

# Observações

— Boletim Epidemiológico

## sumário\_

### \_Editorial

**Tratamento de dados pessoais no âmbito da investigação científica: prazos de conservação** p03

*Processing personal data for scientific research purposes: period of storage*

*Nina de Sousa Santos, em nome e representação da Comissão de Ética do INSA*

### \_Artigos breves

#### \_Doenças infecciosas

**1\_ Efetividade da vacina contra a COVID-19: implementação de estudo de coorte em profissionais de saúde dos hospitais em Portugal** p05

*COVID-19 vaccine effectiveness: implementation of a cohort study of health care workers from hospitals in Portugal*

*Vânia Gaio, Adriana Silva, Palmira Amaral, João Faro Viana, Isabel Antunes, João Gonçalves, Lígia A. Gonçalves, Pedro Leite, Ausenda Machado; Project Research Group*

#### \_Saúde ambiental e ocupacional

**2\_ Caracterização da exposição ao tabaco durante a gravidez e da sua influência em indicadores de saúde neonatal: projeto NeoGene** p10

*Characterization of exposure to tobacco smoke during pregnancy and its influence on perinatal outcomes: NeoGene project*

*Joana Madureira, Ana Inês Silva, Alexandra Camelo, Ana Teresa Reis, Ana Paula Machado, Ana Isabel Ribeiro, João Paulo Teixeira, Carla Costa*

**3\_ Exposição a substâncias químicas na indústria da gestão de resíduos elétricos e eletrónicos e seus potenciais efeitos na saúde dos trabalhadores** p17

*Exposure to chemicals in the e-waste management industry and potential health effects on workers*

*Rodrigo Moreira, Ana M. Tavares, Henriqueta Louro, Célia Ventura, Carina Ladeira, Susana Viegas, Maria João Silva*

#### \_Alimentação e nutrição

**4\_ Monitorização da composição nutricional de alimentos prontos a consumir para pequeno-almoço e lanche, disponíveis no mercado português em 2021, com relevância para crianças em idade escolar** p22

*Monitoring nutritional composition of ready-to-eat breakfast and snack foods, available in the Portuguese market in 2021, with relevance to school-age children*

*Andreia Lopes, Paulo Fernandes, Roberto Brazão, Sidney Tomé, M. Graça Dias*

**5\_ Monitorização dos teores de energia, lípidos, ácidos gordos saturados e sal numa seleção de alimentos prontos para consumo disponíveis no mercado português, 2021** p29

*Monitoring energy, fat, saturated fatty acids and salt content on a selection of ready-to-eat food available in the Portuguese market, 2021*

*Paulo Fernandes, Andreia Lopes, Roberto Brazão, Sidney Tomé, M. Graça Dias*

**6\_ Comparação de três métodos para deteção de Salmonella em diversos géneros alimentícios** p34

*Comparison of three methods for Salmonella detection in different categories of foodstuffs*

*Rosália Furtado, Anabela Coelho, Marisa Morais, Ana Lúcia Leitão, Margarida Saraiva, Cristina Belo Correia, Rita Batista*

#### \_Doenças cardiovasculares e hepatobiliares

**7\_ Aplicação da metodologia Seis Sigma nos parâmetros colesterol total, colesterol LDL e triglicéridos** p39

*Application of the Six Sigma methodology in the parameters total cholesterol, LDL cholesterol and triglycerides*

*Ana Patrícia Alberto, Ana Faria, Armandina Miranda, Helena Correia, Vicente Constantino, José Gomes Requeijo*

**8\_ Estudo para a determinação dos valores de referência das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e gama- glutamil transferase (GGT), no soro** p44

*Study for the determination of the reference values of the enzymes aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and gama- glutamyl transferase (GGT), in serum*

*Marta Alvim, Ana Catarina Alves, Margarida Vaz, Suza Almeida, José Vicente Constantino, Mafalda Bourbon*





*\_Perturbações do desenvolvimento infantil*

- 9\_ Perturbação do espectro do autismo: identificação de variantes em genes envolvidos no mecanismo regulador da expressão génica *nonsense-mediated mRNA decay*** **p 49**  
*Autism spectrum disorder: identification of gene variants involved in the nonsense-mediated mRNA decay*

Ana Rita Marques, João Xavier Santos, Hugo Martiniano, Joana Vilela, Célia Rasga, Luísa Romão, Astrid Moura Vicente

*\_Sequenciação genómica*

- 10\_ Avaliação do desempenho de uma *core-facility* de sequenciação genómica especializada em saúde pública** **p 55**  
*Performance evaluation of a genomic sequencing core-facility specialized in public health*

Luís Vieira, Catarina Silva, Sílvia Duarte, Joana Mendonça, Dina Carpinteiro, Daniel A. Sampaio, José Ferrão, Daniela Santos, Miguel Machado, Joana Isidro, Paula Barreiro, Glória Isidro



## Tratamento de dados pessoais no âmbito da investigação científica: prazos de conservação

*Processing personal data for scientific research purposes: period of storage*

O tratamento de dados pessoais no âmbito da investigação científica tem suscitado diversas questões nas diferentes dimensões da regulamentação aplicável. Um desses aspetos, por vezes omissos nos projetos de investigação, é o prazo de conservação dos dados pessoais e das suas categorias especiais (dados biométricos, de saúde e genéticos), que deve constar do documento de informação aos participantes e encontrar-se devidamente sustentado nos princípios éticos da beneficência e justiça/utilidade.

A conservação de dados pessoais inclui-se no conceito de 'tratamento' de dados pessoais, conforme definição prevista na al. 2) do art. 4.º <sup>(i)</sup> do Regulamento Geral sobre a Proteção de Dados (RGPD) da União Europeia <sup>(1)</sup>.

Os dados pessoais são conservados de modo a permitir a identificação dos titulares dos dados apenas durante o período necessário para as finalidades para as quais são tratados, mas podem ser conservados durante períodos mais longos, caso sejam tratados para fins de investigação científica nos termos do n.º 1 do art. 89.º do RGPD, ficando sujeitos à aplicação das medidas técnicas e organizativas adequadas <sup>(ii)</sup>, a fim de salvaguardar os direitos e liberdades do titular dos dados <sup>(iii)</sup>.

Aquando da recolha dos dados pessoais, o responsável pelo tratamento deve fornecer ao titular, ou a quem o substitua, informação sobre o prazo de conservação dos dados pessoais ou, se não for possível, os critérios usados para definir esse prazo <sup>(iv)</sup>.

O art. 21.º da Lei n.º 58/2019, de 8 de agosto <sup>(2)</sup>, que assegura a execução, na ordem jurídica nacional, do RGPD, regula os prazos para conservação dos dados pessoais, destacando-se o seguinte:

- a) O prazo de conservação de dados pessoais é o que estiver fixado por norma legal ou regulamentar ou, na falta desta, o que se revele necessário para a prossecução da finalidade.
- b) Quando, pela natureza e finalidade do tratamento, designadamente para fins de investigação científica, não seja possível determinar antecipadamente o momento em que o mesmo deixa de ser necessário, é lícita a conservação dos dados pessoais, desde que sejam adotadas medidas técnicas e organizativas adequadas a garantir os direitos do titular dos dados, designadamente a informação da sua conservação.
- c) Quando cesse a finalidade que motivou o tratamento, inicial ou posterior, de dados pessoais, o responsável pelo tratamento deve proceder à sua destruição ou anonimização.

Tendo em consideração o enquadramento ético e legal descrito, a Comissão de Ética do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) recomenda que na conceção de projetos de investigação científica do Instituto se tenha em conta o seguinte:

- I. Os dados pessoais devem ser limitados ao necessário face às finalidades/aos objetivos do seu tratamento.
- II. O prazo de conservação dos dados deve ser limitado ao mínimo e sempre fundamentado no protocolo do estudo face às finalidades/aos objetivos que visam atingir.
- III. Quando o prazo de conservação dos dados deva ser mais longo para assegurar as finalidades/os objetivos do estudo poderá fixar-se, fundamentadamente <sup>(v)</sup>, um prazo de 10, 20, 30 ou mais anos, conforme adequado, prevendo a avaliação intercalar da necessidade de conservar os dados pessoais, a cada, no mínimo, 5 anos.



- IV. Os protocolos dos estudos devem sempre especificar as medidas técnicas e organizativas adotadas para a conservação adequada dos dados.
- V. O prazo de conservação dos dados e a sua fundamentação devem constar sempre do documento de Informação ao Participante e da minuta da Declaração de Consentimento Informado e Esclarecido.
- VI. A anonimização dos dados, a sua eliminação após a conclusão do estudo, bem como a adoção de medidas razoáveis que permitam a sua oportuna retificação, devem ser sempre previstas.

Para conhecimento completo sobre os elementos que devem constar do documento de Informação ao Participante, a Comissão de Ética do INSA disponibiliza documentação de apoio no *website* institucional, em:

<https://www.insa.min-saude.pt/category/institucional/comissao-de-etica/>

Nina de Sousa Santos,

em nome e representação da Comissão de Ética do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

#### Referências bibliográficas:

- (1) Regulamento (UE) 2016/679 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 27 de abril de 2016, relativo à proteção das pessoas singulares no que diz respeito ao tratamento de dados pessoais e à livre circulação desses dados e que revoga a Diretiva 95/46/CE
- (2) Lei n.º 58/2019, de 8 de agosto. DR 1ª Série, n.º 151 (08-08-2019):3-40. Assegura a execução, na ordem jurídica nacional, do Regulamento (UE) 2016/679 do Parlamento e do Conselho, de 27 de abril de 2016, relativo à proteção das pessoas singulares no que diz respeito ao tratamento de dados pessoais e à livre circulação desses dados. <https://data.dre.pt/eli/lei/58/2019/08/08/p/dre/pt/html>
- (i) "«Tratamento», uma operação ou um conjunto de operações efetuadas sobre dados pessoais ou sobre conjuntos de dados pessoais, por meios automatizados ou não automatizados, tais como a recolha, o registo, a organização, a estruturação, a conservação, a adaptação ou alteração, a recuperação, a consulta, a utilização, a divulgação por transmissão, difusão ou qualquer outra forma de disponibilização, a comparação ou interconexão, a limitação, o apagamento ou a destruição;"
- (ii) As medidas técnicas e organizativas aplicam-se à conservação dos dados e visam assegurar que os dados pessoais não sejam disponibilizados sem intervenção humana a um número indeterminado de pessoas singulares, cfr. n.º 2 do art. 25.º do RGPD.
- (iii) cfr. al. e) do n.º 1 do art. 5.º do RGPD
- (iv) (cfr. al. a) do n.º 2 do art. 13.º e al. a) do n.º 2 do art. 14.º do RGPD
- (v) A fundamentação deverá descrever o interesse público da investigação, e o benefício potencial, direto ou indireto, dos resultados do estudo na População Portuguesa, os eventuais benefícios para os Participantes, bem como, ter em conta o desenvolvimento futuro dos meios técnicos que possam contribuir para o apuramento dos resultados da investigação.



## Efetividade da vacina contra a COVID-19: implementação de estudo de coorte em profissionais de saúde dos hospitais em Portugal

*COVID-19 vaccine effectiveness: implementation of a cohort study of health care workers from hospitals in Portugal*

Vânia Gaio<sup>1</sup>, Adriana Silva<sup>1</sup>, Palmira Amaral<sup>2</sup>, João Faro Viana<sup>3</sup>, Isabel Antunes<sup>4</sup>, João Gonçalves<sup>5</sup>, Lígia A. Gonçalves<sup>6</sup>, Pedro Leite<sup>7</sup>, Ausenda Machado<sup>1</sup>; Project Research Group\*

vania.gαιο@insa.min-saude.pt

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

(2) Centro Hospitalar Tondela-Viseu, Viseu, Portugal

(3) Centro Hospitalar Lisboa Ocidental, Lisboa, Portugal

(4) Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal

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

(6) Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal

(7) Direção-Geral da Saúde, Lisboa, Portugal

### Resumo

Num contexto de pandemia, os profissionais de saúde dos hospitais são considerados um grupo de elevado risco para a infeção por SARS-CoV-2 sendo um grupo prioritário para a vacinação. Apesar dos bons resultados da eficácia das vacinas nos ensaios clínicos, são muitos os fatores que podem influenciar a sua eficácia no mundo real (efetividade). Com base num desenho de estudo de coorte prospetivo, desenvolveu-se um projeto cujo objetivo foi avaliar a efetividade da vacina contra a COVID-19 em profissionais de saúde no ambiente hospitalar. Foram recrutados 2367 profissionais de saúde e o seguimento do estudo ocorreu até abril de 2022. A maioria reportou ser enfermeiro (39,8%), do sexo feminino (80,7%) e do grupo etário 40-49 anos (29,5%). Verificou-se ainda que 95,3% dos participantes tinham vacinação completa. Adicionalmente, 3,1% dos profissionais reportou ter tido infeção por SARS-CoV-2 antes da vacinação e 2,8% reportou infeção após vacinação completa. Numa altura em que praticamente toda a população se encontra vacinada contra a COVID-19 é essencial a existência de estudos para o apoio à decisão política na gestão da pandemia e das medidas de saúde pública que possam ser necessárias de implementar.

