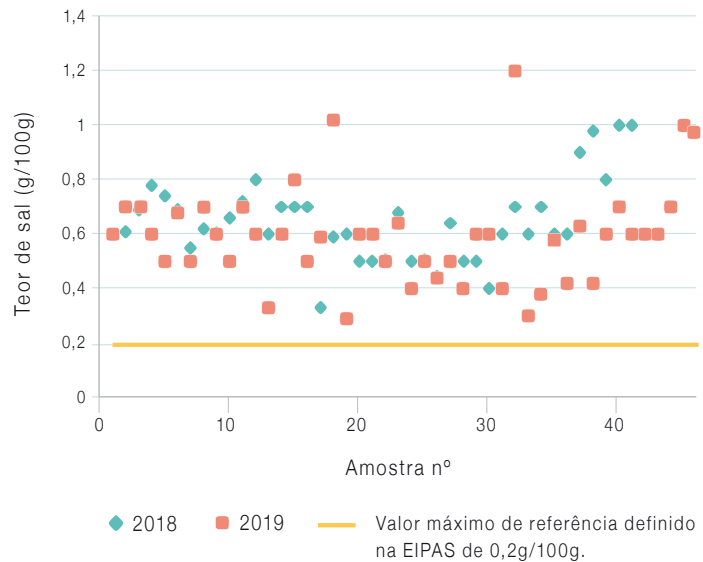
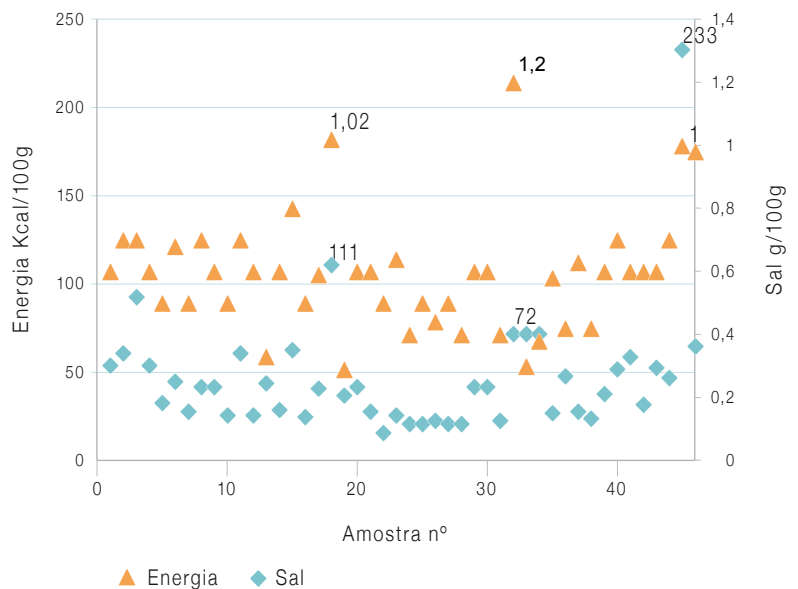


Tabela 2: Teores de lípidos e ácidos gordos saturados em sopas pré-embaladas, prontas para consumo, ano de 2019.

Sopas prontas para consumo (n=46)		
	Lípidos (g/100g)	Ácidos gordos saturados (g/100g)
Máximo	8,0	3,0
Mínimo	0,2	0,1
Média	1,9	0,2
Mediana	1,1	0,2

Gráfico 2: Energia e teor de sal em sopas pré-embaladas, prontas para consumo, ano de 2019.



utilizados para a reformulação das metas a serem atingidas e/ou os respetivos prazos.

A recolha dos valores referentes à energia, lípidos e ácidos gordos saturados, iniciada em 2019, poderá ser continuada nos anos subsequentes para um acompanhamento mais completo da evolução dos géneros alimentícios disponíveis no mercado nacional.

A monitorização apresentada neste trabalho foi efetuada com base nos dados disponíveis nas lojas *online*, de cadeias de distribuição a operar em Portugal, não tendo sido feita qualquer confirmação, dos mesmos, em loja. É importante que estes dados sejam mantidos atualizados, particularmente nesta fase de reformulação, em benefício dos consumidores.



Referências bibliográficas:

- (1) Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física – IAN-AF 2015-2016. Brochura de Resultados IAN-AF 2015-2016.
https://ian-af.up.pt/sites/default/files/IAN-AF%20Brochura%20de%20resultados_0.pdf
- (2) World Health Organization. Fact-sheets – Healthy Diet [Internet] [consult. 16/12/2020].
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/healthy-diet>
- (3) Despacho n.º 11418/2017. DR 2ª série de 2017-12-29, nº 249:29595-8. Aprova a Estratégia Integrada para a Promoção da Alimentação Saudável (EIPAS).
<https://dre.pt/pesquisa/-/search/114424591/details/normal?l=1>



Monitorização da energia e dos teores de açúcar e sal na categoria de alimentos batatas fritas e snacks: a realidade portuguesa em 2019

Monitoring energy, sugar and salt content in the food category chips and snacks: Portuguese reality in 2019

Andreia Lopes, Paulo Fernandes, Roberto Brazão, M. Graça Dias

andreia.lopes@insa.min-saude.pt

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

_Resumo

É mundialmente reconhecido que o consumo de açúcar e sal estão diretamente relacionados com o desenvolvimento de doenças crónicas, designadamente as doenças cardiovasculares, obesidade e diabetes. As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte em todo o mundo, tirando a vida a 17,7 milhões de pessoas anualmente, representando também uma das mais relevantes causas de morbilidade, com a consequente perda de anos de vida saudável. Neste contexto, para reduzir a prevalência de doenças não transmissíveis relacionadas com a alimentação, foi aprovada em Portugal a Estratégia Integrada para a Promoção da Alimentação Saudável (EIPAS), assente na promoção de um padrão de alimentação saudável que, entre outros objetivos, pretende uma redução progressiva do consumo diário de açúcar e de sal por parte da população em geral. O Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, na qualidade de parceiro estratégico na implementação da EIPAS e no âmbito da sua missão em contribuir para ganhos em saúde pública, monitoriza os dados relativos à composição nutricional dos géneros alimentícios disponíveis no mercado português. A recolha dos dados deste trabalho decorreu no ano de 2019 e é relativa ao valor energético e teores de açúcar e sal da categoria de alimentos batatas fritas e snacks. As medianas obtidas para as batatas fritas foram de 530kcal/100g para valor energético, 0,6g/100g para teor de açúcar e 1,3g/100g para teor de sal. Para os snacks observaram-se as medianas de 498kcal/100g para a energia, 5,0g/100g para o teor de açúcar e 1,5g/100g para o teor de sal.

_Abstract

It is worldwide recognized that sugar and salt consumption are directly related to the development of chronic diseases, namely cardiovascular diseases, obesity and diabetes. Cardiovascular diseases are the main cause of death worldwide, taking the life of 17.7 million people annually, also representing one of the most relevant causes of morbidity, with the consequent loss of years of healthy life. In this context, to reduce the prevalence of non-communicable diseases related to food, the Integrated Strategy for the Promotion of Healthy Eating (EIPAS) was approved in Portugal, based on the promotion of a healthy eating pattern that, among other objectives, aims at a progressive reduction in the daily consumption of sugar and salt by the general population. The National Institute of Health Dr Ricardo Jorge, as a strategic partner in the implementation of EIPAS, and within the scope of its mission to contribute to gains in public health, monitors data related to the nutritional composition of foodstuffs available in the Portuguese market. The data collection for this work took

place in 2019 and is related to the energy value, sugar and salt contents of the food category chips and snacks. The median obtained for chips were 530kcal/100g for energy, 0.6g/100g for sugar content and 1.3g/100g for salt content. For snacks, the median were 498kcal/100g for energy, 5.0g/100g for sugar content and 1.5g/100g for salt content.

_Introdução

Os resultados do Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física, 2015-2016 (IAN-AF) revelam que cerca de 5,9 milhões de portugueses (quase 6 em cada 10) têm excesso de peso (pré-obesidade e obesidade). Reportam um consumo médio nacional de açúcares simples de 84g/dia, dos quais 35g/dia correspondem a açúcares livres. Indicam ainda que, em média, os portugueses consomem 7,4g de sal por dia, sendo o maior contribuidor o sal de adição (29,2%). Aproximadamente 3,7 milhões de mulheres (63,2%) e 4,4 milhões de homens (88,9%) apresentam uma ingestão de sódio acima do nível máximo tolerado (2300mg/dia).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que o consumo de açúcares livres deve ser inferior a 10% do nosso consumo energético total (equivalente a 50g/dia) e, idealmente, abaixo dos 5%, para se obter maiores ganhos em saúde. Para o consumo de sal as recomendações são de 5g por dia para um adulto (1 colher de chá rasa) e 3g diárias para as crianças. Estes valores incluem não só o sal acrescentado aos alimentos, como o que faz parte da sua composição, na totalidade de todas as refeições realizadas ao longo de um dia. Para promover a saúde, a mesma organização enfatiza a prática de uma dieta rica em frutos e cereais e pobre em gorduras, açúcar e sal, por representar um menor risco de desenvolvimento de uma ou mais doenças cardiovasculares e certos tipos de cancro ⁽³⁾.



Em Portugal, segundo dados da população portuguesa, se cada pessoa consumisse menos 2g de sal (800mg de sódio) por dia a taxa de acidente vascular cerebral (AVC) cairia entre 30 e 40% nos 5 anos seguintes, ou seja, em média, seriam menos 11.000 casos de AVC por ano ⁽⁴⁾.

De acordo com dados de consumo reportados pela Direção-Geral da Saúde (DGS), produtos alimentares como bolos, doces, bolachas, *snacks* salgados, pizzas, refrigerantes, néctares e bebidas alcoólicas, que não devem fazer parte da nossa alimentação diária, representam cerca de 21% do consumo total ⁽⁵⁾.

O EPACI Portugal 2012 (Estudo do Padrão Alimentar e de Crescimento Infantil), um estudo que caracterizou uma amostra representativa nacional composta por mais de 2200 crianças, com idades compreendidas entre os 12 e os 36 meses, permitiu caracterizar a alimentação das crianças portuguesas nos primeiros anos de vida. Foi identificado que, mesmo neste grupo etário o consumo de *snacks*, doces e salgados era elevado, representando, em média, 5% do peso de alimentos ingeridos diariamente pelas crianças. Revelou ainda que 87,3% das crianças ingeriam sódio acima do limite superior tolerável, registando-se uma tendência crescente com a idade (83,5% para as crianças dos 12 aos 24 meses; 93,1% para as crianças dos 24 aos 36 meses) ⁽⁶⁾.

Neste contexto, foi criada em Portugal a Estratégia Integrada para a Alimentação Saudável (EIPAS), implementada desde 2017, embora com efeitos práticos a partir de 2018, que invoca um esforço integrado para a criação de ambientes promotores da saúde, pelo que incentiva a reformulação dos produtos no mercado. Assim, estabelece teores máximos de sal de 0,2g/100g para sopas e pratos principais e de 0,3g/100g para os restantes alimentos e teores máximos de açúcar de 5g/100g para alimentos sólidos ⁽⁷⁾.

_Objetivos

Monitorizar a energia e os teores de açúcar e sal na categoria de alimentos batatas fritas e *snacks* disponíveis no mercado português. Confrontar os valores obtidos, em 2019, para os teores de açúcar e sal com as metas preconizadas pela Estratégia Integrada para a Alimentação Saudável.

_Material e métodos


Procedeu-se à avaliação do valor energético e dos teores de açúcar e sal na categoria alimentar batatas fritas e *snacks*. A recolha de dados foi efetuada em 2019, através da consulta da informação constante dos rótulos disponibilizados no comércio eletrónico de duas das maiores cadeias de supermercados a operar no mercado português. Os valores obtidos foram comparados com as recomendações previstas na EIPAS: 5g/100g para o teor de açúcar e de 0,3g/100g para o teor de sal, sendo que no que respeita ao valor energético, a EIPAS não define limites.

Por esta categoria incluir alimentos com características diferentes e para melhor e mais clara representação dos valores, as batatas fritas e os *snacks* são apresentados separadamente.

_Resultados e discussão

Do total de 80 alimentos recolhidos para avaliação dos parâmetros energia, teor de açúcar e de sal na subcategoria batatas fritas, apenas 68 foram considerados, tendo os restantes sido eliminados em virtude de os valores para estes parâmetros não estarem simultaneamente disponíveis para o alimento. No caso dos *snacks*, e pela mesma razão, foram considerados 44, num total de 49 alimentos recolhidos.

Foram determinados os parâmetros estatísticos: média, mediana, máximo e mínimo dos teores de energia, açúcar e sal, para o conjunto das 68 amostras consideradas de batatas fritas, bem como para o total de 44 amostras consideradas, no caso dos *snacks* (tabelas 1-2).

Tabela 1:  Média, mediana, máximo e mínimo dos teores de energia, açúcar e sal, em batatas fritas, ano de 2019 (n=68).

	Energia (kcal/100g)	Açúcar (g/100g)	Sal (g/100g)
Média	521	1,7	1,2
Mediana	530	0,6	1,3
Máximo	591	20,0	2,3
Mínimo	409	0,0	0,1



Para a amostra de batatas fritas considerada (n=68), observou-se que a mediana para teor de açúcar nesta categoria corresponde a 0,6g/100g, cujo valor se encontra bastante abaixo da meta estabelecida na EIPAS para este parâmetro: 5g/100g. Em oposição, para o teor de sal observou-se uma mediana de 1,3g/100g, muito acima dos valores definidos na EIPAS: 0,3g/100g.

Ao observar o [gráfico 1](#), verificou-se que num total de 68 amostras, 64 cumpriam com as recomendações da EIPAS para teor de açúcar: 5g/100g, o que revela uma taxa de satisfação de 94%.

Da observação do [gráfico 2](#), no que respeita o teor de sal, e confrontando as 68 amostras consideradas com o limite estabelecido na EIPAS, verificou-se que apenas 4 cumprem com as recomendações: 0,3g/100g, o que revela uma taxa de satisfação de 6%.

Na subcategoria *snacks*, observou-se uma mediana para teor de açúcar de 5g/100g, coincidente com os valores definidos na EIPAS para este parâmetro.

Relativamente ao teor de sal, obteve-se uma mediana de 1,5g/100g, bastante acima do limite definido de 0,3g/100g de produto.

Gráfico 1: ⬇ Teor de açúcar em batatas fritas, ano de 2019 (n=68).

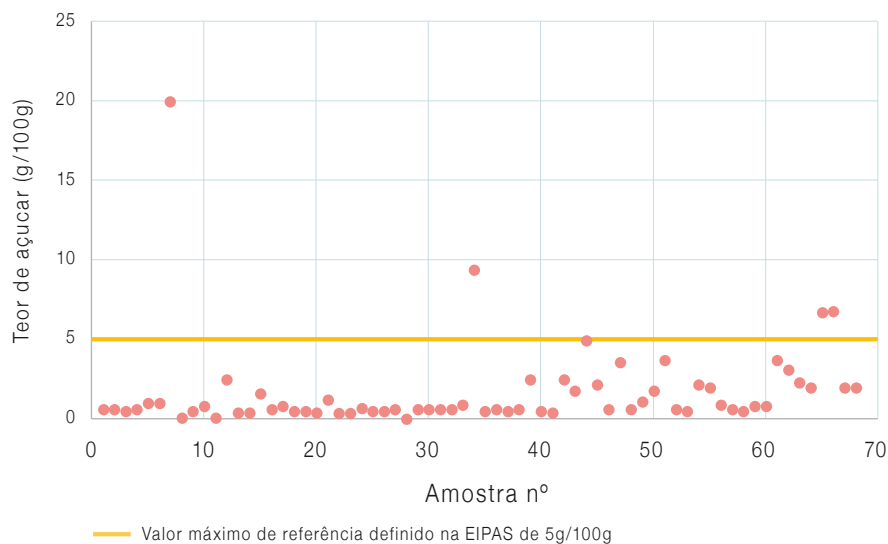


Gráfico 2: ⬇ Teor de sal em batatas fritas, ano de 2019 (n=68).