### Abstract

*In a pandemic context, healthcare workers from hospitals are considered a high risk group for SARS-CoV-2 infection and are a priority group for vaccination. Despite the good results of vaccine efficacy in clinical trials, there are many factors that can influence the vaccine's efficacy in the real world (effectiveness). Based on a prospective cohort study design, a project was developed to evaluate the effectiveness of the vaccine against COVID-19 in healthcare workers in the hospital environment. 2367 health professionals were recruited and followed until April 2022. The majority reported being a nurse (39.8%), female (80.7%) and aged 40-49 years (29.5%). It was also found that 95.3% of the participants had complete vaccination. Additionally, 3.1% of the professionals reported SARS-CoV-2 infection before complete vaccination and 2.8% reported infection after complete vaccination. At a time when practically the entire*

*population is vaccinated against COVID-19, it is important to have studies that support the pandemic management policy and the public health measures that could be necessary to implement.*

### Introdução

Num contexto de pandemia, os profissionais de saúde dos hospitais são considerados um grupo de elevado risco para a infeção por SARS-CoV-2 decorrente do contacto próximo com pacientes infetados. Acresce ao anterior, a possibilidade de transmissão da infeção a pacientes suscetíveis de desenvolver uma doença mais grave (1). Deste modo, os profissionais de saúde foram identificados como sendo um grupo prioritário para a vacinação que, em Portugal, se iniciou a 26 de dezembro de 2020 (2).

Apesar dos bons resultados da eficácia das vacinas nos ensaios clínicos realizados até ao momento, são muitos os fatores que podem influenciar a eficácia de uma vacina no mundo real (efetividade), fora do ambiente controlado dos ensaios clínicos. É assim essencial realizar estudos de efetividade da vacina na população em geral e também nos grupos de risco como os profissionais de saúde (3).

Com base num desenho de estudo de coorte prospetivo, desenvolveu-se um projeto com o objetivo de avaliar a efetividade da vacina contra a COVID-19 em profissionais de saúde no ambiente hospitalar. Este projeto foi desenvolvido em sete países da Europa (Croácia, Estónia, Grécia, Irlanda, Itália, Portugal e Espanha), tendo sido utilizada



uma metodologia harmonizada de forma a permitir uma análise conjunta de todos os países participantes. Este estudo, financiado pelo Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças, foi desenvolvido em Portugal pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge em parceria com a Direção-Geral da Saúde, a Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, o Instituto Gulbenkian de Ciência, o Centro Hospitalar Tondela-Viseu (CHTV), o Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), o Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental (CHLO), o Hospital Beatriz Ângelo (HBA) e o Hospital Garcia de Orta (HGO).

### **\_Objetivo**

Neste artigo é feita a descrição metodológica do estudo implementado para avaliar a efetividade da vacina contra a COVID-19 em profissionais de saúde no ambiente hospitalar.

### **\_Metodologia**

#### ***Desenho de estudo e população***

Trata-se de um estudo de coorte prospetivo cuja população-alvo foram todos os profissionais de saúde de hospitais (todas as categorias profissionais), elegíveis para vacinação contra COVID-19, sem contraindicação para vacinação, que consentiram participar e que faziam parte de um dos centros hospitalares participantes no estudo. Os hospitais participantes foram: Centro Hospitalar Tondela-Viseu, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental, Hospital Beatriz Ângelo e o Hospital Garcia de Orta.

#### ***Definição da exposição e do outcome***

Um indivíduo foi considerado vacinado 14 dias após a vacinação completa (recebendo todas as doses recomendadas nas características do produto). Um indivíduo é considerado não vacinado se não recebeu nenhuma dose da vacina COVID-19. Um indivíduo é considerado parcialmente vacinado 14 dias após receber a primeira dose e até receber a segunda dose.

O *outcome* principal do estudo foi a confirmação laboratorial por RT-PCR de infeção sintomática por SARS-CoV-2 de acordo com a definição de caso suspeito da Organização Mundial de Saúde (4). Adicionalmente em alguns hospitais, foram realizados também testes serológicos, nomeadamente a quantificação dos anticorpos IgG contra SARS-CoV-2 que foram medidos em amostras de soro colhidas em diferentes momentos antes da vacinação e 30 dias, 3, 6 e 12 meses após vacinação. Tendo em conta que a vacinação dos profissionais de saúde começou antes do início deste estudo, alguma informação foi recolhida retrospectivamente, sempre que tal tenha sido possível.

#### ***Procedimentos e informação a recolher***

Todos os profissionais de saúde dos hospitais foram convidados a participar no estudo através do envio de *email*. Após aceitação de participação, que implicou a obtenção de consentimento assinado, o profissional de saúde respondeu a um questionário inicial, apenas uma única vez, e ao questionário semanal, todas as semanas até ao fim do seguimento. A resposta a ambos os questionários foi efetuada *online* através da plataforma REDcap.

Ao longo do seguimento, que se iniciou em maio de 2021 e terminou em abril de 2022, foram recolhidas amostras respiratórias para realização de teste RT-PCR, sempre que houve sintomas compatíveis com a COVID-19 declarados pelo profissional. Adicionalmente, foi feita a colheita de sangue venoso para a determinação de anticorpos contra o SARS-CoV-2 nos momentos anteriormente descritos.

No que respeita à informação recolhida através do questionário inicial, esta incluiu informação sociodemográfica, do estado de saúde, do historial de vacinação para infeções respiratórias incluindo a gripe, da infeção prévia por SARS-CoV-2, da exposição ocupacional e comunitária, dos comportamentos preventivos e do estado vacinal contra a COVID-19. Relativamente ao questionário semanal, foi recolhida informação sobre a sintomatologia referente aos últimos 7 dias bem com a exposição ocupacional e comunitária de cada profissional de saúde.



### Aspetos éticos

O consentimento informado por escrito foi obtido de todos os participantes do estudo. Todos os participantes foram informados de que a sua participação era voluntária e que poderiam desistir a qualquer momento sem terem que apresentar justificação e sem qualquer consequência nomeadamente quanto à oferta de vacinação. Este estudo foi aprovado pelas comissões de ética dos hospitais participantes, nomeadamente pela comissão de ética do CHTV, CHLO, CHUC e comissão de ética da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa que se pronunciou sobre a implementação do projeto no HBA e HGO. Foi também aprovado pela Comissão de Ética do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

### \_Resultados

Apresentam-se os resultados preliminares relativos à descrição da coorte, quanto à distribuição dos participantes e caracterização do estado vacinal, tipo de vacina e infeção por SARS-CoV-2.

Até ao dia 24/10/2021 foram recrutados um total de 2367 profissionais de saúde (CHTV: 809–34%, CHLO: 603–25%, CHUC: 583–25%, HGO: 280–12%, HBA: 92–4%). No [gráfico 1](#) é apresentada a distribuição dos participantes, de acordo com o sexo e grupo etário. A maioria dos profissionais de saúde participantes é do sexo feminino (80,7%) e pertencente ao grupo etário dos 40 aos 49 anos (29,5%).

No [gráfico 2](#) é apresentada a distribuição dos participantes de acordo com a categoria profissional a que pertencem. A maioria dos profissionais participantes são Enfermeiros (39,8%), Médicos (18,6%) e Auxiliares de Ação Médica (12,2%).

Relativamente ao estado vacinal e infeção por SARS-CoV-2 ([gráfico 3](#)), verificamos que 95,3% dos profissionais de saúde participantes têm vacinação completa, sendo a vacina da Pfizer a mais frequentemente administrada (79,7%).

Quanto à infeção por SARS-CoV-2, 3,1% dos profissionais reportou ter tido infeção por SARS-CoV-2 antes de ter sido vacinado e 2,8% reportou ter já sido infetado pelo vírus SARS-CoV-2 após vacinação completa ([gráfico 3](#)).

**Gráfico 1:** ↓ Distribuição dos participantes no estudo, de acordo com o sexo (n=2367) e grupo etário (n=2341).

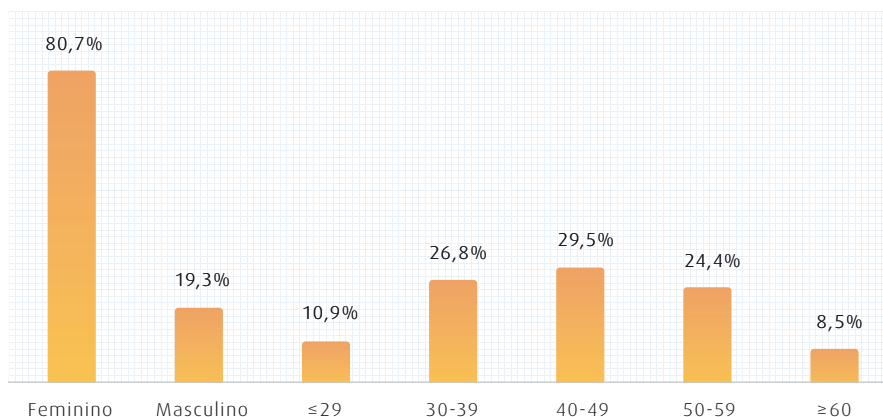




Gráfico 2: ▾ Distribuição dos participantes no estudo, de acordo com a categoria profissional (n=2318).

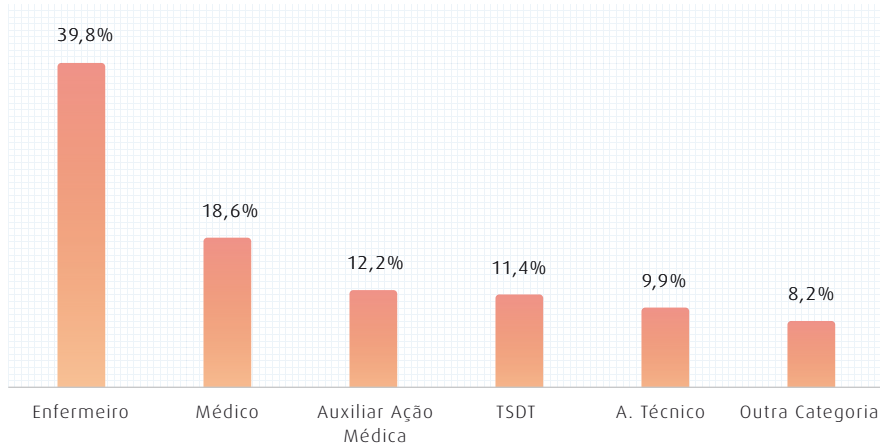
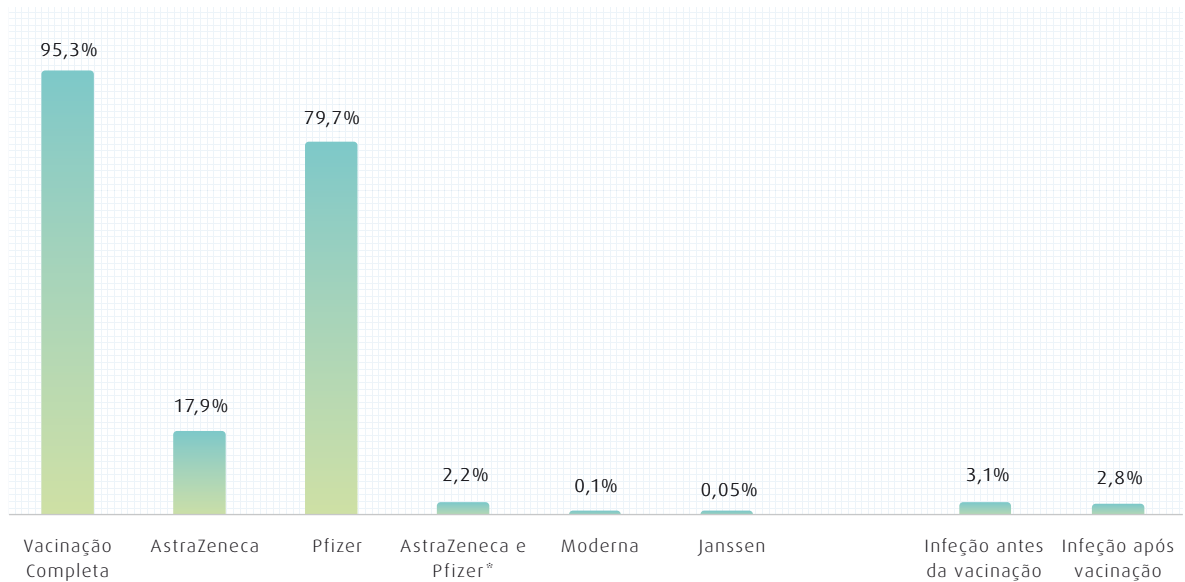


Gráfico 3: ▾ Caracterização do estado vacinal (n=2125), tipo de vacina (n=2084) e infeção por SARS-CoV-2 (n=1948) nos profissionais de saúde participantes no estudo.



\* Primeira dose AstraZeneca e segunda dose Pfizer.