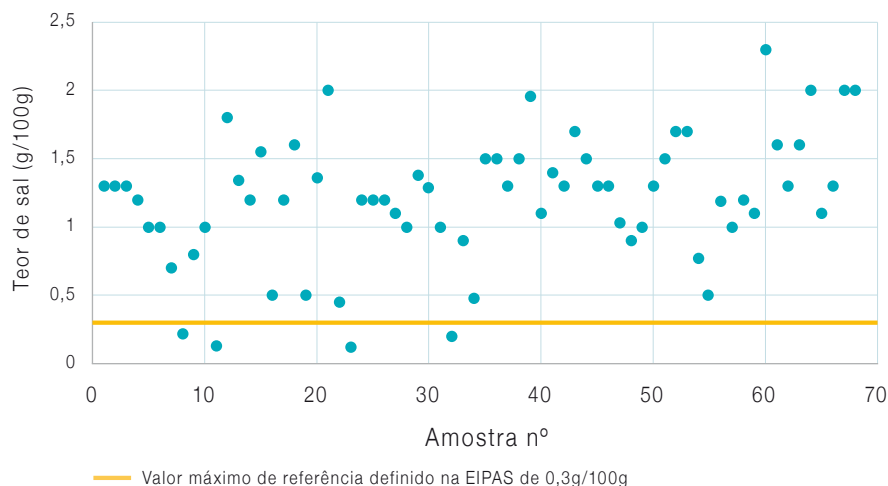




Tabela 2: Média, mediana, máximo e mínimo dos teores de energia, açúcar e sal, em *snacks*, ano de 2019 (n=44).

	Energia (kcal/100g)	Açúcar (g/100g)	Sal (g/100g)
Média	487	8,8	1,5
Mediana	498	5,0	1,5
Máximo	611	44,0	3,9
Mínimo	402	0,0	0,0

Num total de 44 amostras compiladas, representadas no gráfico 3, verificou-se que 23 cumpriam com os valores propostos na EIPAS para teor de açúcar: 5g/100g, o que se traduz numa taxa de satisfação de 52%.

No gráfico 4 encontram-se representados resultados para o teor de sal em *snacks*. Das 44 amostras consideradas apenas 5 cumpriam com as metas definidas na EIPAS: 0,3g/100g, observando-se uma taxa de satisfação de 11% para este parâmetro.

Gráfico 3: Teor de açúcar em *snacks*, ano de 2019 (n=44).

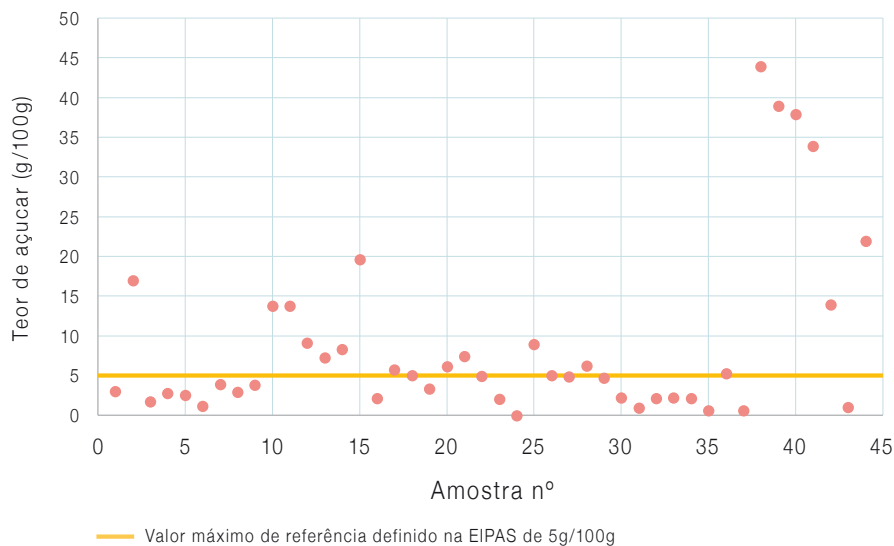
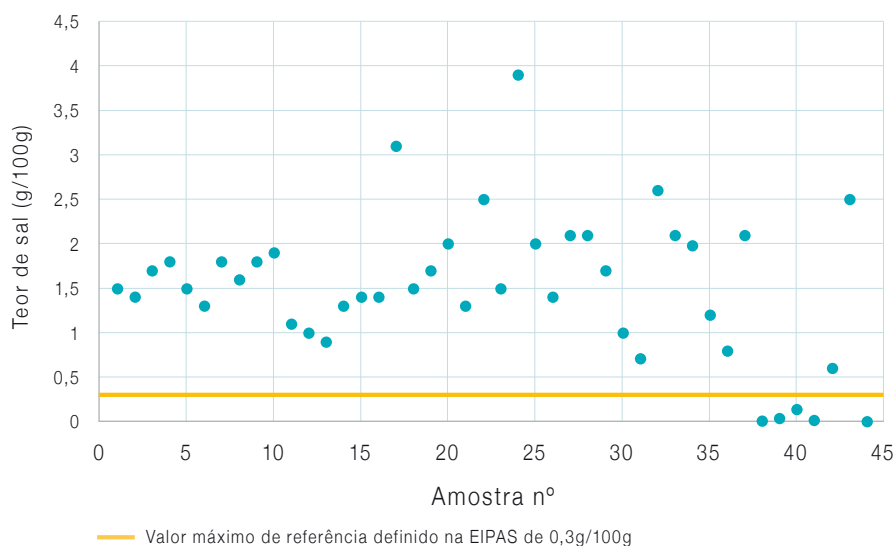


Gráfico 4: Teor de sal em *snacks*, ano de 2019 (n=44).





Relativamente ao valor energético, observaram-se as medianas de 530kcal e de 498kcal por 100g de alimento para batatas fritas e *snacks*, respetivamente.

Na ausência de valores limite na EIPAS para este parâmetro, confrontaram-se estes valores com o valor energético total (VET), para avaliar o contributo destas unidades de consumo num dia alimentar, considerando um plano alimentar de 2000kcal. Verificou-se que os contributos de 100g de cada um destes alimentos são de 27% no caso das batatas fritas e de 25%, no caso dos *snacks*. Se optarmos por uma embalagem de tamanho individual de 30g, estes contributos passam a 8% e 7%, respetivamente.

Apesar de ser expectável o cumprimento dos limites de teor de açúcar definidos na EIPAS para esta categoria, as diferenças são consideráveis, verificando-se uma mediana de 0,6g/100g no caso das batatas fritas, em oposição aos 5g/100g assinalados nos *snacks*. Esta discrepância de valores poderá ser justificada pela natureza dos produtos tendo em consideração que as batatas fritas são um produto salgado e os *snacks* incluem alimentos salgados e doces.

Conclusões

Não se verificaram diferenças significativas no valor energético das duas subcategorias analisadas, 530kcal e 498kcal por 100g de batatas fritas e *snacks*, respetivamente.

Ao observar o teor de sal, também não se verificaram diferenças assinaláveis na mediana, registando-se uma diferença de 0,2g de sal entre ambas, superior no caso dos *snacks* (1,5g/100g), quando comparado com as batatas fritas (1,3g/100g). Como tal, no que respeita ao teor de sal nesta categoria de produtos, há ainda um longo caminho a percorrer, o que justifica a necessidade de uma reformulação progressiva, atendendo ao consumo bastante elevado deste tipo de produtos, sobretudo por parte da população mais jovem, onde urge intervir e incentivar um padrão alimentar saudável.

O facto de os valores mínimos em ambas as subcategorias serem zero ou próximo de zero, tanto para teores de açúcar como de sal, reforça a possibilidade de reformulação destes produtos por parte da indústria.

Importa também assinalar que 13% da totalidade dos produtos selecionados não apresentavam, na informação disponível *online*, pelo menos uma das informações necessárias para a realização deste trabalho (energia, teor de açúcar ou teor de sal), obrigatórias ao abrigo do Regulamento (UE) n.º 1169/2011, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de outubro de 2011 ⁽⁸⁾.

Referências bibliográficas:

- (1) World Health Organization. Health topics – Cardiovascular diseases [Internet]. http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/
- (2) Gregório MJ, Mendes de Sousa S, Camolas J, et al. Juntos contra o Sal [Internet]. Apresentação oral, Dia Mundial da Alimentação, 16/10/2017. <https://www.dgs.pt/em-destaque/juntos-contra-o-sal1.aspx>
- (3) World Health Organization. Fact-sheets – Healthy Diet [Internet] [consult. 16/12/2020]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/healthy-diet>
- (4) Sociedade Portuguesa de Hipertensão. Sal e hipertensão arterial [Internet]. https://www.sphta.org.pt/pt/base8_detail/25/105
- (5) Direção-Geral da Saúde. Programa Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável [Internet]. <https://alimentacaosaudavel.dgs.pt/alimentacao-em-numeros/consumo-alimentar/>
- (6) Rêgo C. Objectivos e enquadramento do “Estudo do Padrão Alimentar e de Crescimento Infantil”: EPACI Portugal 2012. Apresentação oral, Alimentação e crescimento nos primeiros anos e vida: a propósito do EPACI Portugal 2012, 1/11/2013. <https://alimentacaosaudavel.dgs.pt/activeapp2020/wp-content/uploads/2015/04/EPACI-2013.pdf>
- (7) Despacho n.º 11418/2017. DR 2ª série de 2017-12-29, n.º 249:29595-8. Aprova a Estratégia Integrada para a Promoção da Alimentação Saudável (EIPAS). <https://dre.pt/pesquisa/-/search/114424591/details/normal?!=1>
- (8) Regulamento (UE) n.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de Outubro de 2011, relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, que altera os Regulamentos (CE) n.º 1924/2006 e (CE) n.º 1925/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho e revoga as Directivas 87/250/CEE da Comissão, 90/496/CEE do Conselho, 1999/10/CE da Comissão, 2000/13/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, 2002/67/CE e 2008/5/CE da Comissão e o Regulamento (CE) n.º 608/2004 da Comissão. JO 22.11.2011:L 304/18-63. <http://data.europa.eu/eli/reg/2011/1169/oj>



Conhecimento e atitude face à redução gradual da quantidade de sal no pão: inquérito realizado numa amostra de pais/tutores de crianças e jovens em idade escolar em 2019

Knowledge and attitude towards gradual salt reduction in bread in an enrolled school children' parents survey in 2019

Alexandra Costa¹, Roberto Brazão², Mariana Santos², Paula Braz³, Joana Santos³, Joana Alves⁴, Teresa Caldas de Almeida¹, Luciana Costa¹

alexandra.costa@insa.min-saude.pt

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

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

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

(4) Escola Nacional de Saúde Pública, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, Portugal

_Resumo

O consumo de sal em excesso contribui para a doença cardiovascular. Em Portugal, a ingestão de sal excede os níveis recomendados pela Organização Mundial de Saúde (OMS). O conhecimento e atitudes individuais relacionados com o consumo de sal podem influenciar a quantidade de sal consumida. Enquadrado num estudo-piloto em *Health Impact Assessment* (HIA), este trabalho pretendeu observar o conhecimento e atitudes de uma amostra de pais ou tutores de crianças em idade escolar face à redução do teor de sal no pão, assim como potenciais alterações nos hábitos de consumo, após a implementação de um Protocolo de Colaboração para a redução gradual do teor de sal no pão, de âmbito nacional. Para tal, foi elaborado um inquérito com recurso à plataforma *online* RedCap, tendo sido disponibilizado um *link* de acesso para auto-preenchimento pelos pais/tutores de crianças e jovens em idade escolar, residentes na zona de influência do Agrupamento de Centros de Saúde (ACeS) Almada-Seixal. Os participantes foram recrutados através das redes sociais. De 109 questionários preenchidos, 84 foram considerados válidos. Os resultados mostram que a maioria dos respondentes estavam despertos para que um excessivo consumo de sal aumenta o risco de doença, nomeadamente a hipertensão. Menos marcada é a perceção da quantidade/medida de sal recomendada pela OMS para o consumo diário pela população e do contributo do pão para essa ingestão total diária. Embora os respondentes manifestem ter conhecimento das medidas preconizadas pelo Protocolo para a redução do teor de sal no pão, a forma como avaliam o pão que consomem, em termos de sabor, não aponta para uma sensação negativa. Em particular, os dados obtidos apontam para a necessidade de promover e melhorar o conhecimento sobre as recomendações de ingestão de sal e principais fontes de sal e dos seus efeitos na saúde da população.

_Abstract

Excess salt consumption contributes to cardiovascular disease. In Portugal, salt intake exceeds the levels recommended by the World Health Organization. Individual knowledge and attitudes related to salt consumption can influence the amount of salt consumed. As part of a pilot study in *Health Impact Assessment* (HIA), this work aimed to observe the knowl-

edge and attitudes of a sample of parents or guardians of school-age children towards the reduction of the salt content in bread, as well as potential changes in consumption habits promoted after the implementation of a Collaboration Protocol. To this end, a survey was conducted using the online platform RedCap. Subsequently, an access link was made available for self-completion by parents/guardians of children and young people of school age, living at the area of influence of the Grouping of Health Centers (ACeS) Almada-Seixal. Participants were recruited through social networks. Of 109 received surveys, 84 were considered valid. The results show that most of participants are aware that excessive salt consumption increase the risk of disease namely hypertension. Less explicit is the perception of the amount of salt recommended by the World Health Organization and the contribution of bread to this total daily salt intake. Although respondents say they are aware of the measures recommended by the Protocol to reduce the salt content in bread, the way they evaluate it, in terms of flavour, does not point to a negative feeling. In particular, the data obtained point to the need to promote and improve knowledge about the recommendations for salt intake and main sources of salt and their effects on the health of the population.

_Introdução

O consumo excessivo de sal é um dos maiores problemas de saúde pública a nível global (1). De acordo com os resultados do último Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física (IAN-AF), a população portuguesa tem um consumo de sal elevado, em média 7,3g de sal/dia (2), valor acima do limiar de referência recomendado (5g sal/dia) pela Organização Mundial de Saúde (OMS), que corresponde a uma colher de chá rasa (3). Este consumo excessivo está associado ao desenvolvimento da hipertensão arterial e de algumas doen-



ças crónicas, em particular as doenças cardiovasculares ⁽⁴⁾. Em 2015, mais de um terço (36%) da população portuguesa era hipertensa, uma das prevalências mais elevadas da Europa ⁽⁵⁾. As doenças cardiovasculares são a principal causa de mortalidade em Portugal, muitas das quais poderiam ter sido evitadas alterando comportamentos alimentares, especialmente reduzindo o consumo de sal ⁽⁶⁾.

O desenvolvimento da Estratégia Integrada para a Promoção da Alimentação Saudável (EIPAS), através do Despacho nº 11418/2017, de 29 de dezembro de 2017 ⁽⁷⁾, consolidou uma abordagem integrada da promoção de hábitos alimentares mais saudáveis, envolvendo vários ministérios. Reconhece a necessidade da promoção de perfis nutricionais para determinadas categorias de alimentos, nomeadamente no que respeita à quantidade de sal. A ingestão de sal provém essencialmente do consumo de alimentos processados. Por essa razão, na maioria dos países desenvolvidos, a redução da ingestão de sal pode ser atingida através da redução gradual e sustentada da quantidade de sal adicionado durante a confeção de produtos alimentares, em contextos industriais ⁽⁸⁾. Nos países europeus, um dos alimentos que mais contribui para a ingestão de sal total é o pão (entre cerca de 20% a 25%), devido à sua ampla disponibilidade e quantidade consumida ⁽⁹⁾. Em Portugal, o pão e as tostas (18%), seguido dos produtos de charcutaria (8%) e as sopas (7%), é o produto alimentar que mais contribui para essa ingestão ⁽²⁾. Por essa razão, o pão tem sido considerado um produto alvo de eleição a nível global, no que diz respeito à redução gradual do teor de sal, dado a custo-efetividade da medida ⁽¹⁰⁾. Em Portugal, e sob influência da EIPAS, uma das atividades de implementação desta medida passou pela assinatura de um acordo voluntário com a indústria panificadora, na forma de Protocolo de Colaboração ⁽¹¹⁾. Este protocolo definiu metas anuais para a redução gradual do teor de sal no pão, sendo a meta final para 2021 de 1,0g de sal por 100g de pão. Mais tarde, em 2019, estendeu-se a meta final a 2022 ⁽¹²⁾.

No âmbito do Acordo de Colaboração Bienal (BCA) entre a OMS e o Ministério da Saúde, o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), com o apoio técnico da OMS, coordenou e desenvolveu um estudo-piloto em *Health Impact*

Assesment (HIA) com o intuito de avaliar o potencial impacto da implementação deste Protocolo na saúde da população ⁽¹³⁾. O mesmo acordo previa ainda a redução do teor de sal no pão, disponível em meio escolar, para o máximo de 1g até 31.12.2018.

_Objetivo

Observar o nível de conhecimento em relação ao consumo de sal e o estado de saúde e potenciais alterações de hábitos no consumo de pão, em casa e na escola, numa amostra de parentes ou tutores de crianças e jovens em idade escolar em 2019.