## \_Considerações finais

Durante o mês de novembro foi encerrada a fase de recrutamento dos profissionais de saúde que fizeram parte da coorte seguida até abril de 2022.

Com este estudo, pretendeu-se obter informação sobre a efetividade da vacina nos profissionais de saúde dos hospitais. Numa altura em que praticamente toda a população se encontra vacinada contra a COVID-19 é essencial a existência de estudos, em especial nos grupos de maior risco, como é o caso dos profissionais de saúde, de forma a monitorizar a efetividade da vacina ao longo do tempo.

Estes estudos são uma ferramenta essencial para o apoio à decisão política na gestão da pandemia e das medidas de saúde pública que sejam necessárias de implementar.

\* **COVID-19 vaccine effectiveness among healthcare workers in Portugal (Project Research Group):** Adriana Silva (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge), Alexandra Lima o que (Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental), Ana Catarina Dias (Centro Hospitalar Tondela-Viseu), Ana Paula Rodrigues (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge), André Peralta Santos (Direção-Geral da Saúde), Artur Paiva (Centro Hospitalar Universitário de Coimbra), Ausenda Machado (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge), Baltazar Nunes (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge), Carlos Matias Dias (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge), Carlos Penha Gonçalves (Instituto Gulbenkian de Ciência), Elvira Perea (Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental), Inês Costa (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge), Irina Kislaya (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge), Isabel Antunes (Centro Hospitalar Universitário de Coimbra), João Gonçalves (Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa), João Paulo Gomes (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge), Jocelyne Demengeot (Instituto Gulbenkian de Ciência), Lígia Antunes Gonçalves (Instituto Gulbenkian de Ciência), Lucília Araújo (Centro Hospitalar Universitário de Coimbra), Nuno Verdasca (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge), Palmira Amaral

(Centro Hospitalar Tondela-Viseu), Patrícia Conde (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge), Pedro Pinto Leite (Direção-Geral da Saúde), Raquel Guiomar (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge), Sandra Martins (Direção-Geral da Saúde), Vânia Gaio (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge), Vânia Pacheco (Centro Hospitalar Universitário de Coimbra).

## Referências bibliográficas:

- (1) WHO/Regional Office for Europe. Health workers at risk, older adults and residents of long-term care facilities to be prioritized for COVID-19 vaccination [online] (23-11-2020). [consult. 1/2/2021]. <https://www.euro.who.int/en/health-topics/health-emergencies/coronavirus-covid-19/news/news/2020/11/health-workers-at-risk,-older-adults-and-residents-of-long-term-care-facilities-to-be-prioritized-for-covid-19-vaccination>
- (2) Ministério da Saúde. Plano de Vacinação COVID-19 (17 de dezembro de 2020). Lisboa: MS, 2020. <https://www.sns.gov.pt/vacinacaocovid19/plano-de-vacinacao-covid-19/>
- (3) Patel MM, Jackson ML, Ferdinands J. Postlicensure Evaluation of COVID-19 Vaccines. JAMA. 2020 Nov 17;324(19):1939-40. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.19328>
- (4) World Health Organization. WHO COVID-19: case definitions: updated in public health surveillance for COVID-19, published 16 December 2020. Geneva: WHO, 2020. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/337834>

## Caracterização da exposição ao tabaco durante a gravidez e da sua influência em indicadores de saúde neonatal: projeto NeoGene

### Characterization of exposure to tobacco smoke during pregnancy and its influence on perinatal outcomes: NeoGene project

Joana Madureira<sup>1,2,3</sup>, Ana Inês Silva<sup>1,2,3,4</sup>, Alexandra Camelo<sup>1,2</sup>, Ana Teresa Reis<sup>1,2,3</sup>, Ana Paula Machado<sup>5</sup>, Ana Isabel Ribeiro<sup>2,3</sup>, João Paulo Teixeira<sup>1,2,3</sup>, Carla Costa<sup>1,2,3</sup>

joao.teixeira@insa.min-saude.pt

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

(2) Unidade de Investigação em Epidemiologia, Instituto de Saúde Pública, Universidade do Porto, Porto, Portugal

(3) Laboratório para a Investigação Integrativa e Translacional em Saúde Populacional, Porto, Portugal

(4) Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Porto, Portugal

(5) Departamento de Obstetrícia e Ginecologia, Centro Hospitalar de São João, Porto Portugal

#### \_Resumo

O tabagismo e a exposição ao fumo ambiental do tabaco (ou exposição passiva) estão associados a vários efeitos adversos na saúde, particularmente em períodos de maior suscetibilidade como o período pré-natal. Como condição essencial para o delineamento de estratégias mais adequadas e efetivas de promoção de saúde e prevenção de doença associadas, torna-se essencial caracterizar detalhadamente a exposição ao tabaco no início da vida e conhecer a sua influência em diferentes indicadores de saúde neonatal. Para tal, foi analisada informação individual e clínica de 595 grávidas com mais de 36 semanas de gestação, em consulta no Serviço de Obstetrícia e Ginecologia do Centro Hospitalar de S. João, entre abril de 2017 e julho de 2018. Foram também analisados indicadores de saúde neonatais dos respetivos recém-nascidos por consulta dos seus processos clínicos. Os resultados deste estudo mostram uma prevalência do consumo do tabaco de 27,9% antes da gravidez, valor que diminuiu para 12,9% ao nascimento, como resultado de uma cessação tabágica de 46,4% durante a gestação. Em termos de exposição passiva ao fumo do tabaco, verificou-se que 31,7% das participantes não fumadoras estavam diariamente expostas, durante mais de uma hora, antes da gravidez, e que houve uma diminuição da exposição ao longo da gravidez (26,3% no terceiro trimestre). A análise da associação entre os indicadores de saúde neonatal e os comportamentos tabágicos apontam para uma diminuição do peso, tamanho e perímetro cefálico ao nascimento entre os recém-nascidos das participantes fumadoras, valores que aumentam nos casos em que há cessação tabágica durante a gravidez.

#### \_Abstract

Tobacco exposure (use and passive exposure) can adversely impact human health, particularly in specific windows of susceptibility, such as the in utero period. As an essential condition for the design of adequate and effective strategies for health promotion and disease prevention, it is crucial to characterize the exposure to tobacco smoke in early life, and to investigate its influence on different perinatal outcomes. For that purpose, individual and clinical data from 595 pregnant women who sought prenatal care at Centro Hospitalar de S. João, between April

2017 and July 2018, were analysed. In addition, information on perinatal indicators were obtained using birth medical records. The smoking prevalence before pregnancy was 27.9% and reduced to 12.9% at birth; 46.4% of the participants reported to have stopped smoking during pregnancy. Concurrently, the prevalence of passive tobacco exposure among non-smoking pregnant women decrease throughout the pregnancy from 31.7% that reported daily exposure for at least one hour prior to pregnancy, to 26.3% in the third trimester. Maternal active smoking in the third trimester of pregnancy was associated with a decrease in birth weight, length and head circumference; the indicators were found to increase in cases where smoking cessation occurred during pregnancy.

#### \_Introdução

O tabagismo é considerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) a principal causa evitável de morte (1), vitimando anualmente cerca de 8 milhões de pessoas em todo o mundo (2) e cerca de 10 mil portugueses (3), devido a doenças provocadas ou agravadas pelo consumo de tabaco.

Apesar do conhecimento generalizado acerca dos efeitos do tabaco na saúde humana (seja consumo ou exposição passiva), e do atual quadro legislativo e respetivas ações de educação e informação que visam a prevenção do tabagismo e a proteção da exposição involuntária ao fumo ambiental do tabaco (4), tem-se verificado um aumento do consumo de tabaco entre as mulheres em Portugal (5). No que se refere ao período da gravidez, um estudo realizado em Portugal entre 2005 e 2006 por Alves et al., 2013 (6) reportou uma prevalência de mulheres fumadoras de 23% no início da gra-



videz, sendo que 12% não modificaram os seus hábitos tabágicos durante a gestação. Dados nacionais mais recentes (2017-2018) apontam para um consumo de tabaco durante a gravidez de 14% (7). A literatura científica indica que os hábitos tabágicos da grávida podem contribuir para um maior risco de ocorrência de complicações obstétricas e neonatais, entre as quais se contam o aborto espontâneo, gravidez ectópica, prematuridade, baixo peso e comprimento ao nascimento, bem como menor perímetro cefálico (8-10). No entanto, o tabagismo é um fator de risco modificável que pode ser prevenido; mais ainda, muitos autores consideram que a gravidez pode constituir uma oportunidade única para intervenções de cessação tabágica (11,12).

No que diz respeito à exposição passiva ao fumo do tabaco, os únicos dados disponíveis para a população portuguesa mostram que, em 2015, 12,8% dos portugueses estavam expostos ao fumo ambiental do tabaco pelo menos uma hora por dia (13). Apesar do fumo passivo ser classificado pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) como cancerígeno para humanos desde 2015 (14), não existem dados sobre a exposição a este fator de risco entre mulheres grávidas em Portugal.

Desta forma, o conhecimento sobre o consumo e a exposição ao fumo ambiental do tabaco entre os grupos mais vulneráveis da população, nomeadamente mulheres grávidas, bem como os seus efeitos adversos nos indicadores de saúde neonatal, é essencial para planear e monitorizar as estratégias de prevenção do consumo e avaliar potenciais estratégias de cessação.

## **\_Objetivos**

Este trabalho teve como principais objetivos caracterizar a exposição ao tabaco (consumo, cessação e exposição passiva) durante a gravidez numa população portuguesa; e analisar o impacto desta exposição em indicadores de saúde neonatal (peso, comprimento e perímetro cefálico ao nascimento).

## **\_Material e métodos**

Este estudo foi realizado no âmbito do projeto NeoGene “Impacto da exposição transplacentária ao fumo do tabaco no ADN do recém-nascido. Avaliação de dano genético e alterações epigenéticas” (FAPESP/19914/2014). Foram assegurados os procedimentos éticos, com a autorização da Comissão Nacional de Proteção de Dados (2726/2017) e parecer favorável da Comissão de Ética do Centro Hospitalar de S. João (CHSJ) (326/16), Porto.

Entre abril de 2017 e julho de 2018, foram recrutadas 838 mulheres grávidas com mais de 36 semanas de gestação, em consulta no Serviço de Obstetrícia e Ginecologia do CHSJ. Este trabalho considera uma população de 595 participantes com informação individual e clínica completa.

A informação individual foi recolhida através de um questionário preenchido durante uma entrevista que teve lugar até 72 horas após o parto. No presente estudo foram analisadas variáveis relacionadas com a exposição ao tabaco (consumo, cessação e exposição passiva); características demográficas e de saúde (idade, nacionalidade, tipologia de área urbana, paridade, número de abortos espontâneos e gravidezes ectópicas), e socioeconómicas (ocupação profissional, nível de escolaridade completo mais elevado, nível de privação socioeconómica do local de residência) de cada uma das participantes. Os indicadores de saúde neonatal, peso, comprimento e perímetro cefálico ao nascimento foram obtidos por consulta dos processos clínicos. A categorização detalhada de todas estas variáveis encontra-se descrita em Madureira *et al.*, 2020 (15) e Silva *et al.*, 2022 (16).

Na análise dos dados aqui apresentados foram realizadas análises de frequências comparadas pelo teste de Qui-quadrado, ou razão de verossimilhança. Os indicadores de saúde neonatal foram analisados por regressão linear múltipla, tendo os modelos sido ajustados para as variáveis consideradas relevantes de acordo com a literatura (17-19). Todas as análises foram realizadas com o *software* SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 24, tendo-se aplicado um nível de significância de 5%.



## \_Resultados e discussão

As características da população estudada são apresentadas na [tabela 1](#).

A avaliação da distribuição das participantes de acordo com os seus hábitos tabágicos antes da gravidez mostra que, das 595 participantes, 346 (58,2%) nunca fumaram, 83

(13,9%) são ex-fumadoras e 166 (27,9%) fumadoras. Estes dados revelam uma prevalência mais elevada de fumadoras antes da gravidez em comparação com um estudo realizado em 2013 em Portugal (6). Em linha com estudos anteriores (20,21), os dados aqui obtidos sugerem que a partir dos 25 anos de idade mais de 90% das grávidas, provavelmente devido a circunstâncias pessoais específicas e a um maior

Tabela 1: Caracterização da população estudada de acordo com os hábitos tabágicos anteriores à gravidez.

|  | Total<br>(n=595) | Nunca Fumadoras<br>(n=346) | Ex-Fumadoras<br>(n=83) | Fumadoras<br>(n=166) | valor-p          |
|--|------------------|----------------------------|------------------------|----------------------|------------------|
| <b>Idade</b>   |                  |                            |                        |                      |                  |
| < 25 anos  | 68 (11,4%)       | 30 (8,7%)                  | 8 (9,6%)               | 30 (18,1%)           | <b>&lt;0,001</b> |
| 25-29 anos   | 142 (23,9%)      | 74 (21,4%)                 | 15 (18,1%)             | 53 (31,9%)           |                  |
| 30-34 anos   | 205 (34,5%)      | 133 (38,4%)                | 28 (33,7%)             | 44 (26,5%)           |                  |
| ≥ 35 anos  | 180 (30,2%)      | 109 (31,5%)                | 32 (38,6%)             | 39 (23,5%)           |                  |
| <b>Nacionalidade</b>   |                  |                            |                        |                      |                  |
| Portuguesa   | 566 (95,1%)      | 325 (93,9%)                | 80 (96,4%)             | 161 (97,0%)          | 0,274            |
| Outra  | 29 (4,9%)        | 21 (6,1%)                  | 3 (3,6%)               | 5 (3,0%)             |                  |
| <b>Tipologia de área urbana*</b>                                 |                  |                            |                        |                      |                  |
| Predominantemente rural/mediamente urbana                        | 29 (4,9%)        | 19 (5,5%)                  | 4 (4,8%)               | 6 (3,6%)             | 0,645            |
| Predominantemente urbana   | 564 (95,1%)      | 325 (94,5%)                | 79 (95,2%)             | 160 (96,4%)          |                  |
| <b>Ocupação profissional</b>                                     |                  |                            |                        |                      |                  |
| Sem ocupação   | 126 (21,2%)      | 62 (17,9%)                 | 16 (19,3%)             | 48 (28,9%)           | <b>0,010</b>     |
| Estudante  | 12 (2,0%)        | 8 (2,2%)                   | 1 (1,2%)               | 3 (1,8%)             |                  |
| Emprego manual   | 205 (34,5%)      | 114 (32,9%)                | 26 (31,3%)             | 65 (39,2%)           |                  |
| Emprego não-manual   | 252 (42,3%)      | 162 (46,8%)                | 40 (48,2%)             | 50 (30,1%)           |                  |
| <b>Escolaridade</b>  |                  |                            |                        |                      |                  |
| 0-9 anos   | 156 (26,2%)      | 69 (19,9%)                 | 19 (22,9%)             | 68 (41,0%)           | <b>&lt;0,001</b> |
| 10-12 anos   | 214 (36,0%)      | 117 (33,8%)                | 29 (34,9%)             | 68 (41,0%)           |                  |
| ≥ 13 anos  | 225 (37,8%)      | 160 (46,3%)                | 35 (42,2%)             | 30 (18,0%)           |                  |
| <b>Nível de privação socioeconómica do local de residência**</b> |                  |                            |                        |                      |                  |
| T1-Menor privação  | 191 (33,2%)      | 103 (31,0%)                | 29 (37,2%)             | 59 (35,7%)           | 0,590            |
| T2   | 196 (34,1%)      | 112 (33,7%)                | 26 (33,3%)             | 58 (35,2%)           |                  |
| T3-Maior privação  | 188 (32,7%)      | 117 (35,3%)                | 23 (29,5%)             | 48 (29,1%)           |                  |
| <b>Paridade</b>  |                  |                            |                        |                      |                  |
| 0  | 329 (55,3%)      | 190 (54,9%)                | 49 (59,0%)             | 90 (54,2%)           | 0,127            |
| 1  | 212 (35,6%)      | 125 (36,1%)                | 32 (38,6%)             | 55 (33,1%)           |                  |
| ≥ 2  | 54 (9,1%)        | 31 (9,0%)                  | 2 (2,4%)               | 21 (12,7%)           |                  |
| <b>Abortos espontâneos (n.º)***</b>                              |                  |                            |                        |                      |                  |
| 0  | 486 (82,2%)      | 287 (83,4%)                | 69 (84,2%)             | 130 (78,8%)          | 0,647 #          |
| 1  | 89 (15,1%)       | 47 (13,7%)                 | 11 (13,4%)             | 31 (18,8%)           |                  |
| ≥ 2  | 16 (2,7%)        | 10 (2,9%)                  | 2 (2,4%)               | 4 (2,4%)             |                  |
| <b>Gravidezes ectópicas (n.º)</b>                                |                  |                            |                        |                      |                  |
| Não  | 584 (98,2%)      | 342 (98,8%)                | 82 (98,8%)             | 160 (96,4%)          | 0,173 #          |
| Sim  | 11 (1,8%)        | 4 (1,2%)                   | 1 (1,2%)               | 6 (3,6%)             |                  |

\* 2 valores omissos; \*\* 20 valores omissos; \*\*\* 4 valores omissos; # Teste Likelihood ratio em vez de Qui-quadrado



entendimento dos efeitos nefastos do consumo do tabaco (21), reportaram nunca terem fumado. Salieta-se ainda que a maior prevalência de participantes que deixaram de fumar (ex-fumadoras) antes da gravidez estava associada ao grupo etário acima dos 30 anos.

Quanto à ocupação profissional, a proporção mais elevada de fumadoras antes da gravidez foi observada entre as participantes em situação de emprego manual, facto que tem sido associado à baixa literacia e condição financeira que habitualmente caracteriza as mulheres nesta situação (20,22,23).

A relação entre o consumo de tabaco e o nível de escolaridade revelou maior prevalência de consumo na população estudada com menores níveis de formação (<13 anos de escolaridade), à semelhança dos resultados obtidos por outros autores (20,22).

A análise da cessação tabágica ao longo da gravidez (gráfico 1), e em linha com os resultados de um estudo realizado por Alves *et al.*, 2013 (6), revela que 53,6% (n=89) das participantes não cessaram os seus hábitos tabágicos, sendo que 35,5% (n=59) das grávidas que decidiram parar de fumar fizeram-no logo no 1º trimestre. Isto confirma a importância da implementação de intervenções para a cessação tabágica durante a gravidez, em que os profissionais de saúde podem desempenhar um papel determinante com aconselhamento e acompanhamento antes, durante e até mesmo após a gravidez.

Entre os dados mais relevantes deste estudo encontra-se a caracterização da exposição de grávidas ao fumo passivo, que foi efetuada pela primeira vez em Portugal. À data da entrevista, a maioria da população de estudo referiu não ter estado exposta diariamente ao fumo passivo (43,4%) em espaços fechados (casa, local de trabalho e de lazer) ou ter estado apenas esporadicamente exposta (24,9%) antes da gravidez (gráfico 2), o que resulta numa exposição diária ao fumo do tabaco de 31,7% da população. Este valor é superior ao determinado em 2015 para a população feminina (10,8%) no Inquérito Nacional de Saúde com Exame Físico (INSEF) (10); de ressaltar que os dados retratados no INSEF se referiam à população nacional caracterizada por uma faixa etária diferente (entre os 25 e os 74 anos de

idade) e consequente estado de saúde. O gráfico 2 mostra ainda que a exposição ao fumo do tabaco decresce ao longo da gravidez, o que indica uma alteração dos comportamentos durante a gestação.

No entanto, a percentagem de mulheres grávidas não fumadoras diariamente expostas ao fumo do tabaco no 3º trimestre de gravidez é ainda de 26,3%, o que reforça a necessidade de realizar campanhas de informação e sensibilização sobre os efeitos nefastos da exposição passiva ao fumo do tabaco, e não apenas do seu consumo. A inexistência de estudos efetuados em Portugal sobre a exposição passiva ao fumo de tabaco não permite uma avaliação de tendências, uma análise que poderia ser interessante à luz das alterações à Lei do Tabaco, à entrada no mercado de novos produtos de tabaco, e às desigualdades económicas e sociais ocorridas nos últimos anos.

Numa segunda fase do projeto, foi possível comparar os dados obtidos por questionário com a concentração de cotinina, um biomarcador de exposição ao fumo ambiental do tabaco, determinado na urina materna colhida no dia do parto. Esses resultados, detalhados em Silva *et al.*, 2022 (16), permitiram a exclusão das participantes cuja informação em questionário não coincidia com a obtida com o biomarcador analisado, para uma análise mais fiável da associação entre os comportamentos tabágicos (consumo e cessação) e os indicadores de saúde neonatal recolhidos (peso, comprimento e perímetro cefálico ao nascimento). Os resultados, apresentados na figura 1, apontam para uma diminuição significativa dos valores dos indicadores de saúde neonatal entre os recém-nascidos das participantes fumadoras quando comparados com os das não-fumadoras, não-expostas ao fumo passivo do tabaco, em concordância com o que tem vindo a ser reportado por outros autores (17-19). Por outro lado, a cessação foi responsável por uma melhoria nos indicadores de saúde, tendo-se verificado um aumento significativo no peso dos recém-nascidos cujas mães cessaram durante a gravidez quando comparadas com mães que mantiveram o consumo do tabaco, um resultado que se soma aos de outros autores (24,25), ao demonstrar a importância da cessação tabágica na saúde neonatal.



Gráfico 1: Análise da cessação tabágica ao longo da gravidez (n=166).

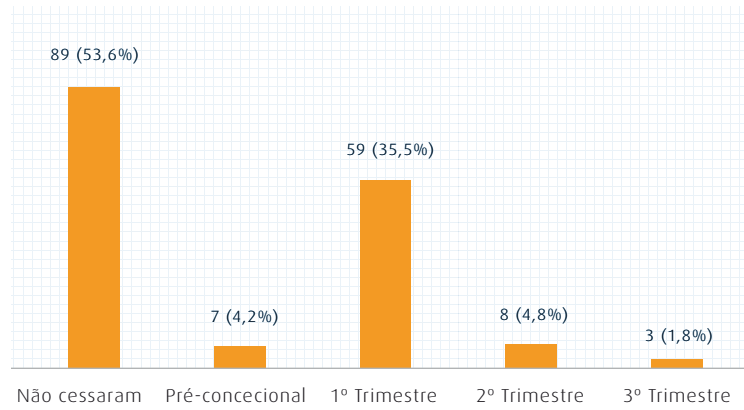


Gráfico 2: Análise da exposição passiva ao fumo do tabaco ao longo da gravidez entre as não-fumadoras (nunca fumadoras e ex-fumadoras; n=429).

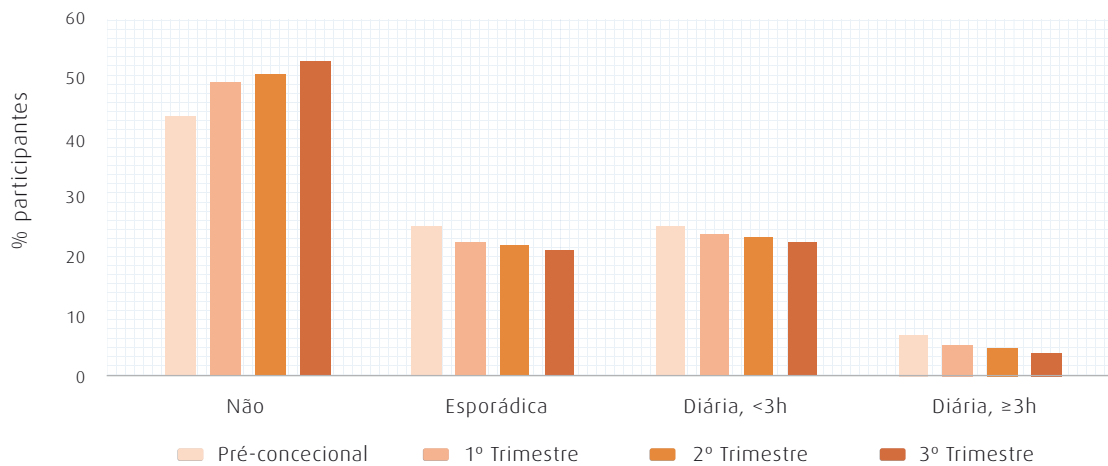
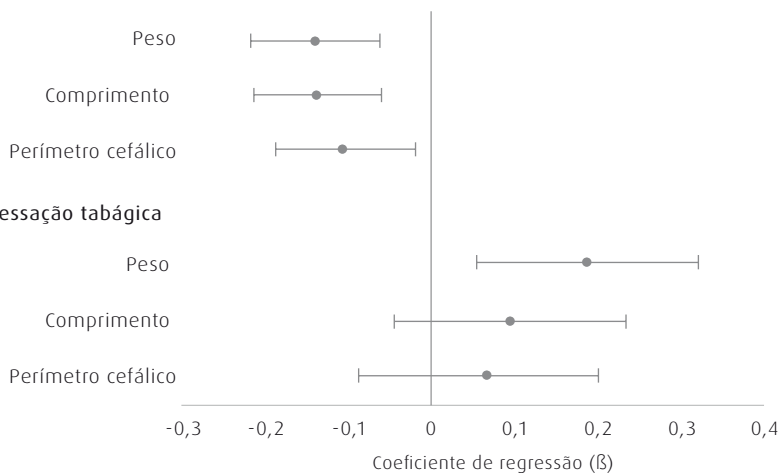
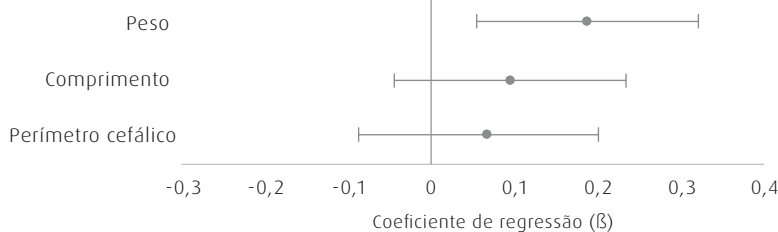


Figura 1: Associações entre os indicadores de saúde neonatais analisados e (A) consumo de tabaco no 3º trimestre; (B) cessação tabágica durante a gravidez.