_Material e métodos

O presente trabalho trata-se num estudo observacional transversal, enquadrado num piloto de HIA, e dirigido a parentes/tutores de crianças e jovens em idade escolar, residentes na zona de influência do Agrupamento de Centros de Saúde (ACeS) Almada-Seixal.

O instrumento de recolha de dados foi desenvolvido com recurso à plataforma *online* REDCap (*Research Electronic Data Capture*). Trata-se de um questionário de autopreenchimento *online*, composto por 33 *itens*, distribuídos em cinco blocos: A) Conhecimento e literacia gerais, B) Protocolo de colaboração para a redução gradual da quantidade de sal no pão, C) Consumo doméstico, D) Consumo de pão na escola e E) Caracterização sociodemográfica. O primeiro bloco, consistiu numa matriz de *itens* composta por seis afirmações relacionadas com os efeitos do consumo excessivo de sal. Era pedido que se assinalasse o nível de concordância em relação a cada uma das afirmações, numa escala categórica que variava entre 'Concordo totalmente' e 'Discordo totalmente'. O segundo bloco prendeu-se com o reconhecimento público do Protocolo de colaboração, alvo do estudo-piloto de HIA, e da sua implementação na área de residência. O terceiro bloco pretendeu refletir a atitude dos participantes face ao consumo doméstico de pão, reportando os últimos 12 meses. Por seu turno, o quarto bloco, composto por três questões, remeteu para o consumo de pão em meio escolar



pelas crianças e jovens, reportado secundariamente pelos seus parentes/tutores, durante o ano letivo de 2018/2019. Por último, foram inquiridas seis características sociodemográficas do respondente (relação com a criança/jovem; sexo; grupo etário; grau de escolaridade; situação perante o trabalho e nível de rendimento do agregado).

O estudo foi submetido à apreciação da Comissão de Ética para a Saúde do INSA e da Direção-Geral da Educação, através do sistema de Monitorização de Inquéritos em Meio Escolar, tendo obtido os pareceres positivos à sua realização.

Os participantes foram recrutados através das redes sociais, a partir da divulgação da iniciativa nas mesmas, disponibilizando-se para tal um *link* de acesso ao questionário.

A recolha de dados decorreu entre outubro e dezembro de 2019.

_Resultados

De um total de 109 inquéritos preenchidos, 84 foram considerados válidos. A maioria dos respondentes são mulheres (86%), com idades compreendidas entre os 40-49 anos de idade (64%). Na [tabela 1](#) encontram-se resumidas as principais características sociodemográficas da amostra. Para efeitos de análise e apresentação de resultados, algumas categorias, nomeadamente grau de escolaridade e nível de rendimento, foram agrupadas em categorias mais abrangentes. Não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos.

Bloco A – Conhecimento e literacia gerais

Para efeitos de análise e apresentação de resultados, as respostas categóricas foram agrupadas numa variável dicotómica. As categorias 'concordo totalmente' e 'concordo' foram agrupadas, constituindo uma categoria de concordância. Agruparam-se as categorias 'discordo totalmente' e 'discordo', obtendo uma categoria de discordância. Manteve-se inalterada a categoria 'não concordo nem discordo', categoria neutra.

De acordo com o [gráfico 1](#), a maioria dos participantes (92%) está de acordo com a afirmação de que os portugueses inge-

Tabela 1: Características sociodemográficas dos parentes/tutores.

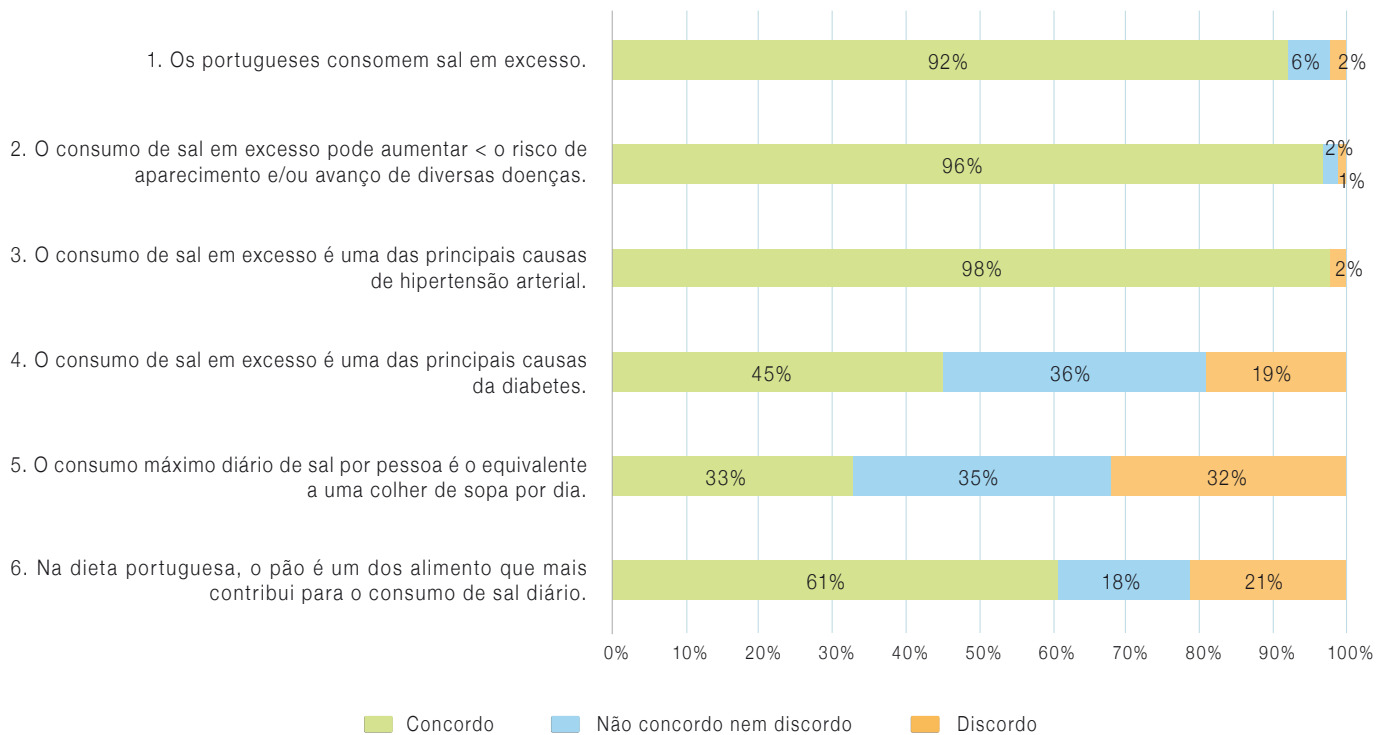
Característica	N (%)
Sexo	
Feminino	72 (86%)
Masculino	11 (13%)
Grupo etário	
20 - 29 anos	4 (5%)
30 - 39 anos	8 (10%)
40 - 49 anos	54 (64%)
50 - 59 anos	16 (19%)
Mais de 60 anos	2 (2%)
Nível de escolaridade	
Baixo	7 (8%)
Médio	33 (39%)
Elevado	44 (52%)
Nível de rendimento (agregado familiar)	
601 - 970 €	12 (14%)
971 - 1455 €	17 (20%)
1456 - 1940 €	10 (12%)
1941 - 2425 €	15 (18%)
2426 - 2910 €	8 (9%)
2911 - 3395 €	3 (4%)
3396 - 3880 €	6 (7%)
Mais de 3881 €	1 (1%)
Não responde	11 (13%)

rem sal em excesso. Sobre a relação entre o consumo excessivo de sal e o risco aumentado de diversas doenças, a maioria (96%) também concorda com a afirmação. No mesmo sentido, 98% dos respondentes assente que o consumo de sal em excesso é uma das principais causas de hipertensão arterial. Em relação à afirmação que relaciona o consumo de sal com a diabetes, menos de metade (45%) concorda.

Sobre o consumo de sal recomendado, aferido a partir da afirmação: "O consumo máximo diário de sal por pessoa é o equivalente a uma colher de sopa por dia", a distribuição



Gráfico 1: Percentagens relativas ao nível de concordância dos participantes às afirmações do bloco A «Conhecimento e literacia gerais» do questionário «Conhecimento e atitude face à redução gradual da quantidade de sal no pão».



das respostas é menos preponderante numa única categoria, tendo uma distribuição simétrica entre as três categorias. Questionados sobre o contributo do consumo de pão na ingestão diária total de sal, 61% dos participantes concorda que é um dos alimentos que mais contribui para este consumo.

Bloco B – Protocolo de colaboração para a redução gradual da quantidade de sal no pão

Questionados sobre a existência de um Protocolo de Colaboração para a redução gradual do teor de sal no pão (11), mais de metade (56%) afirma ter tido conhecimento do mesmo. Desses, a maioria teve conhecimento do Protocolo através da comunicação social/notícias/TV (87%).

Acerca da implementação do Protocolo, e consequente redução da quantidade de sal no pão, nas panificadoras/padarias da sua zona de residência, cerca de um terço (33%) afirma sabê-lo face aos restantes que ou não sabem ou não respondem.

Bloco C – Consumo doméstico

Acerca do consumo de pão em casa, mais de metade (55%) dos participantes afirma não ter sentido quaisquer alterações no pão que habitualmente come. Por outro lado, 15% não sabe e 30% afirma ter sentido alterações, reportando aos últimos 12 meses. De entre estes últimos, destacaram como principais alterações sentidas, o sabor (n=25), a durabilidade (n=7) e a textura (n=3).

De forma mais específica, foi pedido aos participantes que avaliassem o sabor do pão que habitualmente consomem. O gráfico 2 mostra a distribuição das respostas pelas categorias de sabor percecionadas. De destacar que 71% avalia o sabor como 'normal', 14% como 'um pouco salgado' e 11% 'com pouco sal'.

Por forma a aferir potenciais alterações no consumo de pão, foi inquirido se o padrão de compra se tinha alterado, quer na quantidade quer no local de compra habitual. Nesse contexto, 65% (n=55) não alterou o seu padrão de compra



face aos 32% (n=27) que afirmaram ter alterado. Dos que responderam afirmativamente, 23 indivíduos indicaram ter comprado menos pão nos últimos 12 meses, e destes, apenas sete referiram ter substituído o pão por outro(s) produto(s) similar(es) (e.g. tostas integrais, pão integral ou de cereais, cereais). O sabor do pão foi referido como motivo para alteração do local de compra para 11% dos inquiridos, que haviam notado alterações no pão que consumia.

Gráfico 2: Distribuição das respostas à questão «De uma maneira geral, como avalia actualmente o sabor do pão que come?» (bloco C) do questionário «Conhecimento e atitude face à redução gradual da quantidade de sal no pão».



Bloco D - Consumo de pão na escola

Neste bloco foram questionados sobre o consumo de pão das suas crianças/jovens em contexto escolar. Quando inquiridos “Neste ano lectivo de 2018/2019, o(s) seu(s) educando(s) educanda(s) tem comido pão no refeitório ou no bar da escola que frequenta?”, 42% responderam ‘sim’ e 48% ‘não’. Considerando aqueles que responderam ‘sim’ (n=35), apenas 2 anuíram que o seu educando mencionou ter sentido alguma alteração no sabor do pão que come na escola.

_Discussão

A maioria dos respondentes reconheceu e estava desperto para um excesso de consumo de sal pelos portugueses. De acordo com o IAN-AF, o consumo médio diário da população portuguesa é superior ao recomendado pela OMS (2). De forma geral, o conhecimento sobre a relação entre o consumo excessivo de sal e o desenvolvimento de doenças, como a hipertensão arterial, é bastante elevado entre os participantes, uma vez que a maioria concordou com estas afirmações. Este resultado é consistente com o estudo realizado por Khokhar e colaboradores (14) e parece sugerir que a mensagem de saúde pública sobre os malefícios do consumo excessivo de sal é bem reconhecida. No entanto, menos claro pareceu ser o conhecimento sobre a quantidade de sal (equivalente em medida de colher) recomendada pela OMS, onde apenas um terço discordou categoricamente com a afirmação dada, que não corresponde à medida recomendada. Também menos marcada foi a concordância, e consequente reconhecimento, de que o pão é um dos alimentos que mais contribui para a ingestão total de sal diária, embora 61% dos inquiridos concorde com a afirmação. Estes dois *itens* parecem sugerir que há ainda alguns tópicos sobre a ingestão de sal que podem ser melhorados em termos de comunicação e literacia em saúde.

Mais de metade dos participantes afirmou ter conhecimento do Protocolo de colaboração (11), e consequente redução de teor de sal no pão. Essa redução não parece ter tido efeito no consumo de pão, uma vez que também mais de metade indicou não ter sentido alterações no sabor do pão que habitualmente consumia (em relação aos últimos 12 meses) e 65% indicou não ter alterado o seu padrão de compra (quantidade). Particularmente, em relação ao sabor do pão, os resultados parecem estar em linha com estudos que indicam uma boa aceitação por parte dos consumidores em relação a reduções graduais de teor do sal no pão (15).

Uma limitação deste estudo é o reporte secundário de consumo de pão das crianças ou jovens em contexto escolar, porque pode enviesar a realidade. No entanto, em relação aos educandos que comem pão na escola, a maioria não reportou aos seus pais ou tutores alterações no sabor do



pão. Deste modo, parece sugerir que, caso o pão escolar cumpra já a meta estabelecida pelo protocolo, esta parece ser bem aceite pelos alunos.

Conclusões

Alguns estudos têm confirmado que uma redução, mesmo que moderada, da ingestão de sal pode trazer ganhos em termos de saúde pública, tanto a curto quanto a longo prazo. Por esta razão, a reformulação dos produtos alimentares é determinante para melhorar os hábitos alimentares da população portuguesa e, conseqüentemente, para obter ganhos em saúde. Pelo seu custo-benefício o pão tem sido um produto-alvo desta reformulação, diminuindo gradualmente o teor de sal na sua preparação. A estratégia de reformulação alimentar, que tem assumido a forma de acordos voluntários com a indústria, deve assim ser complementada por outras ações, de forma integrada. Em particular, deve ser acompanhada de ações que promovam a literacia em saúde dos indivíduos, maximizando a adesão a estilos de vida saudáveis baseada em escolhas individuais e comunitárias, conscientes, informadas e acertadas.

Este estudo, com as suas limitações, indica um caminho que pode ser melhorado em termos de comunicação, sobre o consumo de sal, nomeadamente a quantidade recomendada pela OMS e ainda, o peso do contributo que determinadas categorias de alimentos têm na ingestão total de sal.

Agradecimentos:

A todos os participantes; Ao Agrupamento de Centros de Saúde Alameda-Seixal, com destaque ao Dr. Alexandre Tomás; Aos Agrupamentos Escolares que colaboraram; À Administração Regional de Saúde do Algarve e à Direção-Geral da Educação.