A. Consumo de tabaco



B. Cessação tabágica



Para o consumo de tabaco, as não fumadoras sem exposição passiva (n=314) foram consideradas referência (n=314 vs. 89); para a cessação tabágica, as participantes que não cessaram foram consideradas referência (n= 88 vs. 66).

Os coeficientes apresentados foram ajustados para a idade materna, escolaridade (referência: 0-9 anos), ocupação profissional (referência: sem ocupação), índice de massa corporal da mãe antes da gravidez, aumento de peso da mãe durante a gravidez, paridade (referência: 0), sexo do recém-nascido (referência: feminino), e idade gestacional.



## Conclusões

Este estudo confirma que o consumo e a exposição ao fumo ambiental do tabaco durante a gravidez em Portugal continuam a ser um tópico relevante que merece a atenção da comunidade científica. De acordo com a evidência aqui apresentada, e tendo em conta o quadro legislativo em vigor desde 2007, cerca de 28% das participantes eram fumadoras antes da gravidez e mais de metade das participantes (53,6%) não cessou o consumo de tabaco durante a gestação. Por sua vez, os resultados indicam que muitas mulheres não fumadoras se encontram diariamente expostas ao fumo do tabaco no 3º trimestre de gravidez (26,3%).

Acresce ainda que os fatores socioeconómicos no comportamento tabágico das grávidas e a influência destes comportamentos nos indicadores de saúde neonatal devem ser considerados no desenho e implementação de novas campanhas de sensibilização e intervenções para a cessação tabágica, capazes de promover a saúde, prevenir doenças numa fase inicial da vida, e garantir ganhos na saúde materno-fetal, dado que a gravidez constitui um dos momentos de maior motivação para alteração de comportamentos e adoção de estilos de vida mais saudáveis.

## Financiamento e agradecimentos:

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto NeoGene financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) com a referência FAPESP/19914/2014. Os autores agradecem à FCT o suporte concedido à EPIUnit (UID/DTP/04750/2019; fundos nacionais FCT/ Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior), e às bolsistas Joana Madureira, Ana Inês Silva e Carla Costa (SFRH/BPD/115112/2016, SFRH/BD/145101/2019 e SFRH/BPD/96196/2013, respetivamente). Ana Isabel Ribeiro recebeu financiamento da FCT através do contrato CEECIND/02386/2018.

Os autores agradecem ainda a todas as participantes do estudo, que generosamente aceitaram participar neste projeto, e a todos os profissionais de saúde do Serviço de Obstetrícia e Ginecologia do CHSJ, cujo esforço foi essencial na fase de recolha de amostras biológicas.

## Referências bibliográficas:

- (1) WHO report on the global tobacco epidemic 2019: offer help to quit tobacco use. Geneva: World Health Organization, 2019. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241516204>
- (2) World Health Organization. European tobacco use: trends report 2019. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe, 2019. [https://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0009/402777/Tobacco-Trends-Report-ENG-WEB.pdf](https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0009/402777/Tobacco-Trends-Report-ENG-WEB.pdf)
- (3) Institute for Health Metrics and Evaluation. GBD compare [online]. Seattle, WA: IHME, University of Washington, 2017. <https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/>
- (4) Lei n.º 37/2007, de 14 de agosto. DR 1ª série, n.º 156 (14-08-2007):5277-85. Aprova normas para a protecção dos cidadãos da exposição involuntária ao fumo do tabaco e medidas de redução da procura relacionadas com a dependência e a cessação do seu consumo. <https://data.dre.pt/eli/lei/37/2007/08/14/p/dre/html>
- (5) Leite A, Machado A, Pinto S, et al. Características sociodemográficas dos fumadores em Portugal: análise comparativa dos Inquéritos Nacionais de Saúde (1987, 1995/1996, 1998/1999, 2005/2006 e 2014). Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2017. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/4117>
- (6) Alves E, Azevedo A, Correia S, et al. Long-term maintenance of smoking cessation in pregnancy: an analysis of the birth cohort generation XXI. *Nicotine Tob Res.* 2013 Sep;15(9):1598-607. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntt026>
- (7) Teixeira C, Al Hamwi S, Carrapatoso M, et al. Tobacco use during pregnancy among native and migrant women in Portugal. results from the Bambino study. *Rev Epidemiol Sante Publique.* 2018 Jul;66:S358-59. <https://doi.org/10.1016/j.respe.2018.05.333>
- (8) U.S. Office on Smoking and Health. The Health Consequences of Involuntary Exposure to Tobacco Smoke: a Report of the Surgeon General. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US), 2006. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK44324/>
- (9) U.S. Centers for Disease Control and Prevention, U.S. National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, U.S. Office on Smoking and Health. How Tobacco Smoke Causes Disease: the Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: a Report of the Surgeon General. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US), 2010. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53017/>
- (10) U.S. National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion Office on Smoking and Health. The Health Consequences of Smoking-50 Years of Progress: a Report of the Surgeon General. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US), 2014. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK179276/>
- (11) Crozier SR, Robinson SM, Borland SE, et al.; SWS Study Group. Do women change their health behaviours in pregnancy? Findings from the Southampton Women's Survey. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2009 Sep;23(5):446-53. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3016.2009.01036.x>
- (12) McBride CM, Emmons KM, Lipkus IM. Understanding the potential of teachable moments: the case of smoking cessation. *Health Educ Res.* 2003 Apr;18(2):156-70. <https://doi.org/10.1093/her/18.2.156>
- (13) Namorado S, Santos J, Antunes L, et al. 1º Inquérito Nacional de Saúde com Exame Físico (INSEF 2015): determinantes de saúde. 2017. Lisboa: INSA, 2017. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/4795>
- (14) Secretan B, Straif K, Baan R, Grosse Y, et al.; WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. A review of human carcinogens--Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. *Lancet Oncol.* 2009 Nov;10(11):1033-4. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(09\)70326-2](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(09)70326-2)
- (15) Madureira J, Camelo A, Silva AI, et al. The importance of socioeconomic position in smoking, cessation and environmental tobacco smoke exposure during pregnancy. *Sci Rep.* 2020 Sep 24;10(1):15584. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72298-8>



artigos breves\_ n. 2

- (16) Silva AI, Camelo A, Madureira J, et al. Urinary cotinine assessment of maternal smoking and environmental tobacco smoke exposure status and its associations with perinatal outcomes: a cross-sectional birth study. *Environ Res.* 2022 Jan;203:111827. Epub 2021 Aug 5. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111827>
- (17) Sunyer J, Garcia-Esteban R, Castilla AM, et al.; INMA project. Exposure to second-hand smoke and reproductive outcomes depending on maternal asthma. *Eur Respir J.* 2012 Aug;40(2):371-6. <https://doi.org/10.1183/09031936.00091411>
- (18) Moore BF, Starling AP, Magzamen S, et al. Fetal exposure to maternal active and secondhand smoking with offspring early-life growth in the Healthy Start study. *Int J Obes (Lond).* 2019 Apr;43(4):652-62. Epub 2018 Oct 19. <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0238-3>
- (19) Wang X, Tager IB, Van Vunakis H, et al. Maternal smoking during pregnancy, urine cotinine concentrations, and birth outcomes. A prospective cohort study. *Int J Epidemiol.* 1997 Oct;26(5):978-88. <https://doi.org/10.1093/ije/26.5.978>
- (20) de Wolff MG, Backhausen MG, Iversen ML, et al. Prevalence and predictors of maternal smoking prior to and during pregnancy in a regional Danish population: a cross-sectional study. *Reprod Health.* 2019 Jun 14;16(1):82. <https://doi.org/10.1186/s12978-019-0740-7>
- (21) Scheffers-van Schayck T, Tuithof M, Otten R, et al. Smoking Behavior of Women Before, During, and after Pregnancy: Indicators of Smoking, Quitting, and Relapse. *Eur Addict Res.* 2019;25(3):132-44. <https://doi.org/10.1159/000498988>
- (22) Smedberg J, Lupattelli A, Mårdby AC, et al. Characteristics of women who continue smoking during pregnancy: a cross-sectional study of pregnant women and new mothers in 15 European countries. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2014 Jun 25;14:213. <https://doi.org/10.1186/1471-2393-14-213>
- (23) Rocheleau CM, Bertke SJ, Lawson CC, et al.; National Birth Defects Prevention Study. Factors associated with employment status before and during pregnancy: Implications for studies of pregnancy outcomes. *Am J Ind Med.* 2017 Apr;60(4):329-41. <https://doi.org/10.1002/ajim.22700>
- (24) Lindley AA, Becker S, Gray RH, et al. Effect of continuing or stopping smoking during pregnancy on infant birth weight, crown-heel length, head circumference, ponderal index, and brain:body weight ratio. *Am J Epidemiol.* 2000 Aug 1;152(3):219-25. <https://doi.org/10.1093/aje/152.3.219>
- (25) Brand JS, Gaillard R, West J, et al. Associations of maternal quitting, reducing, and continuing smoking during pregnancy with longitudinal fetal growth: Findings from Mendelian randomization and parental negative control studies. *PLoS Med.* 2019 Nov 13;16(11):e1002972. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002972>

## Exposição a substâncias químicas na indústria da gestão de resíduos elétricos e eletrónicos e seus potenciais efeitos na saúde dos trabalhadores

*Exposure to chemicals in the e-waste management industry and potential health effects on workers*

Rodrigo Moreira<sup>1</sup>, Ana M. Tavares<sup>1</sup>, Henriqueta Louro<sup>1,2</sup>, Célia Ventura<sup>1,2</sup>, Carina Ladeira<sup>3,4</sup>, Susana Viegas<sup>4,5</sup>, Maria João Silva<sup>1,2</sup>

rodrigo.moreira@insa.min-saude.pt

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

(2) Centro de Toxicogenómica e Saúde Humana. NOVA Medical School, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, Portugal

(3) Health & Technology Research Center. Escola Superior de Tecnologia da Saúde, Instituto Politécnico de Lisboa, Lisboa, Portugal

(4) Comprehensive Health Research Center. NOVA Medical School, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, Portugal

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

### \_Resumo

Os resíduos de equipamento elétrico e eletrónico (REEE) são um problema crescente a nível global, sendo considerados um perigo para a saúde humana e ambiental devido à presença de uma variedade de substâncias nocivas, tais como poluentes orgânicos persistentes e metais pesados. Os trabalhadores envolvidos na gestão deste tipo de resíduos estão potencialmente expostos a estas substâncias, particularmente, durante as atividades de reciclagem e processamento. Esta revisão teve por objetivo recolher informação referente à exposição ocupacional a substâncias químicas no sector da gestão de REEE e aos seus potenciais efeitos na saúde dos trabalhadores. A consulta a duas bases de dados (PubMed e Scopus) seguida da aplicação dos critérios de inclusão e exclusão resultou na seleção de 14 estudos que foram sujeitos a uma análise mais detalhada. Os referidos estudos de biomonitorização ocupacional reportaram a exposição dos trabalhadores deste setor a vários metais pesados e compostos orgânicos. A análise de biomarcadores de efeito biológico precoce sugeriu, na maioria dos estudos, uma associação entre a exposição a este tipo de resíduos e alterações hormonais ou genotoxicidade em células sanguíneas. Os referidos efeitos, a confirmarem-se em estudos futuros, poderão traduzir-se a longo termo em patologias, tais como desregulação endócrina ou neoplasias. Em conclusão, embora os estudos revistos sugiram que trabalhar no sector de gestão de REEE representa um potencial risco para os trabalhadores, torna-se necessária a realização de mais estudos de biomonitorização humana, especialmente ao nível europeu, para gerar evidência sólida que apoie medidas de mitigação da exposição desses trabalhadores.

### \_Abstract

*The waste of electrical and electronic equipment (e-waste) is a growing problem globally, being considered a hazard to human and environmental health due to the presence of a variety of harmful substances, such as persistent organic pollutants, and heavy metals. Workers involved in e-waste management have a more direct exposure to these substances, particularly during recycling and processing activities (e.g., sorting, dismantling, and incineration). This review aimed to collect information regarding occupational exposure to chemicals in the e-waste management sector and their potential effects on workers' health. The consul-*

*tation of two databases (PubMed and Scopus) followed by the application of the inclusion and exclusion criteria, resulted in the selection of 14 studies that were subjected to a more detailed analysis. Those occupational biomonitoring studies reported the exposure of workers in this sector to various heavy metals and organic compounds. The analysis of biomarkers of early biological effect suggested, in most studies, an association between exposure to this type of residues and hormonal changes or genotoxicity in blood cells. These effects, to be confirmed in future studies, may translate in the long term into pathologies, such as endocrine disruption or neoplasms. In conclusion, although the studies reviewed suggest that working in the e-waste management sector represents a potential risk for workers, there is a need to carry out more human biomonitoring studies, especially at the European level, to generate solid evidence to support mitigation measures aiming to prevent workers exposure.*

### \_Introdução

Os resíduos de equipamento elétrico e eletrónico (REEE) abrangem produtos que utilizam energia elétrica para o seu funcionamento e que foram rejeitados pelo utilizador sem intenção de posterior reutilização (1), tais como cabos, baterias e computadores (2). Este tipo de resíduo é o que apresenta maior crescimento a nível mundial, com 53 mil milhões de toneladas produzidas globalmente em 2019 (3). Cerca de 83% do seu trajeto de transporte global não é documentado, estimando-se que na sua vasta maioria seja transportado para países em desenvolvimento, onde são postos em prática métodos rudimentares de reciclagem e processamento (4).