Financiamento:

Trabalho desenvolvido no âmbito do Programa de Treino em *Health Impact Assessment* nos termos do Acordo de Colaboração Bial entre a Organização Mundial da Saúde e o Ministério da Saúde de Portugal, coordenado pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

Referências bibliográficas:

- (1) World Health Organization. The SHAKE technical package for salt reduction. Geneva: WHO, 2016. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/250135>
- (2) Lopes C, Torres D, Oliveira A, et al. Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física, IAN-AF 2015-2016: relatório de resultados. Porto: Universidade do Porto, 2017. https://ian-af.up.pt/sites/default/files/IAN-AF%20Relat%C3%B3rio%20Resultados_0.pdf
- (3) World Health Organization. Guideline: Sodium intake for adults and children. Geneva: WHO, 2012. https://www.who.int/nutrition/publications/guidelines/sodium_intake_printversion.pdf
- (4) He, F. J., & MacGregor, G. A. (2018). Role of salt intake in prevention of cardiovascular disease: controversies and challenges. *Nature Reviews Cardiology*, 15(6), 371-377.
- (5) Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. (2016). 1º Inquérito Nacional de Saúde com Exame Físico (INSEF 2015): Estado de Saúde. Lisboa: INSA IP.
- (6) Ministério da Saúde do Governo de Portugal. Retrato da Saúde em Portugal. (2018). Lisboa: Ministério da Saúde, Portugal
- (7) Despacho n.º 11418/2017. DR 2ª série de 2017-12-29, nº 249:29595-8. Aprova a Estratégia Integrada para a Promoção da Alimentação Saudável (EIPAS). <https://dre.pt/pesquisa/-/search/114424591/details/normal?l=1>
- (8) He FJ, MacGregor GA. Reducing population salt intake worldwide: from evidence to implementation. *Prog Cardiovasc Dis*. 2010 Mar-Apr;52(5):363-82. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2009.12.006>
- (9) Quilez J, Salas-Salvado J. Salt in bread in Europe: potential benefits of reduction. *Nutr Rev*. 2012 Nov;70(11):666-78. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00540.x>
- (10) Brinsden HC, He FJ, Jenner KH, et al. Surveys of the salt content in UK bread: progress made and further reductions possible. *BMJ Open*. 2013 Jun 20;3(6):e002936. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2013-002936>
- (11) Secretaria-Geral do Ministério da Saúde. Protocolo de Colaboração protocolo no âmbito da promoção da alimentação saudável entre a Direção-Geral da Saúde, o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, a Associação dos Industriais de Panificação, Pastelaria e Similares de Lisboa, a Associação dos Industriais de Panificação, Pastelaria e Similares do Norte e a Associação do Comércio e da Indústria de Panificação, Pastelaria e Similares. Lisboa, 2017.
- (12) Direção-Geral da Saúde. Programa Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável. Lisboa: DGS, 2019. https://nutrimento.pt/activeapp/wp-content/uploads/2019/07/Relato%CC%81rio_PNPAS_2019.pdf
- (13) Braz P, Santos J, Alves J, et al. Etapas iniciais de um estudo-piloto de Health Impact Assessment em Portugal: o caso da redução de sal no pão. *Boletim Epidemiológico Observações*. 2019;8(Supl 11):22-24. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/7134>
- (14) Khokhar D, Nowson CA, Margeterson C, et al. Knowledge and Attitudes Are Related to Selected Salt-Specific Behaviours among Australian Parents. *Nutrients*. 2018 Jun 4;10(6):720. <https://doi.org/10.3390/nu10060720>
- (15) Kloss L, Meyer JD, Graeve L, et al. Sodium intake and its reduction by food reformulation in the European Union: a review. *NFS journal*. 2015 Jun;1:9-19. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2015.03.001>



Hemocromatose hereditária associada ao gene *HFE*: resultados do diagnóstico molecular, correlação genótipo-fenótipo e importância da qualidade laboratorial

Hereditary hemochromatosis associated with the HFE gene: results of the molecular diagnosis, genotype-phenotype correlations, and importance of laboratory quality

Pedro Fonseca¹, Pedro Loureiro¹, Susana Gomes¹, Paula Faustino^{2,3}, João Gonçalves^{1,4}

joao.goncalves@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Genética Molecular. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

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

(4) Centro de Toxicogenómica e Saúde Humana. Faculdade de Ciências Médicas, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, Portugal

_Resumo

A hemocromatose hereditária (HH) associada ao gene *HFE*, dado ser uma doença autossómica recessiva com penetrância incompleta, deve obedecer a uma estratégia de análise molecular que compreenda, em primeiro lugar, a pesquisa das alterações moleculares que ocorrem mais frequentemente no referido gene (p.H63D e p.C282Y). Deve dar-se prioridade à pesquisa da alteração p.C282Y já que esta, quando presente em homozigotia, não havendo outros fatores de risco associados, permite confirmar a doença em indivíduos com fenótipo clínico sugestivo de HH e/ou apresentam biomarcadores séricos indicadores de sobrecarga em ferro, nomeadamente saturação da transferrina e ferritina elevadas. Neste trabalho, o estudo molecular de 1838 doentes com parâmetros clínicos e/ou bioquímicos relacionados com HH, revelou a presença de homozigotia para a alteração p.C282Y em 4% dos indivíduos analisados, valor muito acima do estimado para a população em geral (~0,09%) enquanto que a homozigotia para p.H63D foi de 7,9%, o qual corresponde a duas vezes o valor previsto para a população em geral (~4%). Ou seja, estes resultados, sustentam que a referida pesquisa, antecedida de aconselhamento genético, deverá ser realizada para confirmar (em indivíduos com índices bioquímicos de sobrecarga em ferro) a suspeita de HH. O diagnóstico molecular antecedido da ocorrência dos sintomas graves da HH, permite antecipar a vigilância clínica, prevenindo a progressão da doença para as manifestações mais graves que incluem, por exemplo, cirrose e carcinoma hepatocelular. Complementarmente, valoriza-se também a importância da participação dos laboratórios em ensaios de avaliação externa da qualidade, o que permite melhorar o desempenho dos mesmos no âmbito da genotipagem, interpretação de resultados e qualidade dos relatórios.

_Abstract

Hereditary hemochromatosis (HH) associated with the HFE gene is an autosomal recessive disease with incomplete penetrance, should follow a molecular strategy analysis that includes, in a first stage, the screening of the molecular alterations that occur more frequently in that gene (p.H63D and p.C282Y). Priority should be given to p.C282Y alteration since this, when present in homozygosity, with no other associated risk factors, allows the disease confirmation in individuals with a clinical phenotype suggestive of HH and/or with serum biomarkers of iron overload, namely transferrin and ferritin saturation indices above normal. In

this work, the molecular study of 1838 patients with clinical and/or biochemical parameters related to HH, revealed the presence of homozygosity for p.C282Y in 4% of the analysed individuals, a value well above the estimated for the general population (~ 0.09%), while the homozygosity for p.H63D was 7.9%, which is twice the expected value for the general population (~ 4%). These results support that the strategy of analysis mentioned above, preceded by genetic counselling, should be carried out to confirm (in individuals with biochemical indexes of iron overload) the suspicion of HH. The molecular diagnosis performed before the occurrence of severe symptoms of HH, allows the anticipation of the patient's clinical surveillance, preventing the progression of the disease to the most severe manifestations that include, for example, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Additionally, the participation of laboratories in external quality assessment schemes is important and highly recommended, which allows them to improve their performance in terms of genotyping, results interpretation, and reports quality.

_Introdução

Designa-se por Hemocromatose Hereditária (HH) um conjunto de doenças genéticas, de desenvolvimento tardio no adulto, as quais são caracterizadas pela acumulação de ferro em órgãos parenquimatosos, sobretudo no fígado ⁽¹⁾. Na ausência de tratamento, a patologia poderá originar a falência do órgão, passando por uma evolução degenerativa de fibrose, cirrose até ao carcinoma hepatocelular. A forma mais prevalente é a HH do tipo 1 (OMIM#235200) associada à alteração c.845G>A, p.Cys282Tyr em homozigotia no gene *HFE* (HGNC#4886) ⁽²⁾ e apresenta uma transmissão autossómica recessiva. A penetrância da doença é incompleta, 75% a 85% dos indivíduos que possuem a referida alteração



em homozigotia não desenvolvem manifestações clínicas graves, embora possam apresentar alterações quantitativas nos biomarcadores séricos associados ao metabolismo do ferro (3-5). A alteração c.187C>G, p.His63Asp, também no gene *HFE*, pode estar associada a ligeira sobrecarga em ferro quando presente em heterozigotia composta com a alteração c.845G>A, p.Cys282Tyr, ou eventualmente associada a sobrecarga moderada, quando em homozigotia, contudo para estes genótipos as manifestações fenotípicas graves são raras. De acordo com as *guidelines* mais recentes da *European Association for the Study of the Liver* (EASL), esta alteração, só por si, não é considerada causadora de HH associada ao gene *HFE* (6).

_Objetivo

O presente trabalho visou avaliar os resultados genotípicos da pesquisa das duas alterações que ocorrem mais frequentemente no gene *HFE*, associadas a hemocromatose hereditária (HH) em doentes com suspeita clínica de HH ou com parâmetros bioquímicos do metabolismo do ferro elevados.

_Materiais e métodos

Estudaram-se 1838 doentes, no período compreendido entre janeiro de 2009 e outubro de 2020, no âmbito do diagnóstico molecular de HH tipo 1 com base em critérios clínicos

(doença hepática crónica, doença metabólica, porfiria cutânea tarda, diabetes *mellitus*), e/ou bioquímicos (alteração das provas hepáticas, Ferritina Sérica (FS) elevada, ferro sérico elevado, índice de Saturação da Transferrina (ST) elevada). As alterações *HFE*: c.187C>G, p.(His63Asp) e c.845G>A, p.(Cys282Tyr) foram pesquisadas recorrendo à amplificação das regiões de interesse, respetivamente exões 2 e 4, pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), seguida de hidrólise enzimática dos respetivos fragmentos, com as endonucleases Mbo I e Rsa I.

_Resultados e discussão

A amostra analisada demonstra (tabela 1), de acordo com o previsto face às características da doença, que o grupo de doentes é constituído predominantemente por indivíduos do sexo masculino: 1366 homens (74,3%) e 472 mulheres (25,7%). A predominância do sexo masculino é justificada pela HH, ou a sobrecarga em ferro, ser mais frequente em homens do que em mulheres pré-menopausa. Atendendo à alteração molecular mais relevante associada à doença em causa, ou que confere risco significativo para HH, a homozigotia para c.845G>A, p.Cys282Tyr (adiante designada por YY), foi detetada em 4% dos indivíduos analisados (74, independentemente do sexo). Este valor é similar ao reportado na literatura, ou seja, ~1/3 dos laboratórios participan-

Tabela 1: ▾ Genótipos *HFE* para as alterações p.His63Asp e p.Cys282Tyr detetados nos 1838 indivíduos analisados.

Sexo masculino						
Genótipo	HHCC	HDCC	DDCC	HHCY	HHYY	HDCY
Nº de casos	639	430	117	76	47	57
Percentagem	46,8%	31,5%	8,6%	5,6%	3,4%	4,2%
Total	100% (n=1366)					
Sexo feminino						
Genótipo	HHCC	HDCC	DDCC	HHCY	HHYY	HDCY
Nº de casos	224	130	29	43	27	19
Percentagem	47,5%	27,5%	6,1%	9,1%	5,7%	4,0%
Total	100% (n=472)					

Representação simplificada dos genótipos a nível da sequência na proteína. Cada aminoácido está representado por uma única letra de acordo com a nomenclatura internacional: H(Histidina), D(Ácido aspártico), C(Cisteína) e Y(Tirosina). HH ou DD – homozigotia para, respetivamente, histidina ou ácido aspártico na posição 63; CC ou YY – homozigotia para, respetivamente, cisteína ou tirosina na posição 282; HD e CY – heterozigotias, e HDCY – heterozigotia composta para as duas alterações em causa.



tes num inquérito europeu revelaram que a taxa de deteção da referida homozigotia é inferior a 5%, enquanto que cerca de 50% dos referidos laboratórios, a taxa em causa situa-se entre ~5-20% (1).

Os resultados também revelam que na amostra analisada, a homozigotia YY ocorre mais frequentemente em mulheres (5,7%) do que em homens (3,4%), o que sugere que o diagnóstico clínico/bioquímico nas mulheres é mais eficaz do que o realizado em homens, relativamente ao genótipo patogénico obtido. Quanto ao genótipo DY (heterozigotia composta) foi também detetado em ~4% dos indivíduos analisados, o que sustenta a associação do mesmo a sobrecarga em ferro ou às respetivas manifestações clínicas. Nesta análise o genótipo DD está particularmente representado na amostra analisada (8,6% em homens e 6,1% em mulheres). Embora a maioria dos autores considere que a alteração H63D não constitui uma alteração genética que isoladamente cause HH, o genótipo DD deverá ser considerado como um fator de risco sempre que ocorra em indivíduos que também possuam outros fatores a contribuir para a sobrecarga em ferro, por exemplo, doença hepática crónica, doença metabólica ou hábitos alcoólicos.

Atendendo aos diversos genótipos que podem conferir risco acrescido de sobrecarga em ferro (YY, DY e DD, embora o risco não seja o mesmo para cada um), verificamos que os mesmos foram detetados em 16,1% dos doentes analisados (296/1838), revelando assim, que os parâmetros clínicos e bioquímicos usados para a seleção dos doentes permitem identificar os que, em idade mais avançada, estarão em maior risco de vir a desenvolver sintomatologia mais grave associada à sobrecarga em ferro e conseqüentemente carecem de vigilância clínica mais regular. Complementarmente ao diagnóstico molecular em indivíduos que possuam as características clínicas ou bioquímicas anteriormente indicadas, o aconselhamento genético prévio dos mesmos e dos seus familiares diretos é essencial para a realização dos testes genéticos preditivos em causa.

Os presentes resultados também revelam que a grande maioria dos doentes (~84%) não possui as alterações que ocorrem mais frequentemente no gene *HFE*. Esta evidên-

cia é sugestiva que os doentes que manifestem inequivocamente HH, possuindo FS e ST consistentemente elevados, e nos quais seja comprovada a sobrecarga em ferro no fígado e não possuindo outros fatores de risco para a doença em causa, poderão ter indicação tanto para a pesquisa de alterações raras no gene *HFE*, como para o estudo molecular dos restantes genes associados a HH não clássica, nomeadamente *HJV*, *HAMP*, *TFR2* e *SLC40A1*. A análise molecular por sequenciação de nova geração (NGS, na sigla em inglês) de um painel contendo estes genes foi recentemente implementada na Unidade de Genética Molecular do Departamento de Genética Humana do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Esta nova abordagem metodológica permite (comparativamente à análise sequencial dos referidos genes por sequenciação de Sanger) com elevada rapidez, com um custo inferior e em função da informação clínica, identificar outros tipos raros de HH não-clássica causada por alterações moleculares nestes genes.

Evidencia-se, ainda, a importância da participação em ensaios de avaliação externa da qualidade (AEQ), nomeadamente os programas que avaliam, para além da genotipagem, a interpretação dos resultados, a clareza e formato dos relatórios. Neste aspeto, a participação da Unidade de Genética Molecular em AEQ para a HH, a qual ocorre desde 2005 no programa organizado pela EMQN (*European Molecular Genetics Quality Network*), obteve sempre resultados acima da média, ou a pontuação máxima, relativamente aos restantes laboratórios participantes, conforme representado no [gráfico 1](#) (relativa à genotipagem) e no [gráfico 2](#) (relativa à interpretação dos resultados). A participação em AEQ e a acreditação que obtivemos em 2014, no âmbito da norma portuguesa ISO 15189:2014 (11), são dois requisitos essenciais que demonstram credibilidade e competência, permitindo assegurar um diagnóstico de qualidade a diversos níveis. Cumprindo os rigorosos requisitos de gestão e técnicos da Qualidade, contribui-se também para cumprir o exigente regulamento relativo aos dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro* (Regulamento (UE) 2017/746) (12), já em vigor e com aplicação obrigatória a partir de 26 maio



Gráfico 1: Resultados da participação da Unidade de Genética Molecular (UMO) no programa de avaliação externa da qualidade em Hemocromatose Hereditária da EMQN, para o parâmetro "Genotipagem". Intervalo da classificação 0(zero) a 2.

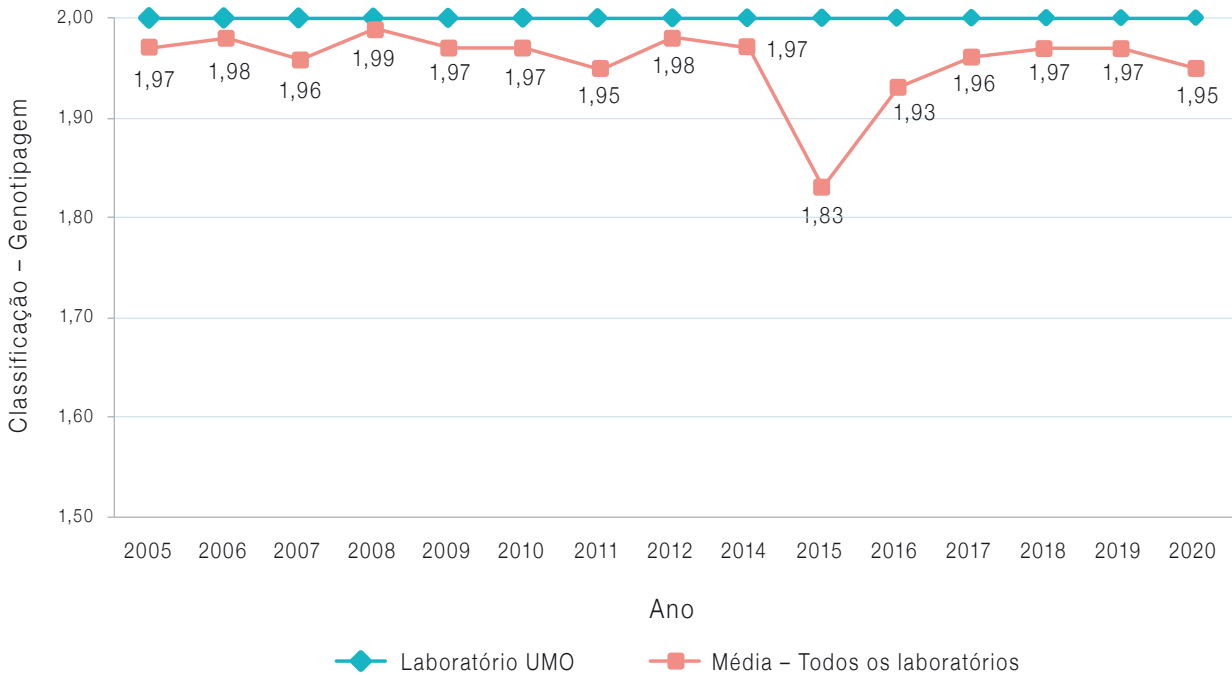
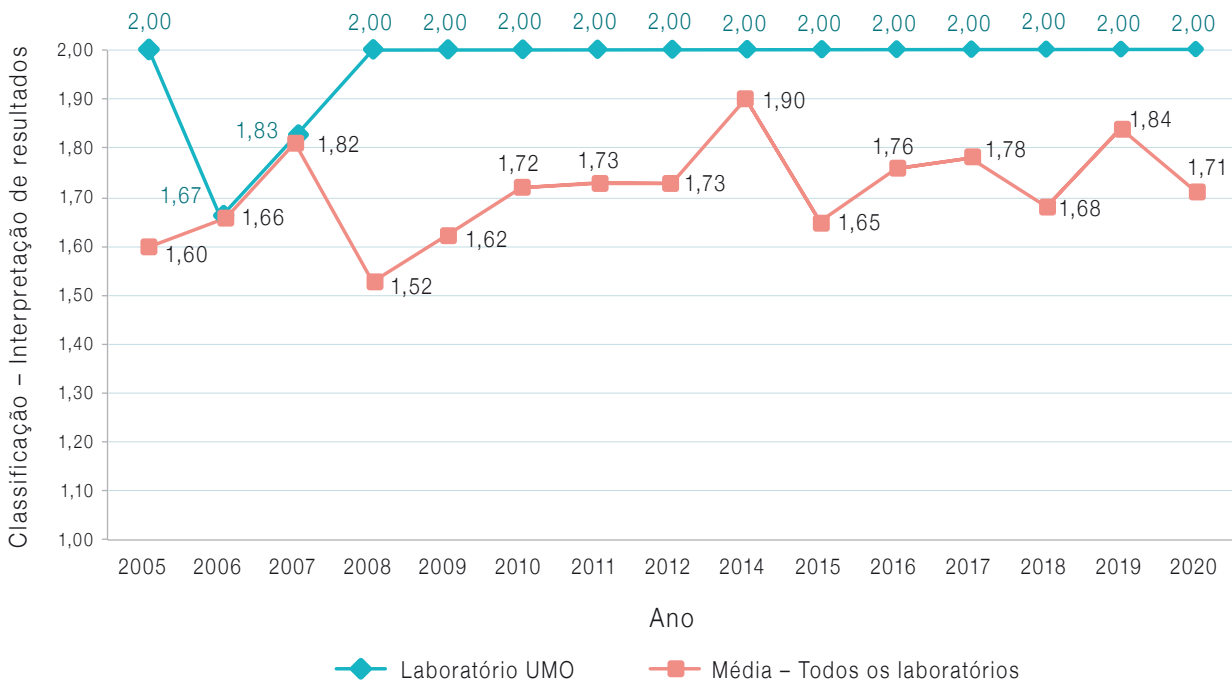


Gráfico 2: Resultados da participação da Unidade de Genética Molecular (UMO) no programa de avaliação externa da qualidade em Hemocromatose Hereditária da EMQN, para o parâmetro "Interpretação de Resultados". Intervalo da classificação 0(zero) a 2.





de 2022.

_Conclusões

Os resultados obtidos permitem concluir que os diferentes genótipos para as alterações pesquisadas associadas a sobrecarga em ferro, ocorrem com uma frequência que varia entre 3,4% e 8,6%. Contudo, dada a penetrância incompleta destes genótipos, é determinante considerar os outros fatores não genéticos que contribuem para a sobrecarga em ferro visando uma melhor caracterização da doença individualmente e a identificação da(s) sua(s) causa(s).

A seleção dos doentes para a caracterização molecular da HH, dada a inespecificidade das manifestações clínicas que lhe estão associadas, e na ausência de outras doenças hematológicas, deve ser sustentada por índices bioquímicos de sobrecarga em ferro, nomeadamente a ST e a ferritina consistentemente elevados. Os doentes que não possuam a homozigotia YY, demonstrando-se inequivocamente a sobrecarga em ferro (por ex. por ressonância magnética ou mesmo devido à necessidade de realização de flebotomias regulares), poderão realizar estudos moleculares noutros genes associados a HH, desde que outras causas de doença hepática ou hematológica tenham sido excluídas.

Esta seleção criteriosa dos doentes, permitirá aumentar a taxa de deteção de genótipos associados à doença, a qual se refletirá na vigilância clínica dos doentes e dos seus familiares, acompanhadas pelo adequando aconselhamento genético, contribuirão mais eficazmente para um diagnóstico mais precoce da HH.

Referências bibliográficas:

- (1) Porto G, Brissot P, Swinkels DW, et al. EMQN best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of hereditary hemochromatosis (HH). *Eur J Hum Genet.* 2016 Apr;24(4):479-95. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.128>
- (2) Faria R, Silva B, Silva C, et al. Next-generation sequencing of hereditary hemochromatosis-related genes: Novel likely pathogenic variants found in the Portuguese population. *Blood Cells Mol Dis.* 2016 Oct;61:10-5. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2016.07.004>
- (3) Mayr R, Janecke AR, Schranz M, et al. Ferroportin disease: a systematic meta-analysis of clinical and molecular findings. *J Hepatol.* 2010 Nov;53(5):941-9. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.05.016>
- (4) Waalen J, Beutler E. Beware of multiple comparisons: a study of symptoms associated with mutations of the HFE hemochromatosis gene. *Clin Chim Acta.* 2005 Nov;361(1-2):128-34. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2005.05.017>
- (5) Katsarou MS, Papanavva M, Latsi R, et al. Hemochromatosis: Hereditary hemochromatosis and HFE gene. *Vitam Horm.* 2019;110:201-22. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2019.01.010>
- (6) European Association For The Study Of The Liver. EASL clinical practice guidelines for HFE hemochromatosis. *J Hepatol.* 2010 Jul;53(1):3-22. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.03.001>
- (7) Bryant J, Cooper K, Picot J, et al. A systematic review of the clinical validity and clinical utility of DNA testing for hereditary haemochromatosis type 1 in at-risk populations. *J Med Genet.* 2008 Aug;45(8):513-8. <https://doi.org/10.1136/jmg.2007.055806>
- (8) Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Jouanolle AM, et al. Geography of HFE C282Y and H63D mutations. *Genet Test.* 2000;4(2):183-98. <https://doi.org/10.1089/10906570050114902>
- (9) Swinkels DW, Jorna AT, Raymakers RA. Synopsis of the Dutch multidisciplinary guideline for the diagnosis and treatment of hereditary haemochromatosis. *Neth J Med.* 2007 Dec;65(11):452-5. <http://www.njmonline.nl/getpdf.php?id=606>
- (10) Silva B, Faustino P. An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Jul;1852(7):1347-59. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.03.011>
- (11) NP EN ISO 15189:2014. Laboratórios clínicos. Requisitos para a qualidade e competência.
- (12) Regulamento (EU) 2017/746 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 5 de abril de 2017. Relativo aos dispositivos médicos para diagnóstico in vitro e que revoga a Diretiva 98/79/CE e a Decisão 2010/227/UE da Comissão. JO 5.5.2017: L 117/176-332. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R0746&from=EN>



Fenilcetonúria em Portugal: 40 anos de rastreio neonatal (1979-2019)

Phenylketonuria in Portugal: 40 years of neonatal screening (1979-2019)

Filipa Ferreira¹, Luísa Azevedo²⁻⁴, Carmen Sousa¹, Raquel Neiva¹, Helena Fonseca¹, Ana Marcão¹, Hugo Rocha¹, Célia Carmona¹, Sónia Ramos¹, Anabela Bandeira⁶, Esmeralda Martins⁶, Teresa Campos⁷, Esmeralda Rodrigues⁷, Paula Garcia⁸, Luísa Diogo⁸, Ana Cristina Ferreira⁹, Sílvia Sequeira⁹, Francisco Silva¹⁰, Luísa Rodrigues¹¹, Ana Gaspar¹², Patrícia Janeiro¹², António Amorim²⁻⁴, Laura Vilarinho^{1,5}

laura.vilarinho@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal

(2) Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (i3S), Universidade do Porto, Porto, Portugal

(3) Instituto de Patologia e Imunologia Molecular, Universidade do Porto, Porto, Portugal

(4) Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Portugal

(5) Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal

(6) Centro de Referência para Doenças Metabólicas. Departamento de Pediatria, Centro Hospitalar do Porto, Porto, Portugal

(7) Centro de Referência para Doenças Metabólicas. Departamento de Pediatria, Centro Universitário Hospital de São João, Porto, Portugal

(8) Centro de Referência para Doenças Metabólicas, Hospital Pediátrico e Centro Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal

(9) Centro de Referência para Doenças Metabólicas. Hospital Dona Estefânia, Centro Hospitalar Universitário Lisboa Central, Lisboa Portugal

(10) Departamento de Pediatria, Hospital Central do Funchal, Funchal, Portugal

(11) Departamento de Pediatria, Hospital do Divino Espírito Santo de Ponta Delgada, Ponta Delgada, Açores, Portugal

(12) Centro de Referência para Doenças Metabólicas, Centro Hospitalar Universitário Lisboa Norte, Lisboa, Portugal

_Resumo

A fenilcetonúria (PKU) é uma doença genética autossómica recessiva, devido a um erro hereditário do metabolismo dos aminoácidos. A PKU caracteriza-se por um aumento de fenilalanina, em resultado de uma deficiência da enzima hepática, fenilalanina hidroxilase (PAH), uma enzima codificada pelo gene *PAH*. É uma das 26 patologias integradas no painel das doenças rastreadas em Portugal, a partir de sangue colhido em papel de filtro para o "teste do pezinho". A deteção precoce da doença tem como objetivo iniciar o tratamento nutricional atempadamente, de modo a prevenir os danos neurológicos nos doentes afetados. Em Portugal, desde 1979 e até ao final de 2019, foram rastreados através do Programa Nacional de Rastreio Neonatal 3 890 677 recém-nascidos. Sendo que, 356 são doentes com PKU e 37 são hiperfenilalaninemias moderadas. A prevalência ao nascimento da PKU e da hiperfenilalaninemia moderada no nosso país é de 1:10.929 e 1:36.123 recém-nascidos, respetivamente. Na Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética do Departamento de Genética Humana do INSA foram caracterizados geneticamente 223 doentes. Neste estudo, foram identificadas 56 mutações já descritas na literatura, a maioria compostos heterozigóticos (74% dos doentes). As duas mutações mais prevalentes na população portuguesa são: c.782G>A (p.Arg261Gln), c.1066-10G>A (IVS10-11G>A), seguidas pelas mutações c.1162G>A (p.Val388Met) e c.194T>C (p.Ile65Thr). Este estudo revelou uma elevada heterogeneidade quer do ponto de vista do fenótipo bioquímico quer ao nível molecular, o que poderá ser importante na resposta ao tratamento destes doentes uma vez que esta estará dependente do respetivo genótipo. Os dados deste estudo, contribuem para uma melhor compreensão e conhecimento epidemiológico da PKU em Portugal.

_Abstract

Phenylketonuria (PKU) is an autosomal recessive genetic disorder due to an inborn error of amino acid metabolism. This disease causes elevation of phenylalanine levels in blood and other body fluids due to impairment of the hepatic enzyme phenylalanine hydroxylase (PAH), codified by the PAH gene. PKU is one of the 26-blood spot screened pathologies included in the Portuguese Neonatal Screening Program (PNSP). The early diagnosis of the affected individuals is important, as it can prevent clinical manifestations of the disease, as neurological damage and severe mental retardation as well as treatment can be started shortly after birth and the patients fall within the broad normal range of general ability, attaining expected educational standards and have an independent life as adult. In Portugal, since 1979 until 2019, 3 890 677 newborns were screened for by Portuguese Neonatal Screening Program (PNSP). Through this program, findings revealed 356 PKU and 37 hyperphenylalaninaemia. The PKU birth prevalence in Portugal is estimated to be 1:10,929 and 1:36,123 newborn, respectively. In the Newborn Screening, Metabolic and Genetics Unit of Human Genetics Department of National Institute of Health Dr. Ricardo Jorge, 223 patients were molecularly characterized. The PAH molecular analysis of these patients revealed 56 distinct variants (already described in the literature), most of them found in compound heterozygosity (74% of the patients). In this study, the two most prevalent variants are c.782G>A p. (Arg261Gln) and c.1066-11G>A, c.1162G>A, followed by the variants, p. (Val388Met) and c.194T>C p. (Ile65Thr). Our data reveal high heterogeneity at the biochemical and molecular levels and is expected to provide a better understanding of the molecular basis of this disease and to provide clues to elucidate genotype-phenotype correlations. The information



obtained will also improve the diagnostic applicability of mutational analysis and the capacity to predict the evolution of the disease. The present study aims to identify and characterize the variants underlying PKU in affected individuals in the Portuguese PKU/HPA cohort, for a better understanding of this disease.

_Introdução

Em Portugal, nos anos 70, o Programa Nacional de Rastreamento Neonatal (PNRN) foi inicialmente implementado apenas com o rastreio da Fenilcetonúria (PKU). Mais tarde, em 1981 foi acrescentado a este programa o rastreio do Hipotiroidismo Congénito (CH) (1-4), e em 2004 alargado a mais 23 doenças metabólicas. Em 2019, foi incluído um novo rastreio, o rastreio da Fibrose Quística. Presentemente, este programa já rastreia 26 doenças e está centralizado num único laboratório do Departamento de Genética Humana do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, no Porto, que recebe em média 400 amostras de recém-nascidos/dia (5).

A fenilcetonúria (PKU; OMIM #261600) é uma doença genética autossómica recessiva, causada pela deficiência na enzima hepática fenilalanina hidroxilase (PAH; OMIM #612349) (6) que converte a fenilalanina em tirosina, na presença do cofator, a tetrahydrobiopterina (BH4) (figura 1a,b). Sempre que a atividade da enzima PAH (EC 1.14.16.1) esteja reduzida, a fenilalanina, aminoácido essencial, não é hidrolisado em tirosina, acumulando-se no sangue e em outros fluidos corporais. Níveis elevados de fenilalanina e dos seus derivados metabólicos causam toxicidade originando atrasos no crescimento, microcefalia, convulsões, bem como alterações no desenvolvimento psicomotor e/ou intelectual (7,8). Quando a fenilalanina, em grande quantidade, atravessa a barreira hematoencefálica, origina alterações irreversíveis e estruturais no sistema nervoso central (9). A enzima, PAH, necessita de um cofator para funcionar, a tetrahydrobiopterina (BH4), o qual também é cofator da enzima tirosina hidroxilase (TH) e da triptofano hidroxilase (TPH). Cerca de 1-2% dos casos de hiperfenilalaninemia (HPA) são devidos a mutações nos genes que codificam as

enzimas envolvidas na biossíntese e regeneração do BH4 (figura 1b) (10,11). No entanto, alguns doentes com défices na biossíntese de BH4, como a Doença de Segawa e o défice em Sepiapterinoreductase, não manifestam hiperfenilalaninemia (12,13).

O gene *PAH*, compreende cerca de 100kb do DNA genómico humano e codifica uma proteína de 452 aminoácidos disposta num homotetrámero funcional. Este gene está mapeado no cromossoma 12q23.2 e é constituído por 13 exões e 12 regiões intrónicas (6,14). Presentemente, estão descritas mais de 1000 mutações no gene *PAH* associadas a PKU (*PAH*vdb; Phenylalanine Hydroxylase Gene Locus-Specific Database; <http://www.pahdb.mcgill.ca/> e BIOPKU; <http://www.biopku.org>) (15). A gravidade clínica dependerá dos níveis de fenilalanina, que por sua vez, refletem o grau de deficiência da enzima PAH, resultante das diversas mutações no gene que codifica esta enzima. Sendo que a maior parte destas mutações, são do tipo *missense* (90%) e a mutação c.1066-11G>A (IVS10-11G>A) é a mais frequente na população caucasiana (16-18). É importante a caracterização molecular da PKU, pois o tipo de mutação irá condicionar a atividade enzimática da PAH dos doentes, o que por sua vez, determinará o fenótipo bioquímico do doente. Uma atividade enzimática nula ou residual origina, regra geral, num fenótipo de PKU clássica (OMIM #261600), enquanto mutações que apenas inibem parcialmente a atividade enzimática, resultam em fenótipos moderados ou ligeiros de HPA. Existe assim um espectro de gravidade clínica que vai desde a “PKU clássica” (níveis de Phe sob dieta normal $\geq 1200\mu\text{mol/L}$ ou $>20\text{mg/dL}$), a “PKU moderada” (Phe $360\text{-}1200\mu\text{mol/L}$ ou $6\text{-}20\text{mg/dL}$), à hiperfenilalaninemia moderada (Phe $150\text{-}360\mu\text{mol/L}$ ou $2,5\text{-}6\text{mg/dL}$). Em geral, nos recém-nascidos, os níveis plasmáticos normais de Phe variam entre $35\text{-}100\mu\text{mol/L}$ (ou $0,6\text{-}1,7\text{mg/dL}$), com uma relação Phe/Tyr próximo de 1 (0,6-1,5) (19,20).