Os REEE são compostos por uma mistura de mais de mil substâncias diferentes, muitas das quais são tóxicas, tais como o chumbo, mercúrio, arsénio, cádmio, selénio, e retar-



dadores de chama (3). A exposição humana a essa mistura complexa poderá conduzir a uma variedade de efeitos nocivos para a saúde (5). Em contexto ocupacional, os trabalhadores envolvidos nos vários processos de gestão deste resíduo, desde a sua triagem e desmantelamento até à sua reciclagem, correm o risco de exposição às substâncias neles presentes através da inalação, do contacto com a pele e da ingestão, por exemplo, através do contacto mão-boca (6). Por esse motivo, esses trabalhadores incorrem num risco de possíveis efeitos adversos na sua saúde que importa conhecer (7).

### \_Objetivo

O presente estudo teve como objetivo rever a informação atualmente existente na literatura sobre a exposição ocupacional a substâncias químicas perigosas no setor da gestão de resíduos de equipamento elétrico e eletrónico, incluindo os possíveis efeitos adversos na saúde dos trabalhadores.

### \_Métodos

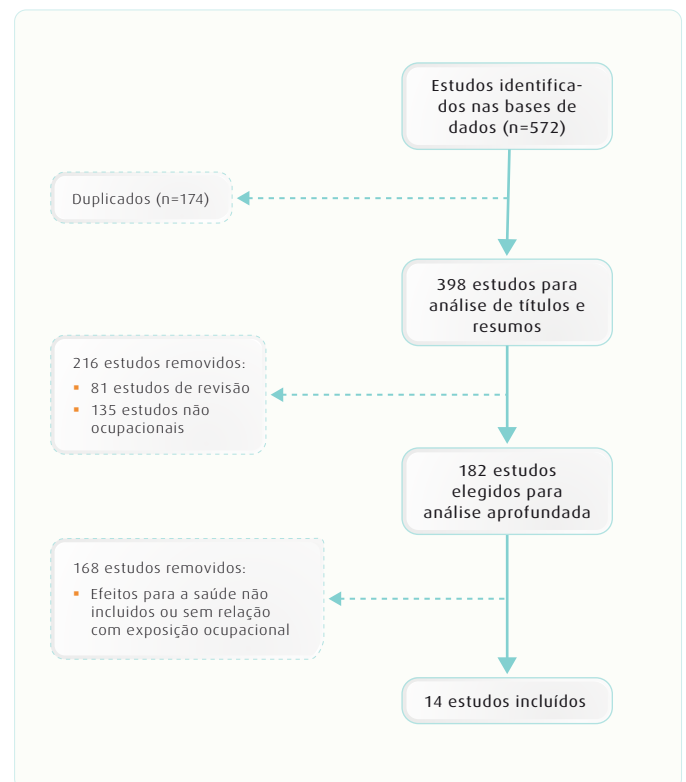
Para a pesquisa de publicações consultaram-se duas bases de dados: PubMed® e Scopus®, em julho de 2021. Os termos de pesquisa aplicados a ambas as bases de dados foram: ("e-waste" OR "electronic waste" OR "e-waste recycling" OR "waste electrical and electronic equipment" OR "electronic recycling") AND ("occupational" OR "workers" OR "occupational setting" OR "workers exposed" OR "workers exposure" OR "occupational exposure" OR "human health effects" OR "biomarkers" OR "human biomonitoring").

Selecionaram-se os artigos cujas características obedeciam aos seguintes critérios de inclusão: 1) estudos de biomonitorização humana; 2) estudos em contexto ocupacional envolvendo a gestão de REEE; 3) estudos incluindo dados sobre os efeitos biológicos ou efeitos na saúde. Excluíram-se os seguintes tipos de estudos: 1) não publicados em inglês ou português; 2) artigos de revisão; 3) estudos não-ocupacionais e 4) estudos que não associassem a exposição ocupacional com os efeitos para a saúde dos trabalhadores.

### \_Resultados e discussão

De um total de 572 estudos identificados, foram selecionados e analisados 14 estudos, após a exclusão de duplicados e aplicação dos critérios de inclusão/exclusão (figura 1). Os estudos selecionados reportaram dados de exposição, obtidos através de biomarcadores em amostras biológicas e de potenciais efeitos na saúde, inferidos da análise de biomarcadores de um efeito biológico precoce. Adicionalmente, os referidos estudos de biomonitorização ocupacional incluíram dados contextuais recolhidos por questionário, tais como dados sociodemográficos (ex: idade, género, escolaridade, local de residência), informação sobre estilo de vida (ex: consumo de álcool e tabaco, sedentarismo, dieta), dados clínicos (índice de massa corporal, doenças, etc.) e detalhes sobre as atividades ocupacionais dos trabalhadores (desmantelamento, incineração e triagem).

Figura 1: Fluxograma representativo do processo de seleção dos artigos obtidos através da pesquisa bibliográfica.





artigos breves\_ n. 3

Os estudos foram realizados em indústrias responsáveis pela gestão de REEE presentes na China, Canadá, Tailândia e Vietname. Os mesmos divergiram quanto aos biomarcadores de exposição analisados, isto é, as substâncias químicas ou metabolitos analisados em amostras biológicas dos participantes. Estes incluíram, de uma forma geral, éteres difenílicos polibromados (PBDEs), bifenilos policlorados (PCBs), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) e

metais pesados (cádmio, mercúrio, chumbo, etc.). Os principais resultados dos estudos encontram-se sumarizados na **tabela 1**. Dos resultados da análise de biomarcadores de efeito identificaram-se efeitos ao nível de desregulação endócrina, instabilidade genética, *stress* oxidativo, perturbações cardiovasculares e renais que poderão ter impacto na saúde dos trabalhadores deste sector.

**Tabela 1:** Principais biomarcadores de exposição e de efeito após exposição ocupacional a resíduos de equipamento elétrico e eletrónico (REEE) identificados na literatura.

| Efeitos biológicos ou na saúde | Biomarcadores de exposição             | Biomarcadores de efeito   | Referência |
|--------------------------------|--|---|------------|
| Desregulação endócrina         | PBDEs                                  | ↑ [TSH] (correlacionado com o tempo de atividade na indústria)  | (8)        |
|                                | PBDEs*, PCBs                           | → [TSH], ↑ [T <sub>3</sub> total]* ↑ [T <sub>3</sub> livre] ↑ [T <sub>4</sub> total]*   | (9)        |
|                                | PBDEs, PCBs*, BPhs                     | ▪ ↑ [T <sub>3</sub> total]* ↑ [T <sub>3</sub> livre]* ↑ [T <sub>4</sub> total]* ↑ [T <sub>4</sub> livre]* ↓ [TSH]* (no sexo feminino)                     | (10)       |
|                                | PBDEs*, OPE (metabolitos)*, Hg, Cd, Pb | ▪ ↑ [T <sub>4</sub> total]* ↓ [T total]* ↓ [T livre]* ↓ [T livre/ E2]* (no sexo masculino)<br>▪ ↓ [T <sub>3</sub> livre]* (no sexo feminino)<br>▪ → [TSH] | (11)       |
|                                | PBDEs                                  | → [T <sub>3</sub> total], [T <sub>4</sub> livre] e [TSH]  | (12)       |
|                                | Pb                                     | ↑ [FSH] ↑ [LH] ↓ [T] (correlacionado com o uso de equipamento de proteção no trabalho)  | (13)       |
|                                | Cd*, Cu*, Pb*, Fe                      | ↑ [FSH]* → [LH]   | (14)       |
| Genotoxicidade                 | PBDEs                                  | ↑ MNCBN (correlacionado com o tempo de atividade na indústria)  | (8)        |
|                                | Pb*, Cu, Cd                            | ↑ MNCBN*  | (15)       |
|                                | PCBs, Pb, Zn, Ca, Mg, Fe, Se           | ↑ AC ↑ MNCBN (correlacionado com maior número de horas de trabalho)   | (16)       |
| Stress oxidativo               | PBDEs                                  | → [8-OHdG] → [MDA]  | (8)        |
|                                | Cu, Fe*                                | ↓ [8-OHdG]*   | (17)       |
|                                | Pb, Cd, Mn                             | ↑ [8-OHdG] (correlacionado com maior número de horas de trabalho)   | (18)       |
|                                | PAHs*                                  | ↑ [8-OHdG]* ↑ [MDA]*  | (19)       |
|                                | PCDD/Fs, PBDEs, PCBs                   | ↑ [8-OHdG]  | (20)       |
| Função renal e cardiovascular  | Pb*, Cd, Mn                            | ↑ taxa de filtração glomerular*   | (18)       |
|                                | Pb*                                    | ↑ pressão arterial diastólica*  | (21)       |

\* Correlação estatisticamente significativa entre biomarcador de exposição e de efeito; # correlacionado com maior número de horas de trabalho.

PBDEs – éteres difenílicos polibromados; PCBs – bifenilos policlorados; PAHs – hidrocarbonetos policíclicos aromáticos; BPhs – bromofenóis, OPEs – organofosfatos; PCDD/Fs – Dibenzeno-p-dioxinas policloradas; Hg – Mercúrio; Pb – Chumbo; Cd – Cádmio; Cu – Cobre; Fe – Ferro; Mn – Manganésio; Zn – Zinco; Ca – Cálcio; Mg – Magnésio, Se – Selénio; TSH – hormona estimulante da tiroide; T<sub>3</sub> – Tri-iodotironina; T<sub>4</sub> – Tiroxina; FSH – hormona foliculo-estimulante; LH – hormona luteinizante; T – Testosterona; MNCBN – Frequência de micronúcleos em células binucleadas; AC – aberrações cromossómicas, 8-OHdG = 8-Oxo-2'-deoxiguanosina; MDA = malondialdeído.



Relativamente a possíveis efeitos de desregulação endócrina, 5 estudos investigaram as possíveis relações entre a exposição de trabalhadores a PBDEs, PCBs e metais pesados e os níveis de hormonas da tiroide (TH) presentes no soro ou plasma. Um dos estudos reportou um aumento dos níveis de hormona estimulante da tiroide (TSH) no sangue dos trabalhadores (8), enquanto outros registaram uma diminuição (10), ou mesmo nenhuma variação significativa nos valores (9,11,12). Estas inconsistências poderão ter origem em diversos fatores, tais como o tamanho da amostra, as técnicas analíticas aplicadas e o momento da colheita das amostras biológicas (9-12). Alguns estudos avaliaram, igualmente, os níveis das hormonas sexuais (11,13,14), tendo-se observado uma associação entre níveis elevados de cádmio, chumbo e cobre no sangue com níveis mais elevados da hormona folículo-estimulante (FSH) (13,14). Registou-se uma redução dos níveis de testosterona, principalmente em trabalhadores do sexo masculino, que foi associada a níveis acrescidos de ésteres organofosfato (OPEs) (11). Algumas alterações endócrinas detetadas nos trabalhadores poderão também estar relacionadas com a carência do uso de equipamento de proteção durante as atividades de reciclagem de REEE, mais especificamente, o uso de máscaras (13). Consequentemente, estas variações nas hormonas sexuais poderão ter impacto negativo, por exemplo, a nível da espermatogénese, levando a um decréscimo da produção de espermatozoides (14).

Alguns estudos reportaram um aumento dos níveis de biomarcadores de genotoxicidade (8,15,16) e *stress oxidativo* (8,17-20) analisados, respetivamente, no sangue ou na urina. Os efeitos incluíram um aumento da frequência de micronúcleos (8,15,16) e de aberrações cromossómicas (16) em linfócitos de sangue periférico desses trabalhadores comparativamente a grupos não expostos. Os trabalhadores também apresentaram indícios de lesões oxidativas, reveladas pelo aumento dos níveis de biomarcadores de *stress oxidativo* 8-Oxo-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) ou malondialdeído (MDA) presentes na urina (17, 19-21), exceto num caso em que foi registado um decréscimo dos níveis de 8-OHdG (18), e noutro em que não foram registadas quaisquer variações (8).

No estudo desenvolvido por Upadhyay e colaboradores (2021), obtiveram-se elevados níveis de chumbo no sangue dos trabalhadores expostos a REEE que se relacionaram com uma diminuição dos níveis de hemoglobina e um aumento da pressão arterial diastólica, o que poderá conduzir ao desenvolvimento de hipertensão nos trabalhadores (21). Por fim, um estudo desenvolvido por Neitzel e colaboradores (2020) identificou uma maior taxa de filtração glomerular nos trabalhadores expostos a REEE, com significado ainda pouco claro (18).