Regra geral, crianças com PKU não tratadas, apresentam diminuição de pigmentação e adquirindo um tom de pele e de cabelo mais claro que a restante família, devido a uma deficiência na síntese de melanina.



A prevalência desta doença, e as mutações mais comuns, diferem entre populações. Estima-se que na Europa a prevalência ao nascimento de PKU seja de 1:10.000 recém-nascidos (21), no entanto em algumas áreas, a frequência é ligeiramente maior (22), por exemplo, na população Andaluza, a prevalência é de 1:12.000 (23). Contrariamente, noutros países, como na Finlândia, a prevalência desta doença é a mais baixa da Europa; 1:100.000, de tal forma que a PKU não é incluída nos programas de rastreio neonatal (24,25). Em Portugal, a prevalência ao nascimento de PKU e de hiperfenilalaninemia moderada é de 1:10.929 e 1:36.123, respetivamente (26). O que significa que, em cada ano são rastreados aproximadamente 11 novos casos de PKU.

_Objetivos

Pretende-se com este trabalho, não só dar a conhecer os dados do rastreio neonatal da PKU em Portugal nos últimos 40 anos (1979-2019), como identificar e caracterizar as mutações causais da PKU/HPA na nossa população, contribuindo para a melhoria do diagnóstico/prognóstico de PKU/HPA. A análise mutacional de PKU/HPA na população portuguesa, permitirá também adequar a dieta de acordo com a relação genótipo-fenótipo. Por outro lado, pretende-se também reforçar a importância de um diagnóstico precoce, através do PNRN, minimizando assim, as consequências nefastas de um diagnóstico e terapia tardia.

Figura 1a: Via Metabólica da fenilalanina.

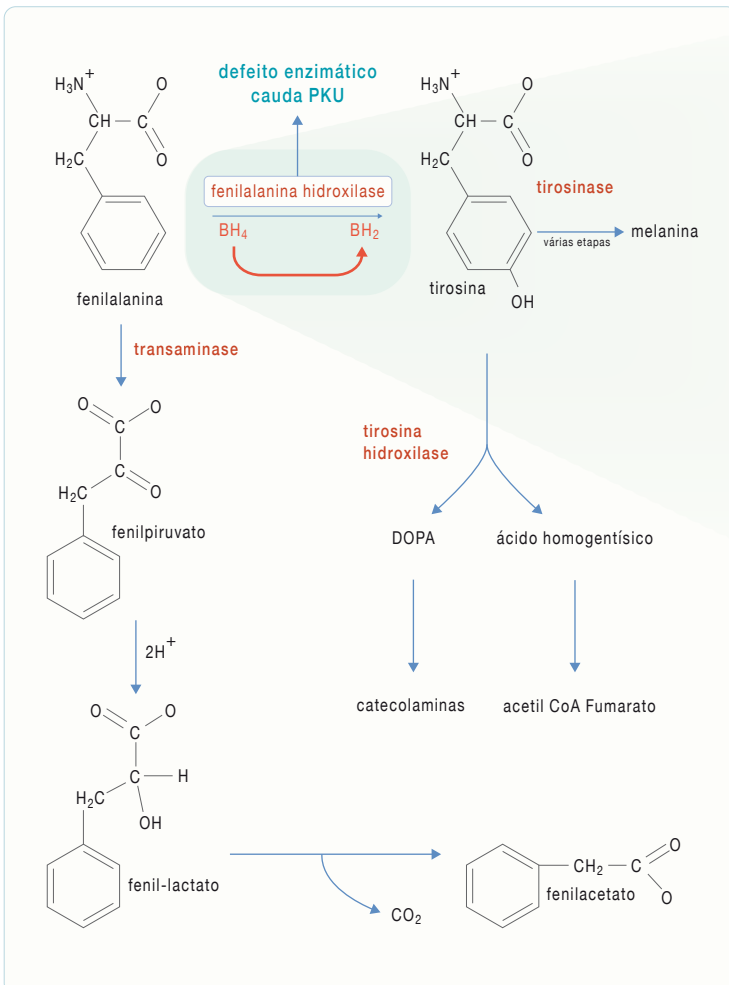
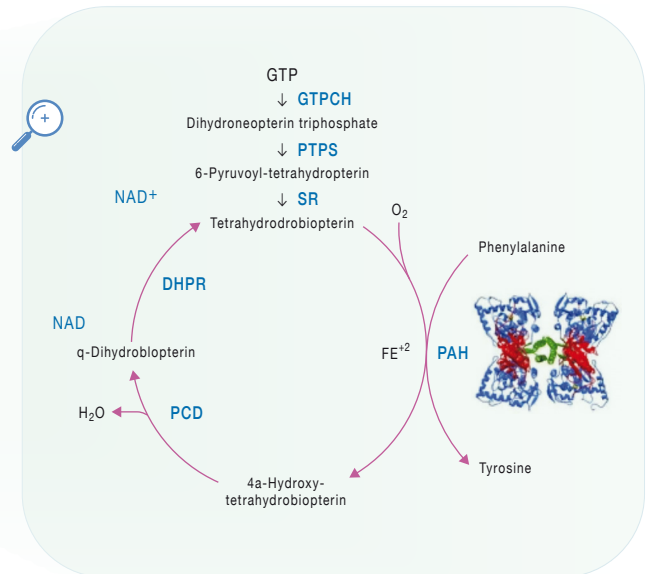


Figura 1b: Via de hidroxilação da fenilalanina e da síntese de BH4 (cofator).



In: van Wegberg AMJ, MacDonald A, Ahring K, et al. The complete European guidelines on phenylketonuria: diagnosis and treatment. Orphanet J Rare Dis. 2017 Oct 12;12(1):162. <https://doi.org/10.1186/s13023-017-0685-2>



_Material e métodos

Doentes

Até 2019, um total de 377 PKU/HPA foram detetados pelo PNRN. A maioria das amostras foram colhidas entre o 3º e o 6º dia de vida dos bebés nascidos em Portugal. Destes, 223 foram molecularmente caracterizados pela Unidade de Rastreio Neonatal (URN), representando cerca de 58% do total (223/377). Os restantes 154, já tinham sido estudados e publicados anteriormente (27). O diagnóstico de PKU/HPA é suspeito quando o nível de Phe no sangue é $\geq 6\text{mg/dL}$ ($360\ \mu\text{mol/L}$) numa amostra de sangue seco. Recém-nascidos, com níveis persistentes de Phe 2,5-6mg/dL e uma razão Phe/Tyr $>1,5$ são avaliados periodicamente nos Centros de Referência para o Tratamento de Doenças Hereditárias do Metabolismo (28). A dieta com restrição de fenilalanina é implementada sempre que os níveis de Phe sejam $\geq 6\text{mg/dL}$ ($360\ \mu\text{mol/L}$) (figura 2).

Caracterização molecular

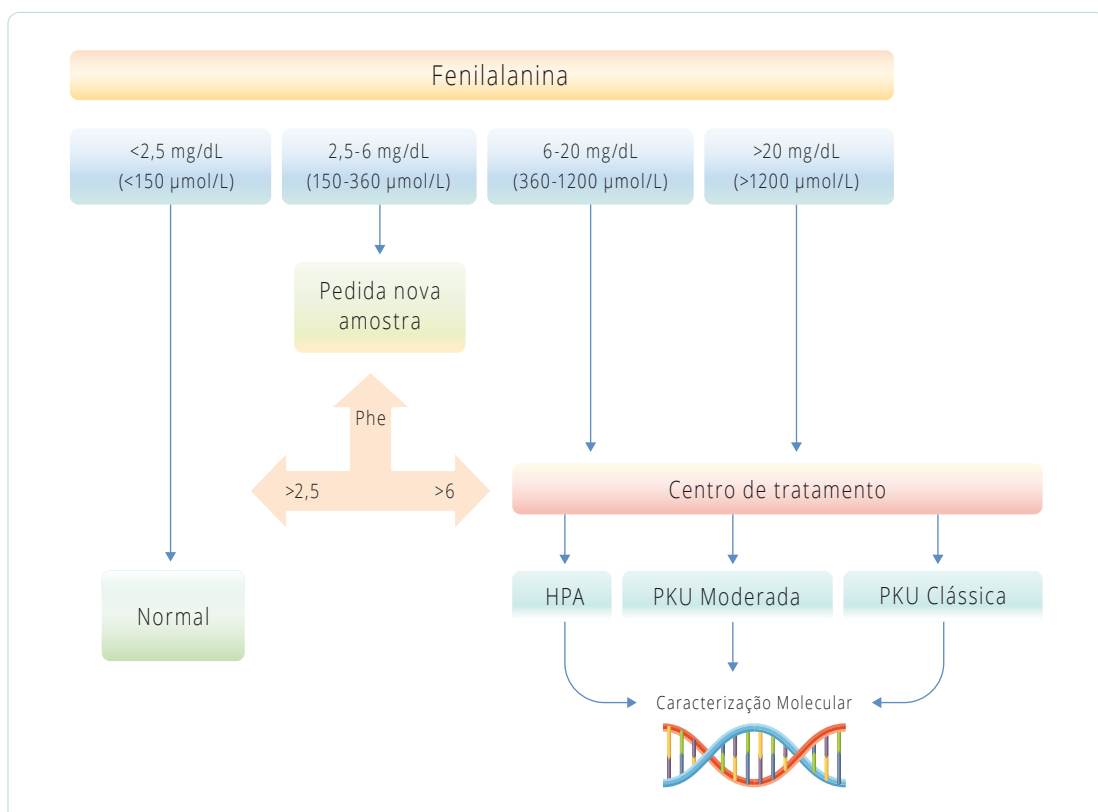
O DNA genómico foi extraído a partir de sangue total ou sangue seco em papel (EZ1, QIAGEN) e os 13 exões e as respectivas regiões flangeadoras do gene *PAH* (NM_000277.3) amplificadas e sequenciadas através de métodos tradicionais (método de Sanger e *Next Generation Sequencing*).

_Resultados

Espectro mutacional

A análise aos 223 doentes caracterizados do ponto de vista molecular e bioquímico revelou a existência de 56 mutações distintas, distribuídas por 129 genótipos diferentes. A maior parte dos doentes estudados foram compostos heterozigóticos (73,5%). As duas mutações patogénicas mais prevalentes na população portuguesa são: c.782G>A (p.Arg261Gln), encontrada em 63 doentes; seguida da mutação intrónica,

Figura 2: Algoritmo utilizado no rastreio neonatal de fenilcetonúria (PKU).





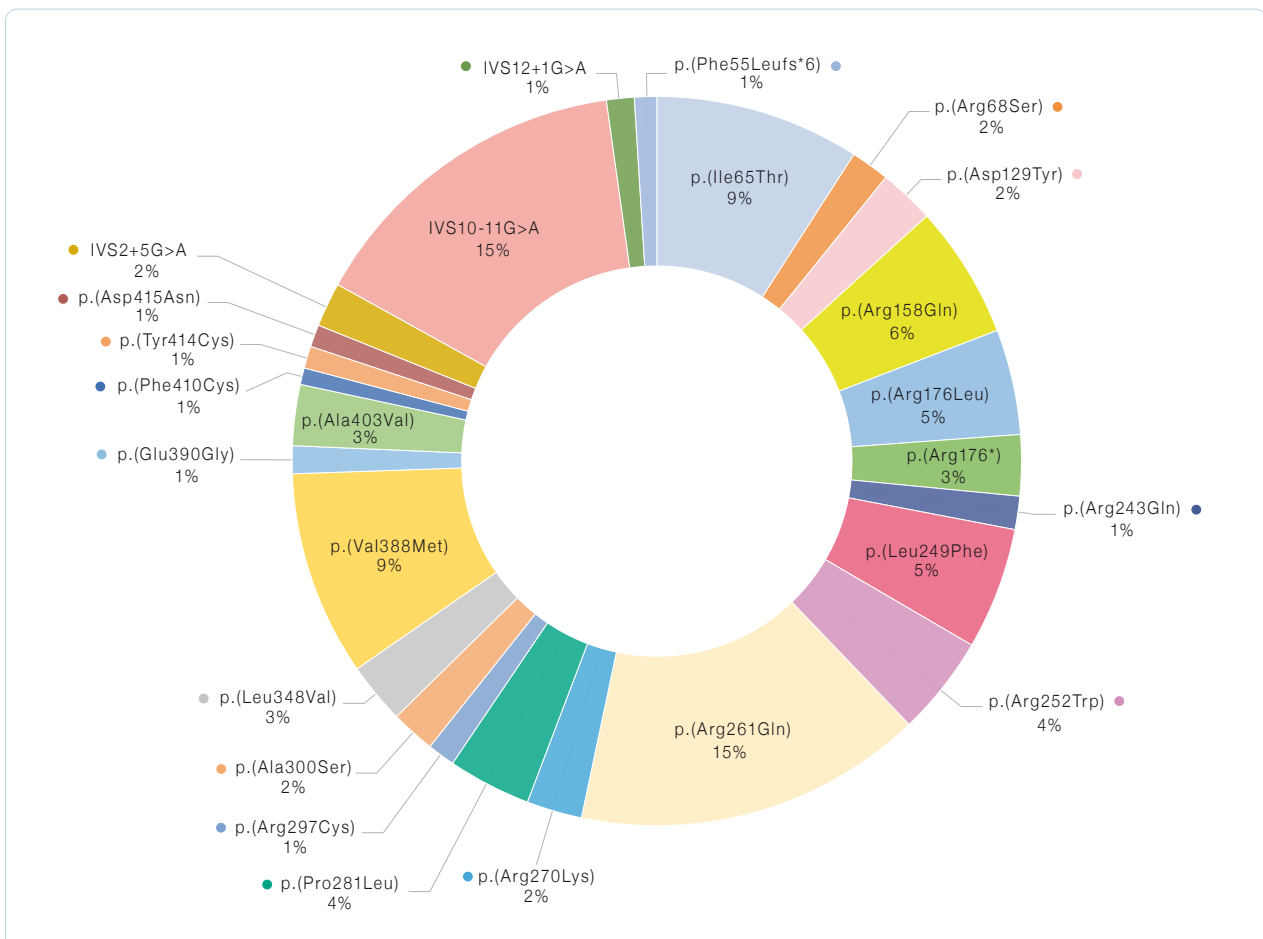
c.1066-11G>A (IVS10-11G>A) em 60 doentes. As mutações c.194T>C (p.Ile65Thr) e c.1162G>A (p.Val388Met) foram encontradas em 37 doentes, respetivamente. Entre os indivíduos homozigóticos, 17 eram portadores da mutação c.782G>A (p.Arg261Gln), 10 da mutação c.1066-11G>A (IVS10-11G>A), 6 da mutação c.473G>A p.(Arg158Gln), e 5 com a mutação c.1162G>A (p.Val388Met) (gráfico 1).

Verificou-se neste estudo, que a maioria das mutações se encontram distribuídas na proteína da seguinte forma: 35 no domínio catalítico (62,5%), 10 no domínio regulador (17,85%), 4 no domínio de tetramerização (7,14%) e 7 na região intrónica (12,5%). Não foi observado nenhuma mutação nos exões 1 e 13.

Espectro bioquímico

Relativamente à correlação entre o fenótipo bioquímico (valor de fenilalanina ao rastreio) e o genótipo, em indivíduos homozigóticos, para as cinco mutações mais frequentes na população portuguesa, verificou-se que a mutação que está associada com um largo espectro de valores de fenilalanina é a mutação intrónica c.1066-11G>A, cujos valores variaram desde 10,7 até 30mg/dL. Contrariamente, indivíduos homozigóticos para a mutação c.745C>T (p.Leu249Phe), mostraram ter valores de fenilalanina mais baixos (valor médio de 10,53mg/dL). A mutação mais comum na população portuguesa de PKU; c.782G>A (p.Arg261Gln), está associada com valores médios de Phe de 14,37mg/dL, enquanto que as mu-

Gráfico 1: ↴ Mutações mais frequentes nos 223 doentes estudados com fenilcetonúria (PKU).





tações c. 473G>A (p.Arg158Gln) e c.1162G>A (p.Val388Met), os valores médios de Phe foram 19,86mg/dL e 12,69mg/dL, respetivamente.