### **Conclusões**

A presente revisão da literatura evidenciou a escassez de estudos de biomonitorização humana focados na exposição ocupacional relacionada com a gestão de REEE e seus potenciais efeitos na saúde dos trabalhadores.

Os estudos analisados mostraram que os trabalhadores deste setor se encontram expostos a diversas substâncias nocivas para a sua saúde. Para além disso, evidenciaram a existência de efeitos biológicos variados, sendo os mais consistentes a desregulação das hormonas da tiroide, o *stress oxidativo* e os efeitos genotóxicos. Esses efeitos preconizam a possibilidade de desenvolvimento de patologias a longo prazo, tais como doenças metabólicas e doenças oncológicas.

Em resumo, ficou bem patente a necessidade de desenvolvimento de mais estudos ocupacionais, particularmente na Europa, incluindo uma avaliação da exposição através de biomarcadores de exposição fidedignos e quantificados por métodos analíticos bem controlados, conjuntamente com biomarcadores de efeito que permitam o estabelecimento de uma relação entre a exposição a essas substâncias e o potencial desenvolvimento de doenças ocupacionais.

Projetos recentes, como a Iniciativa Europeia de Biomonitorização Humana (HBM4EU), visam investigar de uma forma harmonizada os níveis de exposição ocupacional em trabalhadores da indústria de gestão de REEE em vários países europeus, incluindo Portugal (22). Essa informação será relevante para permitir a implementação de medidas de prevenção e proteção, com benefícios evidentes para a saúde dos trabalhadores.



## Referências bibliográficas:

- (1) United Nations University, StEP Initiative. Solving the E-waste Problem (Step) White Paper: One Global Definition of E-waste. Bonn: UNU, 2014. <http://collections.unu.edu/view/UNU:6120#viewMetadata>
- (2) Mmerek D, Li B, Baldwin A, et al. The Generation, Composition, Collection, Treatment and Disposal System, and Impact of E-Waste. IN: Mihai F-C (ed.). E-Waste in Transition. InTech, 2016. pp. 66-93. <https://doi.org/10.5772/61332>
- (3) Widmer R, Oswald-Krapf H, Sinha-Khetriwal D, et al. Global perspectives on e-waste. *Environ Impact Assess Rev.* 2005 Jul;25(5):436-58. <https://doi.org/10.1016/j.eiar.2005.04.001>
- (4) Forti V, Baldé CP, Kuehr R, et al. The Global E-waste Monitor 2020 : Quantities, flows, and the circular economy potential. UNU/UNITAR and ITU, 2020. [https://ewastemonitor.info/wp-content/uploads/2020/11/GEM\\_2020\\_def\\_july1\\_low.pdf](https://ewastemonitor.info/wp-content/uploads/2020/11/GEM_2020_def_july1_low.pdf)
- (5) Pascale A, Bares C, Laborde A. E-waste: Environmental and health challenges. Dominick A, Dellasala, Goldstein MI (eds). *Encyclopedia of the Anthropocene*, Elsevier, 2018, pp. 269-75. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809665-9.10013-8>
- (6) Perkins DN, Brune Drisse MN, Nxele T, et al. E-waste: a global hazard. *Ann Glob Health.* 2014 Jul-Aug;80(4):286-95. <https://doi.org/10.1016/j.aogh.2014.10.001>
- (7) Bimir MN. Revisiting e-waste management practices in selected African countries. *J Air Waste Manag Assoc.* 2020 Jul;70(7):659-69. <https://doi.org/10.1080/10962247.2020.1769769>
- (8) Yuan J, Chen L, Chen D, et al. Elevated serum polybrominated diphenyl ethers and thyroid-stimulating hormone associated with lymphocytic micronuclei in Chinese workers from an E-waste dismantling site. *Environ Sci Technol.* 2008 Mar 15;42(6):2195-200. <https://doi.org/10.1021/es702295f>
- (9) Zheng J, He CT, Chen SJ, et al. Disruption of thyroid hormone (TH) levels and TH-regulated gene expression by polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), polychlorinated biphenyls (PCBs), and hydroxylated PCBs in e-waste recycling workers. *Environ Int.* 2017 May;102:138-144. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.02.009>
- (10) Eguchi A, Nomiya K, Minh Tue N, et al. Residue profiles of organohalogen compounds in human serum from e-waste recycling sites in North Vietnam: Association with thyroid hormone levels. *Environ Res.* 2015 Feb;137:440-49. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.01.007>
- (11) Gravel S, Lavoué J, Bakhiyi B, et al. Multi-exposures to suspected endocrine disruptors in electronic waste recycling workers: Associations with thyroid and reproductive hormones. *Int J Hyg Environ Health.* 2020 Apr;225:113445. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.113445>
- (12) Julander A, Karlsson M, Hagström K, et al. Polybrominated diphenyl ethers-plasma levels and thyroid status of workers at an electronic recycling facility. *Int Arch Occup Environ Health.* 2005 Aug;78(7):584-92. <https://doi.org/10.1007/s00420-005-0627-5>
- (13) Yang Y, Lu XS, Li DL, et al. Effects of environmental lead pollution on blood lead and sex hormone levels among occupationally exposed group in an E-waste dismantling area. *Biomed Environ Sci.* 2013 Jun;26(6):474-84. <https://doi.org/10.3967/0895-3988.2013.06.008>
- (14) Yang Y, Li X, Lu X, et al. Study on the Correlation Between Heavy Metals and Sex Hormone Levels in Serum of E-Waste Dismantling Area Males. *Asian J Chem.* 2014;26(21):7301-06. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2014.16618>
- (15) Wang Q, He AM, Gao B, et al. Increased levels of lead in the blood and frequencies of lymphocytic micronucleated binucleated cells among workers from an electronic-waste recycling site. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 2011;46(6):669-76. <https://doi.org/10.1080/10934529.2011.563176>
- (16) Wang Y, Sun X, Fang L, et al. Genomic instability in adult men involved in processing electronic waste in Northern China. *Environ Int.* 2018 Aug;117:69-81. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.04.027>
- (17) Wang H, Lv S, Li F, et al. Study on the changes of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine levels and burden of heavy metal around e-waste dismantling site. *Sci Total Environ.* 2010 Nov 15;408(24):6092-99. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.09.019>
- (18) Neitzel RL, Saylor SK, Arain AL, et al. Metal Levels, Genetic Instability, and Renal Markers in Electronic Waste Workers in Thailand. *Int J Occup Environ Med.* 2020 Apr;11(2):72-84. <https://doi.org/10.34172/ijoom.2020.1826>
- (19) Lu SY, Li YX, Zhang JQ, et al. Associations between polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and oxidative stress in people living near e-waste recycling facilities in China. *Environ Int.* 2016 Sep;94:161-69. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.05.021>
- (20) Wen S, Yang FX, Gong Y, et al. Elevated levels of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in male electrical and electronic equipment dismantling workers exposed to high concentrations of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans, polybrominated diphenyl ethers, and polychlorinated biphenyls. *Environ Sci Technol.* 2008 Jun 1;42(11):4202-07. <https://doi.org/10.1021/es800044m>
- (21) Upadhyay K, Viramgami A, Pagdhune A, et al. Hematological and cardiovascular effects of chronic low level lead exposure: a study on e-waste recyclers. *Clin Epidemiol Glob Heal.* 2021 Jan-Mar;9:269-74. <https://doi.org/10.1016/j.cegh.2020.09.009>
- (22) Scheepers PTJ, Duca RC, Galea KS, et al; Hbm Eu E-Waste Study Team. HBM4EU Occupational Biomonitoring Study on e-Waste-Study Protocol. *Int J Environ Res Public Health.* 2021 Dec 9;18(24):12987. <https://doi.org/10.3390/ijerph182412987>



## Monitorização da composição nutricional de alimentos prontos a consumir para pequeno-almoço e lanche, disponíveis no mercado português em 2021, com relevância para crianças em idade escolar

*Monitoring nutritional composition of ready-to-eat breakfast and snack foods, available in the Portuguese market in 2021, with relevance to school-age children*

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

andrea.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

A obesidade é a doença de origem nutricional mais prevalente a nível mundial e tem na sua génese, em mais de 96% dos casos, fatores comportamentais, nomeadamente estilos de vida obesogénicos. Em 2019, cerca de 29,6% e 12% das crianças portuguesas apresentavam excesso de peso e obesidade, respetivamente, de acordo com o sistema europeu de vigilância nutricional *infantil Childhood Obesity Surveillance Initiative* (COSI). Portugal instituiu a Estratégia Integrada para a Promoção da Alimentação Saudável (EIPAS), assente na promoção de um padrão de alimentação saudável, com vista à redução progressiva do consumo diário de açúcar e de sal pela população. O Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, monitorizou dados relativos à composição nutricional de alimentos prontos a consumir, relevantes para crianças em idade escolar, disponíveis no mercado português em 2021, com base na rotulagem obrigatória, das categorias de alimentos, iogurtes, cereais de pequeno-almoço e barras de cereais. Os valores médios obtidos para os iogurtes foram: valor energético – 81 kcal/100 g; lípidos – 2,4 g/100 g; ácidos gordos saturados – 1,5 g/100 g; hidratos de carbono – 10,5 g/100 g; açúcares – 9,9 g/100 g; proteínas – 3,8 g/100 g; sal – 0,14 g/100 g. Para os cereais de pequeno-almoço as médias foram: valor energético – 386 kcal/100 g; lípidos – 7,3 g/100 g; ácidos gordos saturados – 2,0 g/100 g; hidratos de carbono – 67,4 g/100 g; açúcares – 18,8 g/100 g; fibras – 7,1 g/100 g; proteínas – 8,9 g/100 g; sal – 0,46 g/100 g. Para as barras de cereais, as médias obtidas foram: valor energético – 425 kcal/100 g; lípidos – 15,6 g/100 g; ácidos gordos saturados – 5,8 g/100 g; hidratos de carbono – 59,7 g/100 g; açúcares – 24,5 g/100 g; fibras – 6,7 g/100 g; proteínas – 8,6 g/100 g; sal – 0,45 g/100 g. Comparando com as metas preconizadas na EIPAS verificou-se que 24% dos iogurtes, 10% dos cereais de pequeno-almoço e 5% das barras de cereais, têm teores de açúcar iguais ou inferiores ao recomendado e que 49% e 33% dos cereais de pequeno-almoço e barras de cereais, respetivamente, têm teores de sal abaixo do máximo desejável.

### \_Abstract

*Obesity is the most prevalent nutritional disease worldwide and has, in more than 96% of cases, behavioral factors, namely obesogenic lifestyles. In 2019, around 29.6% and 12% of Portuguese children were overweight and obese, respectively, according to the European Child Nutrition Surveillance System Childhood Obesity Surveillance Initiative*

*(COSI). Portugal instituted the Integrated Strategy for the Promotion of Healthy Eating (EIPAS), based on the promotion of a healthy eating pattern, with a view to progressively reducing the population's daily consumption of sugar and salt. In 2021, the National Institute of Health Doutor Ricardo Jorge monitored data on the nutritional composition of ready-to-eat foods, relevant for school-age children, available on the Portuguese market: yoghurts, breakfast cereals and cereal bars. The average values obtained for yoghurts were: energy value – 81 kcal/100 g; lipids – 2.4 g/100 g; saturated fatty acids – 1.5 g/100 g; carbohydrates – 10.5 g/100 g; sugars – 9.9 g/100 g; proteins – 3.8 g/100 g; salt – 0.14 g/100 g. For breakfast cereals, the means were: energy value – 386 kcal/100 g; lipids – 7.3 g/100 g; saturated fatty acids – 2.0 g/100 g; carbohydrates – 67.4 g/100 g; sugars – 18.8 g/100 g; fibers – 7.1 g/100 g; proteins – 8.9 g/100 g; salt – 0.46 g/100 g. For cereal bars, the averages obtained were: energy value – 425 kcal/100 g; lipids – 15.6 g/100 g; saturated fatty acids – 5.8 g/100 g; carbohydrates – 59.7 g/100 g; sugars – 24.5 g/100 g; fibers – 6.7 g/100 g; proteins – 8.6 g/100 g; salt – 0.45 g/100 g. Comparing with the targets set by EIPAS, it was found that 24% of yoghurts, 10% of breakfast cereals and 5% of cereal bars have sugar levels equal to or lower than recommended and that 49% and 33% of breakfast cereals and cereal bars, respectively, have salt levels below the desirable maximum.*

### \_Introdução

A obesidade é a doença de origem nutricional mais prevalente a nível mundial e tem na sua génese, em mais de 96% dos casos, fatores comportamentais, nomeadamente estilos de vida obesogénicos (1). Estudos apontam para uma forte estabilidade da obesidade ao longo da vida, particularmente quando esta se inicia em idade precoce e se mantém para além dos períodos críticos do crescimento (6-7 anos: idade do ressalto adipocitário e 11-13 anos: idade do pico de aceleração de crescimento pubertário) (2).