_Discussão

Com este estudo pretendeu-se dar a conhecer os dados do rastreio da PKU, focando particularmente no espectro mutacional da fenilcetonúria, na população portuguesa ao longo de 40 anos de Programa de Rastreio Neonatal (1979-2019). Dos resultados obtidos, observou-se uma grande heterogeneidade, com 56 mutações distribuídas por 129 genótipos diferentes, a maioria delas do tipo *missense* (76,8%). Estes resultados estão de acordo com os publicados na literatura para países do sul da Europa e Mediterrâneo, mas claramente diferente daqueles referentes a países da Europa central e norte da Europa onde as mutações prevalentes são: c.1315+1G>C (IVS12+1G>C) e c.1222C>T (p.Arg408Trp) (16,29-31).

Dos resultados obtidos, verificou-se a existência de quatro mutações prevalentes: c.782G>A (p.Arg261Gln), c.1066-11G>A (IVS10-11G>A), c.1162G>A (p.Val388Met) e c.194T>C (p.Ile65Thr), representando cerca de 44,17% do total de alelos estudados. Esta frequência está em concordância com estudos anteriormente publicados, envolvendo a população portuguesa (4,27,32-36).

A mutação intrónica c.1066-11G>A (IVS10-11G>A) é a mais comum na base de dados de PAH e dada a sua frequência na zona do Mediterrâneo, tem sido descrita como a “mutação do Mediterrâneo” (20,27,37-39). A terceira mutação, mais comum encontrada neste estudo, foi a c.194T>C (p.Ile65Thr), sendo que esta mutação é bastante frequente também em Espanha e Irlanda (20). Para além destas mutações, foram também encontradas outras mutações com considerável incidência na população portuguesa (entre 5,38% e 2,24%), nomeadamente: c.473G>A (p.Arg158Gln), c.527G>T (p.Arg176Leu), c.745C>T (p.Leu249Phe), c.754C>T (p.Arg252Trp), c.842C>T (p.Pro281Leu); c.526C>T (p.Arg176*), c.1042C>G (p.Leu348Val), c.1208C>T (p.Ala403Val), c.385G>T (p.Asp129Tyr) e c.809G>A (p.Arg270Lys).

De ressaltar, que a mutação c.1222C>T (p.Arg408Trp), descrita como sendo a nível mundial a mutação mais prevalente de PKU, na população portuguesa apenas foi identificada em heterozigotia num indivíduo. Esta mutação é a mais comum no norte da Europa (40-42).

_Conclusões

A fenilcetonúria (PKU) é a aminoacidopatia mais comum na população caucasiana e tornou-se o paradigma de uma doença que pode ser facilmente identificada através de um rastreio sistemático e que, tratada atempadamente, evita a deterioração neurológica grave com atraso mental profundo.

Os resultados obtidos do estudo do espectro mutacional da PKU são dados de epidemiologia molecular relevantes, pois são indicativos do grau de disfunção proteica, e/ou atividade residual e consequentemente do fenótipo metabólico a esperar. A classificação dos diferentes genótipos de PAH, permitirá o prognóstico do fenótipo bioquímico e metabólico e pode ser útil como ferramenta preditiva no tratamento das hiperfenilalaninemias no recém-nascido (43-45). O diagnóstico diferencial de HPA é crucial para distinguir crianças com HPA por défices na enzima PAH, e HPA por défices de BH4 (cofator), pois o tratamento e prognóstico da doença, são diferentes.

Assim, é extremamente importante o rastreio neonatal desta patologia, através do PNRN. Este, permitirá detetar precocemente esta doença e iniciar nos primeiros dias de vida, o tratamento adequado, restrito em fenilalanina, e que evitará situações irreversíveis de atrasos de desenvolvimento motor, cognitivo e intelectual. O diagnóstico diferencial de HPA é crucial para distinguir crianças com deficiência da PAH (em 98% dos casos) das deficiências resultantes por défice de BH4 (2% dos casos). Uma vez feito o diagnóstico, é importante a caracterização molecular, pois não só contribuirá para um melhor conhecimento da relação genótipo-fenótipo, como também para o prognóstico do sucesso da resposta terapêutica e ainda permitirá o aconselhamento genético adequado.



Referências bibliográficas:

- (1) Magalhães J, Osório R. O Programa Nacional de Diagnóstico Precoce. *J. Med.* 1984;2080: 322-325.
- (2) Magalhães J, Osório R, Alves J, Soares P. Le Dépistage de la Phénylcétonurie et de l'Hypothyroïdie Congénitale au Portugal. *La Dépeche.* 1986:40-47
- (3) Osório R, Soares P. Rastreo e Tratamento do Hipotiroidismo Congénito em Portugal. *Arq. Med.* 1987;3:243-48.
- (4) Osório RV, Vilarinho L, Soares JP. Rastreo nacional da fenilcetonúria, hipotiroidismo congénito e hiperplasia congénita das suprarrenais. *Acta Med Port.* 1992 Mar;5(3):131-4.
<http://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/3215/2554>
- (5) Despacho n.º 7276/2019. DR, 2.ª série (Parte c), n.º 156 (16/8/2019):141-147. Aprova o Programa Nacional do Rastreo Neonatal (PNRN) e determina a sua implementação pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I. P.
<https://dre.pt/application/conteudo/124006819>
- (6) Scriver CR, Kaufman S, Eisensmith RC, et al. The hyperphenylalaninemias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al (eds). *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995, Vol 1, pp. 1015-77.
- (7) Erlandsen H, Stevens RC. The structural basis of phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* 1999 Oct;68(2):103-25. <https://doi.org/10.1006/mgme.1999.2922>
- (8) Madden M. Phenylketonuria: defects in amino acid metabolism. *Mol Med.* 2004;5: 57-61.
- (9) Anderson PJ, Leuzzi V. White matter pathology in phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* 2010;99 Suppl 1:S3-9. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2009.10.005>
- (10) Thöny B, Blau N. Mutations in the BH4-metabolizing genes GTP cyclohydrolase I, 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase, sepiapterin reductase, carbinolamine-4a-dehydratase, and dihydropteridine reductase. *Hum Mutat.* 2006 Sep;27(9):870-8. <https://doi.org/10.1002/humu.20366>
- (11) Blau N, Thöny B, Cotton RGH, et al. Disorders of tetrahydrobiopterin and related biogenic amines. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al.(eds). *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* 8th ed. New York: McGraw-Hill, 2001, pp 1725-76.
- (12) Ichinose H, Ohye T, Takahashi E, et al. Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutations in the GTP cyclohydrolase I gene. *Nat Genet.* 1994 Nov;8(3):236-42. <https://doi.org/10.1038/ng1194-236>
- (13) Bonafé L, Thöny B, Penzien JM, et al. Mutations in the sepiapterin reductase gene cause a novel tetrahydrobiopterin-dependent monoamine-neurotransmitter deficiency without hyperphenylalaninemia. *Am J Hum Genet.* 2001 Aug;69(2):269-77. <https://doi.org/10.1086/321970>
- (14) Donlon J, Sarkissian C, Levy H, et al. Hyperphenylalaninemia: Phenylalanine hydroxylase deficiency. In: Beaudet AL, Vogelstein B, Kinzler KW, et al. (eds). *The online metabolic and molecular bases of inherited disease.* New York: McGraw-Hill, 2014.
- (15) Blau N, Shen N, Carducci C. Molecular genetics and diagnosis of phenylketonuria: state of the art. *Expert Rev Mol Diagn.* 2014 Jul;14(6):655-71. <https://doi.org/10.1586/14737159.2014.923760>
- (16) Guldberg P, Henriksen KF, Güttler F. Molecular analysis of phenylketonuria in Denmark: 99% of the mutations detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Genomics.* 1993 Jul;17(1):141-6. <https://doi.org/10.1006/geno.1993.1295>
- (17) Pérez B, Desviat LR, Ugarte M. Analysis of the phenylalanine hydroxylase gene in the Spanish population: mutation profile and association with intragenic polymorphic markers. *Am J Hum Genet.* 1997 Jan;60(1):95-102. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1712559/>
- (18) Birk Møller L, Nygren AO, Scott P, et al. Low proportion of whole exon deletions causing phenylketonuria in Denmark and Germany. *Hum Mutat.* 2007 Feb;28(2):207. <https://doi.org/10.1002/humu.9481>
- (19) Vallian S, Barahimi E, Moeini H. Phenylketonuria in Iranian population: a study in institutions for mentally retarded in Isfahan. *Mutat Res.* 2003 May 15;526(1-2):45-52. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(03\)00015-0](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(03)00015-0)
- (20) Zschocke J. Phenylketonuria mutations in Europe. *Hum Mutat.* 2003 Apr;21(4):345-56. <https://doi.org/10.1002/humu.10192>
- (21) Loeber JG. Neonatal screening in Europe; the situation in 2004. *J Inher Metab Dis.* 2007 Aug;30(4):430-8. <https://doi.org/10.1007/s10545-007-0644-5>. Erratum in: *J Inher Metab Dis.* 2008 Jun;31(3):469. <https://doi.org/10.1007/s10545-007-0644-5>
- (22) Blau N, van Spronsen FJ, Levy HL. Phenylketonuria. *Lancet.* 2010 Oct 23;376(9750):1417-27. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60961-0. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(10\)60961-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(10)60961-0)
- (23) Delgado Pellecín C, García-Valdecasas MS, Bueno Delgado MA, et al. Experiencia del cribado neonatal ampliado en el Hospital Universitario Virgen del Rocío. *Acta Pediatr Esp.* 2011;69:89.
- (24) Guldberg P, Henriksen KF, Sipilä I, Güttler F, de la Chapelle A. Phenylketonuria in a low incidence population: molecular characterisation of mutations in Finland. *J Med Genet.* 1995 Dec;32(12):976-8. <https://doi.org/10.1136/jmg.32.12.976>
- (25) Scriver CR, Kaufman S. Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. In: Scriver CR, Beaudet A, Sly WS, et al. (eds). *The metabolic and molecular bases of inherited disease,* 8th ed. New York: McGraw Hill, 2001, pp. 1667-1724.
- (26) Vilarinho L, Garcia P, Pinho e Costa P. Programa Nacional de Rastreo Neonatal: relatório 2019. Lisboa: INSA, 2020. (In press)
- (27) Rivera I, Mendes D, Afonso Â, et al. Phenylalanine hydroxylase deficiency: molecular epidemiology and predictable BH4-responsiveness in South Portugal PKU patients. *Mol Genet Metab.* 2011;104 Suppl:S86-92. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.07.026>
- (28) Despacho n.º 3653/2016, de 7 de março. DR 2.ª série, n.º 50 (11/3/2016): 8724. Centros de Referência para o Tratamento das Doenças Hereditárias do Metabolismo. <https://dre.pt/application/file/a/75017024>
- (29) Jaruzelska J, Matuszak R, Lyonnet S, et al. Genetic background of clinical homogeneity of phenylketonuria in Poland. *J Med Genet.* 1993 Mar;30(3):232-4. <https://doi.org/10.1136/jmg.30.3.232>
- (30) Guldberg P, Rey F, Zschocke J, et al. A European multicenter study of phenylalanine hydroxylase deficiency: classification of 105 mutations and a general system for genotype-based prediction of metabolic phenotype. *Am J Hum Genet.* 1998 Jul;63(1):71-9. <https://doi.org/10.1086/301920>. Erratum in: *Am J Hum Genet* 1998 Oct;63(4):1252-3.
- (31) Gundorova P, Stepanova AA, Kuznetsova IA, et al. Genotypes of 2579 patients with phenylketonuria reveal a high rate of BH4 non-responders in Russia. *PLoS One.* 2019 Jan 22;14(1):e0211048. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211048>
- (32) Rivera I, Leandro P, Lichter-Konecki U, et al. Relative frequency of IVS10nt546 mutation in a Portuguese phenylketonuric population. *Hum Mutat.* 1997;9(3):272-3. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1997\)9:3<272::AID-HUMU9>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1997)9:3<272::AID-HUMU9>3.0.CO;2-9)
- (33) Rivera I, Leandro P, Lichter-Konecki U, Tavares de Almeida I, Lechner MC. Population genetics of hyperphenylalaninaemia resulting from phenylalanine hydroxylase deficiency in Portugal. *J Med Genet.* 1998 Apr;35(4):301-4. <https://doi.org/10.1136/jmg.35.4.301>
- (34) Acosta A, Silva W Jr, Carvalho T, et al. Mutations of the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene in Brazilian patients with phenylketonuria. *Hum Mutat.* 2001 Feb;17(2):122-30. [https://doi.org/10.1002/1098-1004\(200102\)17:2<122::AID-HUMU4>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1098-1004(200102)17:2<122::AID-HUMU4>3.0.CO;2-C)
- (35) Vilarinho L, Queirós A, Leandro P, et al. Fenilcetonúria Revisitada. *Arquivos de Medicina.* 2006;20(5-6):161-71. <http://www.scielo.mec.pt/pdf/am/v20n5-6/v20n5-6a03.pdf>
- (36) Vilarinho L, Esteves S, Ramos E, et al. PAH mutational spectrum: still expanding! *Open J Genet.* 2011;1(2):9-12. <https://doi.org/10.4236/ojgen.2011.12002>
- (37) Okano Y, Wang T, Eisensmith RC, et al. Phenylketonuria missense mutations in the Mediterranean. *Genomics.* 1991 Jan;9(1):96-103. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(91\)90225-4](https://doi.org/10.1016/0888-7543(91)90225-4)
- (38) Aldámiz-Echevarría L, Llàrena M, Bueno MA, et al. Molecular epidemiology, genotype-phenotype correlation and BH4 responsiveness in Spanish patients with phenylketonuria. *J Hum Genet.* 2016 Aug;61(8):731-44. <https://doi.org/10.1038/jhg.2016.38>



- (39) Vieira Neto E, Laranjeira F, Quelhas D, et al. Mutation analysis of the PAH gene in phenylketonuria patients from Rio de Janeiro, Southeast Brazil. *Mol Genet Genomic Med.* 2018 May 10;6(4):575–91. <https://doi.org/10.1002/mgg3.408>
- (40) Giannattasio S, Jurgelevicius V, Lattanzio P, et al. Phenylketonuria mutations and linked haplotypes in the Lithuanian population: origin of the most common R408W mutation. *Hum Hered.* 1997 May-Jun;47(3):155-60. <https://doi.org/10.1159/000154403>
- (41) Lilliväli H, Ounap K, Metspalu A. Phenylalanine hydroxylase gene mutation R408W is present on 84% of Estonian phenylketonuria chromosomes. *Eur J Hum Genet.* 1996;4(5):296-300. <https://doi.org/10.1159/000472217>
- (42) Lilliväli H, Reinson K, Muru K, et al. The evaluation of phenylalanine levels in Estonian phenylketonuria patients during eight years by electronic laboratory records. *Mol Genet Metab Rep.* 2019 Mar 23;19:100467. <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2019.100467>
- (43) Kayaalp E, Treacy E, Waters PJ, et al. Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: a metanalysis of genotype-phenotype correlations. *Am J Hum Genet.* 1997 Dec;61(6):1309-17. <https://doi.org/10.1086/301638>
- (44) Gámez A, Pérez B, Ugarte M, et al. Expression analysis of phenylketonuria mutations. Effect on folding and stability of the phenylalanine hydroxylase protein. *J Biol Chem.* 2000 Sep 22;275(38):29737-42. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003231200>
- (45) Waters PJ. How PAH gene mutations cause hyper-phenylalaninemia and why mechanism matters: insights from in vitro expression. *Hum Mutat.* 2003 Apr;21(4):357-69. <https://doi.org/10.1002/humu.10197>



Bem-estar subjetivo da população portuguesa em 2018: um estudo sobre o florescimento psicológico

Subjective well-being of the Portuguese population in 2018: a study about psychological flourishing

Ana João Santos, Ana Rita Torres, Ausenda Machado, Mariana Neto

ana.carvalho@insa.min-saude.pt

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

_Resumo

A integração do conceito subjetivo de bem-estar na compreensão e contextualização de saúde, reflete a evidência do seu impacto no estado de saúde, qualidade de vida e longevidade. O Florescimento Psicológico (FP) é um conceito recente que capta o bem-estar subjetivo, entendido enquanto a vivência de emoções positivas e um funcionamento psicológico e social igualmente positivo. Este trabalho teve como objetivo descrever o FP na população portuguesa em 2018, total e estratificada por sexo, grupo etário, região, escolaridade e situação de trabalho. Utilizaram-se os dados do inquérito ao painel ECOS (Em Casa Observamos Saúde), conduzido no ano de 2018. A amostra (com base nas Unidades de Alojamento com telefone fixo e móvel) foi selecionada de modo a ser representativa das principais regiões. O número de respondentes incluídos na amostra final corresponde a 1131 indivíduos. A escala de FP indicou que 55,8% da população portuguesa apresentava bem-estar subjetivo, sentia-se bem consigo próprio e a funcionar de forma eficaz. As mulheres e os grupos etários mais velhos reportaram menos frequentemente FP, bem como os indivíduos com menos habilitações literárias e fora do mercado de trabalho (desempregados, estudantes e domésticos). Estes resultados sugerem subgrupos específicos com uma perceção menos positiva do seu bem-estar.

_Abstract

The inclusion of well-being, as a subjective concept, in health understanding and conceptualization, reflects further evidence of its impact on health status, quality of life and longevity. Psychological Flourishing (PF) is a recent concept that describes well-being as a measure of both positive emotions and positive psychological and social functioning. The study aimed to describe the PF in the Portuguese population in 2018, total and stratified by sex, age group, region, schooling, and work situation. The employed data is part of the ECOS study (Em Casa Observamos Saúde - At Home we Observe Health) conducted in 2018. The sample (based on Accommodation Units with fixed and mobile phones) was selected to be representative of the main regions. The final sample corresponds to 1131 individuals. The PF scale indicated that 55.8% of the Portuguese population perceived subjective well-being, as in feeling good about oneself and functioning effectively. Women and individuals in older age groups reported less frequently PF, as well as individuals with less years of schooling and without employment (unemployed, students and domestic). These results suggest specific subgroups with a less positive perception of their well-being.

_Introdução

A integração dos conceitos de bem-estar e de qualidade de vida na definição de saúde das populações é cada vez mais consensual e alinha-se com a definição da Organização Mundial de Saúde, de 1948, onde o “bem-estar” é afirmado como parte integral ⁽¹⁾.

O bem-estar, enquanto conceito inalienável desta perspetiva de saúde, é também um constructo subjetivo, na medida em que se trata da experiência subjetiva de felicidade ⁽²⁾. Conquanto o bem-estar reflita, para alguns, um conceito idealizado, não sendo uma medida suficientemente objetiva para ser usada como meta para os serviços de saúde ou enquanto indicador operacional de saúde; sabe-se que o bem-estar subjetivo influencia positivamente a saúde física e a saúde mental, com efeitos eventuais sobre a longevidade ⁽²⁾.

Efetivamente, durante vários anos, muitos investigadores estudaram diversas formas de bem-estar de forma individualizada, sendo que há pouco mais de uma década se começou a explorar o conceito de florescimento psicológico ⁽³⁾. O florescimento psicológico (*flourishing*), enquanto a vivência de emoções positivas e um funcionamento psicológico e social igualmente positivo ^(3,4), pode ser assim entendido como um estado onde o sujeito se sente bem e sente que funciona bem ou de forma eficaz ⁽⁴⁾. Este conceito integra duas perspetivas de bem-estar. Refere-se de um modo geral ao bem-estar emocional, incluindo emoções positivas, como o a balanço afetivo positivo, felicidade ou sentimentos prazerosos (bem-estar hedónico), bem como ao potencial humano, à capacidade e perspetiva de realização pessoal, crescimento pessoal e funcionamento eficaz (bem-estar eudemónico) ^(4,5).



Neste sentido, e numa perspectiva de medição da saúde dos indivíduos, é importante captar também esta dimensão do bem-estar.

_Objetivo

Descrever o florescimento psicológico na população portuguesa em 2018, total e estratificada por sexo, grupo etário, região NUTS II de residência, escolaridade e face à situação de trabalho.

_Métodos

Os dados utilizados são provenientes do inquérito ao painel ECOS (Em Casa Observamos Saúde), conduzido pelo Departamento de Epidemiologia do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) no ano de 2018, com período de recolha de 06/12/2018 a 06/02/2019 (6,7). A amostra, com delineamento probabilístico e multietápico, teve como base as Unidades de Alojamento (UA) de Portugal com telefone fixo e móvel, e foi selecionada de modo a ser representativa das populações das principais regiões (NUTS II de 1989 (8)) de Portugal em 2018. O número de respondentes incluídos na amostra final corresponde a 1131 indivíduos (6,7).

A escala de florescimento psicológico (*flourishing scale*), validada para Portugal (8), é constituída por oito *itens* que integram as diferentes componentes do FP que podem variar em sete pontos de uma escala do tipo Likert (de 1 que corresponde a “Discordo completamente” a 7 para “Concordo completamente”). A soma obtida pela pontuação dos diferentes *itens* corresponderá à riqueza psicológica, que varia entre 8 e 56. Utilizou-se a mediana da distribuição da pontuação como limite para a definição de caso de florescimento psicológico (9). Esta abordagem identifica os respondentes que terão assinalado as opções “Concordo” e “Concordo completamente” nos oito *itens* da escala.

Apresentam-se as estatísticas descritivas dos *itens* da escala, bem como as respetivas estimativas de florescimento psicológico (FP) ponderadas para a população portuguesa quanto à idade, sexo, região e desenho amostral dos casos de FP, estratificados por sexo, grupo etário,

região NUTS II de residência, escolaridade e situação face ao trabalho. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa informático STATA V.15.1 for Windows® (Stata Corp, College Station, TX, USA).

_Resultados

Os resultados da escala de florescimento psicológico variaram entre uma pontuação de 20 e de 56. A média obtida mostra pouca variação entre os diferentes *itens* (variou entre 5,39[IC: 5,25-5,52] e 6,22[IC: 6,15-6,28]) e indica que a população apresentou, em geral, a sua concordância com as diferentes afirmações (tabela 1). Entre todos os *itens*, a perceção de que se é competente (*Item 5*), de que se é respeitado (*Item 8*) e de se estar envolvido e interessado nas atividades diárias (*Item 3*) foram os *itens* que apresentaram uma melhor pontuação (proporção mais elevada de indivíduos a concordarem completamente). Já o otimismo em relação ao futuro (*Item 7*) foi o *item* que apresentou uma pontuação mais baixa.

Estimou-se que 55,8% [50,53-60,90] da população apresentava, em 2018, valores de FP acima do valor mediano de resposta, podendo ser classificados como casos de florescimento psicológico, com maiores recursos psicológicos e melhor funcionamento.

Valores indicativos de florescimento psicológico foram mais frequentemente reportados pelos homens do que pelas mulheres (59,6% vs. 52,4%) e nos grupos etários mais jovens (59,6% dos 18 aos 44 anos vs. 47,19% dos indivíduos com 65 e mais anos) (tabela 2). O valor é mais baixo no grupo com menos habilitações literárias (51,2%) e no grupo dos desempregados, estudantes ou domésticos (45,1%).

No plano regional, as estimativas não mostram grande variação entre as diferentes regiões. Os resultados variaram entre 53,4% e 58,9%, sendo as populações do Alentejo e da RA da Madeira as que apresentam os valores de estimativa pontual mais elevados, seguidas das populações do Algarve e do Centro.



Tabela 1: Descrição da proporção ponderada de respondentes de acordo com o grau de concordância com cada uma das oito afirmações para avaliação de florescimento psicológico na população portuguesa (painel ECOS 1998/1999).

Itens	1 %(IC95%)	2 %(IC95%)	3 %(IC95%)	4 %(IC95%)	5 %(IC95%)	6 %(IC95%)	7 %(IC95%)	Média %(IC95%)
1. Levo uma vida com propósito e significado	0,9 (0,2-2,6)	0,8 (0,4-1,6)	0,8 (0,3-1,8)	6,6 (4,6-9,5)	14,1 (10,8-18,2)	44,4 (39,6-49,6)	32,4 (27,6-37,6)	5,95 (5,84-6,06)
2. As minhas relações sociais dão-me suporte e são recompensadoras	0,5 (0,2-1,0)	1,2 (0,5-2,9)	1,8 (0,8-3,8)	5,4 (3,8-7,6)	16,4 (12,8-20,8)	49,5 (44,4-54,7)	25,2 (20,8-30,3)	5,86 (5,75-5,96)
3. Estou envolvido e interessado nas minhas atividades diárias	0,2 (0,03-0,4)	0,5 (0,02-1)	1,5 (0,7-3,3)	4,8 (2,9-7,7)	12,6 (9,5-16,5)	44,5 (39,4-49,6)	36,0 (31,1-41,2)	6,06 (5,97-6,16)
4. Contribuo ativamente para a felicidade e bem-estar dos outros	7e-0,4 (1e04 -0,5)	0,1 (0,4-2,8)	0,2 (0e04-0,7)	3,6 (1,9-6,3)	9,9 (7,1-13,8)	54,1 (48,9-59,2)	31,1 (26,6-35,9)	6,09 (6,00-6,18)
5. Sou competente e capaz de fazer as atividades que são importantes para mim	0,1 (7e-04-0,7)	0,4 (0,2-0,8)	1,6 (0,8-3,4)	3,4 (2,2-5,2)	8,0 (5,8-10,9)	50,2 (45-55,3)	36,4 (31,5-41,6)	6,15 (6,07-6,23)
6. Sou uma boa pessoa e vivo uma boa vida	—	1,3 (0,7-2,4)	1,1 (0,4-3,0)	3,3 (2,1-5,0)	13,6 (10,3-17,7)	54,1 (48,9-59,2)	26,7 (22,3-31,6)	5,98 (5,89-6,07)
7. Sou otimista acerca do meu futuro	0,9 (0,5-1,6)	3,8 (2,3-6,1)	3,6 (2,3-5,6)	17,9 (14,3-22,2)	17,9 (14,3-22,1)	33,1 (28,4-38,2)	22,8 (18,7-27,6)	5,39 (5,25-5,52)
8. As pessoas respeitam-me	2e-0,4	0,2 (3e-04-0,8)	0,9 (0,4-2,1)	1,0 (0,5-1,7)	8,7 (6,2-12,2)	53,1 (47,9-58,2)	36,1 (31,4-41,0)	6,22 (6,15-6,28)

Tabela 2: Florescimento psicológico em Portugal, por sexo, grupos etários, regiões NUTS II, nível de escolaridade e situação face ao trabalho na população portuguesa (estimativas), (painel ECOS 1998/1999).

Variáveis	n (amostra)	% ponderada	IC95%
Sexo			
Homens	231	59,60	51,21-67,46
Mulheres	362	52,41	45,90-58,83
Grupos etários			
18 aos 44	183	59,63	49,56-68,94
45 aos 64	237	57,08	49,54-64,30
65+ anos	173	47,19	39,77-54,74
Regiões			
Norte	91	55,78	45,28-65,79
Centro	83	56,22	46,29-65,67
Lisboa e Vale do Tejo	81	54,38	43,00-65,32
Alentejo	88	58,93	49,22-67,99
Algarve	85	56,18	45,45-66,35
RA Madeira	82	57,80	47,26-67,68
RA Açores	83	53,44	43,52-63,09

Variáveis	n (amostra)	% ponderada	IC95%
Nível de escolaridade			
Nenhum ou básico	315	51,16	44,16-58,11
Secundário	131	68,87	57,96-78,01
Superior	147	54,01	43,01-64,63
Situação face ao trabalho			
Trabalhador/a conta própria	54	56,87	38,31-73,69
Trabalhador/a conta de outrem	272	60,84	52,68-68,44
Reformado/a	193	50,91	43,68-58,10
Outros (doméstico/a, estudante, desempregado)	74	45,14	30,32-60,87



_Discussão

O bem-estar subjetivo avaliado pelo presente estudo indica que cerca de metade da população portuguesa apresentava valores indicativos de florescimento psicológico, tendo a grande maioria afirmado concordar com afirmações positivas sobre o seu bem-estar emocional e sobre o seu funcionamento.

Neste estudo, e tal como observado para outros aspetos e determinantes de saúde ⁽²⁾ são as mulheres e os grupos etários mais velhos que reportam menos frequentemente FP, bem como os indivíduos com menos habilitações literárias e fora do mercado de trabalho (desempregados, estudantes e domésticos). De facto, Schotanus-Dijkstra ⁽¹⁰⁾ fazem uma revisão dos fatores associados ao bem-estar, tendo identificado um conjunto substancial de literatura a indicar que características como o género, o nível de ensino e o emprego remunerado estão relacionados ao bem-estar subjetivo e ao bem-estar psicológico. Já estudos especificamente realizados sobre o florescimento psicológico indicam que os homens, adultos entre 45 e 54 anos, indivíduos com 16 ou mais anos de educação e os casados tinham maior probabilidade de florescer ^(4,5,10).

Tratando-se o bem-estar subjetivo não apenas de um resultado desejável, mas também de um importante fator associado à saúde física, longevidade e qualidade de vida ⁽³⁾, é necessário continuar a explorar a associação entre as características sociodemográficas identificadas e estes aspetos.

_Conclusão

Os resultados deste estudo indicam que cerca de metade da população portuguesa, em 2018, apresentava bem-estar subjetivo, sentia-se bem consigo próprio e a funcionar de forma eficaz. Alguns subgrupos específicos da população manifestam menos frequentemente este bem-estar: as mulheres; os indivíduos com 65 e mais anos; os indivíduos com menos habilitações literárias e fora do mercado de trabalho (desempregados, estudantes e domésticos).

Referências bibliográficas:

- (1) World Health Organization. Basic documents. Geneva: WHO, 1984.
- (2) Quartilho MJR. Qualidade de vida, felicidade, saúde, bem-estar, satisfação. Pessoas, sociedades, culturas. Que importa?. In: Fundação C. Canavarro MC, Serra V (eds). Qualidade de vida e saúde: uma abordagem na perspetiva da Organização Mundial da Saúde. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2010, pp. 55-126.
- (3) Francisco R, Raposo B, Sesifredo M. Promoção da Saúde e Bem-Estar dos Adolescentes: uma Via para o Florescimento?. *Psychol Pract Res J*. 2018;1(1):S34-35. (Comunicação Oral, 4º Congresso Ordem dos Psicólogos Portugueses, 2018). <https://doi.org/10.33525/pprj.v1i1.63>
- (4) Keyes CL. The mental health continuum: from languishing to flourishing in life. *J Health Soc Behav*. 2002 Jun;43(2):207-22.
- (5) Keyes CLM, Fredrickson BL, Park N. Positive psychology and the quality of life. In: Land KC, Michalos AC, Sirgy MJ (eds). *Handbook of Social Indicators and Quality of Life Research*. Dordrecht: Springer, 2012, pp. 99-112. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2421-1_5
- (6) Santos AJ, Torres AR, Machado A, et al. Saúde e bem-estar da população portuguesa em 2018. Lisboa: INSA, 2020.
- (7) Machado A, Roquette R, Sousa-Uva M, et al. Em Casa Observamos Saúde (ECOS) por telefone e via eletrónica: resultados da implementação da 1ª vaga de 2016. *Boletim Epidemiológico Observações*. 2016 maio-agosto;5(16):18-11. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/3887>
- (8) Silva Aj, Caetano A. Validation of the Flourishing Scale and Scale of Positive and Negative Experience in Portugal. *Soc Indic Res*. 2013;110(2):469-78. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11205-011-9938-y>
- (9) Hone LC, Jarden A, Schofield GM, et al. Measuring flourishing: The impact of operational definitions on the prevalence of high levels of wellbeing. *Int J Wellbeing*. 2014;4(1):62-90. <https://internationaljournalofwellbeing.org/index.php/ijow/article/view/286>
- (10) Schotanus-Dijkstra M, Pieterse ME, Drossaert CHC, et al. What Factors are Associated with Flourishing? Results from a Large Representative National Sample. *J Happiness Stud*. 2016;17(4):1351-70. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10902-015-9647-3>



ficha técnica_

_ Título: Boletim Epidemiológico Observações

_ Periodicidade: Quadrimestral

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

_ Numeração: 2ª série

Volume 9, número 28, 2020
setembro – dezembro 2020

_ Diretor

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

_ Editores

Carlos **Matias Dias**, Departamento de Epidemiologia

Elvira **Silvestre**, Biblioteca da Saúde

_ Conselho Editorial Científico

Carlos **Matias Dias**, Departamento de Epidemiologia

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

Jorge **Machado**, Departamento de Doenças Infeciosas

Manuela **Cano**, Departamento de Saúde Ambiental

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

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

Peter **Jordan**, Conselho Científico do INSA

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

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

© Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP 2020.

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