Em 2019, cerca de 29,6% e 12% das crianças portuguesas apresentavam excesso de peso e obesidade, respetivamente, de acordo com o sistema europeu de vigilância nutricional infantil *Childhood Obesity Surveillance Initiative* (COSI) (3). Efetivamente, e de acordo com vários estudos realizados ao longo dos últimos anos, em Portugal, a prevalência de excesso de peso (incluindo obesidade) é transversal à idade pediátrica (1-15 anos) e com início em idade precoce (1-3 anos) (1).

De acordo com os resultados divulgados no Inquérito Alimentar Nacional e Atividade Física (IAN-AF), a ingestão média nacional de açúcares livres (açúcares adicionados aos alimentos pela indústria, restauração ou consumidor, além de açúcares presentes naturalmente no mel, xaropes e sumos de fruta) corresponde a 35 g/dia, contribuindo, em média, com 7,5% para o valor energético total (VET). Este contributo verifica-se superior no grupo etário dos adolescentes com 10,5% e no grupo etário das crianças com 9,6%.

Ainda de acordo com o IAN-AF, a análise da contribuição dos grupos e subgrupos alimentares, para a ingestão de açúcares livres mostrou que o açúcar de mesa/de adição é o maior contribuidor (21,4%). Os iogurtes (incluindo leites fermentados) e cereais de pequeno almoço contribuem com 10,2% e 5,2%, respetivamente.

A nível nacional, os ácidos gordos saturados contribuem com 10,6% para o VET. Quando comparados com os adultos, as crianças e adolescentes apresentam maior contributo percentual dos ácidos gordos saturados para o VET (12,1% e 12,0%, respetivamente), com consumos médios de 21,9 g/dia e 27,5 g/dia, respetivamente (4).

De realçar que, em relação ao consumo de sal, além da recomendação de moderação na adição de sal durante a preparação dos alimentos (nomeadamente da sopa), importa sublinhar o facto de muitos produtos processados, nomeadamente derivados de cereais, conterem grandes quantidades de sódio.

Apesar destes dados, entre 2008 e 2019, Portugal tem vindo a apresentar consistentemente um decréscimo da prevalência de excesso de peso e obesidade infantil, tendo-se verificado uma redução tanto na prevalência de excesso peso infantil (de 37,9% para 29,6%), como na obesidade infantil

– de 15,3% para 12,0% (3). Para tal, estruturar um comportamento alimentar e de atividade física saudável é o maior legado que os educadores deixam a uma criança, pelo que todos os cuidadores são responsáveis pela saúde das gerações futuras.

Pretendendo responder a esta problemática, 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 0,2 g/100 g para sopas e pratos principais e de 0,3 g/100 g para os restantes alimentos e teores máximos de açúcar de 5 g/100 g para alimentos sólidos (5).

### Objetivos

Monitorizar a composição nutricional nas categorias iogurtes, cereais de pequeno-almoço (cereais PA) e barras de cereais, disponíveis no mercado português em 2021, quanto aos teores de: energia, lípidos, ácidos gordos saturados, hidratos de carbono, açúcares, fibra (quando aplicável), proteínas e sal. Confrontar os valores obtidos com as metas preconizadas pela Estratégia Integrada para a Alimentação Saudável para 2020, com valores-guia e com resultados obtidos em estudos anteriores.

### Material e métodos

Procedeu-se à avaliação da composição nutricional nas categorias iogurtes, cereais PA e barras de cereais, quanto aos teores de: energia, lípidos, ácidos gordos saturados, hidratos de carbono, açúcares, fibra (cereais PA e barras de cereais), proteínas e sal. A categoria iogurtes inclui iogurtes sólidos, líquidos e leites fermentados. A categoria de cereais PA inclui também as farinhas/flocos de cereal infantis, mas exclui as farinhas/papas para bebés. A recolha de dados foi efetuada em 2021, através da consulta da informação constante dos rótulos disponibilizados no comércio eletrónico de uma cadeia de hipermercados a operar no mercado português.



Os valores obtidos foram comparados, para o açúcar e sal, com as recomendações previstas na EIPAS: 5 g/100 g e 0,3 g/100 g, respetivamente; para o valor energético recorreu-se ao manual de "Orientações para ementas e refeitórios escolares" redigido pela Direção Geral da Educação (DGE), onde se refere que os iogurtes não deverão conter mais de 100 kcal/100 g de alimento (6).

### **Resultados e discussão**

Foram determinados os parâmetros estatísticos: média, mediana, moda, mínimo e máximo, para os componentes energia, lípidos, ácidos gordos saturados, hidratos de carbono, açúcares, fibra (cereais PA e barras de cereais) proteína e sal, para as amostras consideradas, 369 iogurtes, 146 de cereais PA e 76 de barras de cereais (tabela 1).

Do total de 369 iogurtes avaliados, 284 (77%) cumpriam os limites da DGE para utilização em âmbito escolar, no que se refere ao valor calórico. Para o teor de açúcar, os valores médio e mediana, 9,9 g/100 g e 10,0 g/100 g, respetivamente, apresentavam-se consideravelmente acima dos limites estabelecidos pela EIPAS (5 g/100 g). A média para o teor de sal encontrava-se abaixo do valor preconizado na EIPAS (0,3g/100g), conforme expectável nesta categoria (tabela 1).

O estudo realizado em 2019 revelou para os iogurtes sólidos e líquidos, medianas de teor de açúcar de 11,5 e 11,0 g/100 g, respetivamente, o que demonstra o esforço da indústria no sentido da sua redução gradual (7).

Relativamente aos cereais de pequeno almoço, observando os valores médio e mediana, verificamos que o teor de açúcar, 18,8 g/100 g, e 20,0 g/100 g, respetivamente, se encontrava muito acima da meta definida na EIPAS. De referir ainda que a média do teor de sal foi de 0,46 g/100 g, o que também excede o limites da EIPAS para este parâmetro.

O estudo realizado em 2018 revelou para os cereais de pequeno almoço uma mediana de teor de açúcar de 22,0 g/100g, o que demonstra o esforço da indústria no sentido da sua redução gradual (8).

Na categoria de alimentos barras de cereais, observando os valores médios, verificamos que o teor de açúcar 24,5 g/100g se encontra muito acima da meta definida na EIPAS. De referir ainda que a média do teor de sal é 0,45 g/100 g, o que também excede o limite máximo desejável definido na EIPAS para este parâmetro.

Quando comparamos os dados dos cereais de pequeno almoço com as barras de cereais, apresentados em valores médios, observamos que as barras de cereais apresentam maior valor energético, justificado quer pelo maior teor de lípidos (e de ácidos gordos saturados), assim como, pelo maior teor de açúcar. Adicionalmente, apresentam um menor teor de fibras (tabela 1).

No que respeita aos teores de açúcar, dos 369 iogurtes analisados, verificou-se que 90 (24%) obedeciam às recomendações da EIPAS. Adicionalmente, do total da amostra, observou-se ainda que 194 (53%) se encontravam acima de 10 g/100 g e 55 (15%) acima de 15 g açúcar/100 g de iogurte (gráfico 1).

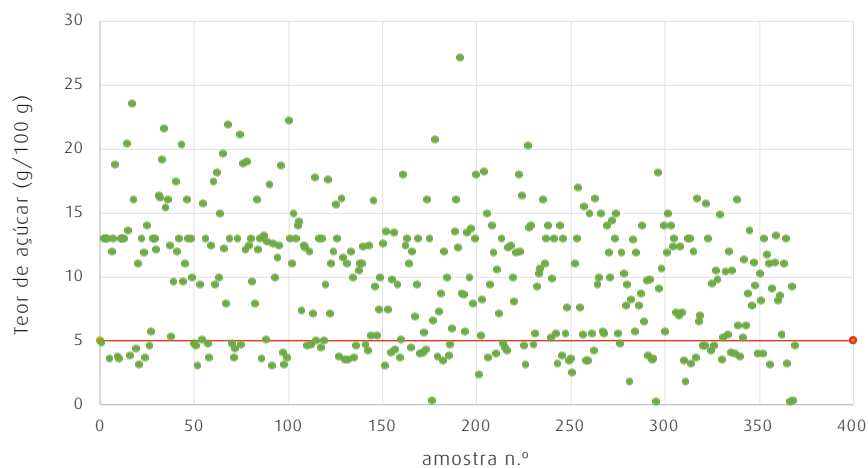


Tabela 1: Estatísticas do valor energético, teores de lípidos, ácidos gordos (AG) saturados, hidratos de carbono, açúcar, fibras, proteínas e sal, em iogurtes, cereais de pequeno almoço (cereais PA) e barras de cereais.

|                             |         | Energia   | Lípidos | AG saturados | Hidratos de Carbono | Açúcar | Fibra | Proteínas | Sal  |
|-----------------------------|---------|-----------|---------|--------------|---------------------|--------|-------|-----------|------|
|                             |         | Kcal/100g | g/100 g |              |                     |        |       |           |      |
| Iogurtes<br>(n=369)         | Média   | 81        | 2,4     | 1,5          | 10,5                | 9,9    | n.a.  | 3,8       | 0,14 |
|                             | Mediana | 74        | 1,5     | 1,0          | 11,0                | 10,0   | n.a.  | 3,5       | 0,13 |
|                             | Moda    | 73        | 1,5     | 0,1          | 13,0                | 13,0   | n.a.  | 2,7       | 0,10 |
|                             | Mínimo  | 28        | 0,0     | 0,0          | 2,8                 | 0,2    | n.a.  | 1,8       | 0,00 |
|                             | Máximo  | 194       | 11,5    | 7,2          | 28,8                | 27,1   | n.a.  | 11,7      | 1,00 |
| Cereais de PA<br>(n=146)    | Média   | 386       | 7,3     | 2,0          | 67,4                | 18,8   | 7,1   | 8,9       | 0,46 |
|                             | Mediana | 386       | 5,2     | 1,2          | 68,9                | 20,0   | 6,0   | 8,7       | 0,31 |
|                             | Moda    | 375       | 1,5     | 0,2          | 84,0                | 29,0   | 5,0   | 11,0      | 0,03 |
|                             | Mínimo  | 114       | 0,3     | 0,1          | 19,7                | 0,8    | 1,5   | 0,3       | 0,00 |
|                             | Máximo  | 497       | 25,0    | 11,0         | 87,0                | 40,0   | 29,0  | 8,0       | 1,80 |
| Barras de cereais<br>(n=76) | Média   | 425       | 15,6    | 5,8          | 59,7                | 24,5   | 6,7   | 8,6       | 0,45 |
|                             | Mediana | 421       | 13,9    | 5,1          | 65,2                | 26,6   | 5,5   | 6,4       | 0,42 |
|                             | Moda    | 441       | 16,0    | 4,9          | 70,7                | 27,0   | 4,5   | 6,0       | 0,70 |
|                             | Mínimo  | 79        | 1,3     | 0,4          | 12,0                | 2,0    | 1,9   | 1,7       | 0,06 |
|                             | Máximo  | 559       | 36,0    | 18,1         | 78,0                | 46,8   | 25,0  | 29,0      | 1,30 |

n.a. - não aplicável.

Gráfico 1: Teor de açúcar em iogurtes (n=369).



A linha a vermelho representa o limite estabelecido pela EIPAS (5 g/100 g).



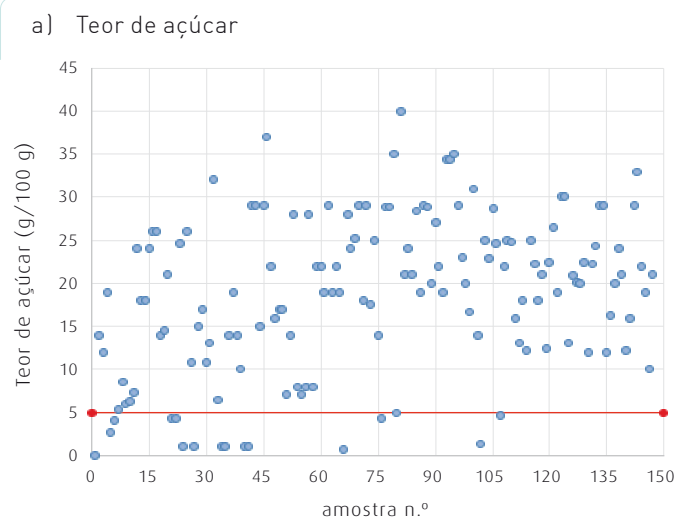
Como pode ser observado no **gráfico 2a**, na amostra de cereais de pequeno-almoço (n=146) analisada, constatou-se que 15 (10%) encontravam-se abaixo do limite de 5 g/100 g preconizado pela EIPAS para teor de açúcar. Observou-se ainda que 99 (68%) se encontravam acima de 15 g de açúcar/100 g de alimento.

No que respeita ao teor de fibra, de acordo com o disposto no Regulamento (CE) n.º 1924/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 20 de dezembro, relativo às alegações nutricionais e de saúde sobre os alimentos, uma alegação de

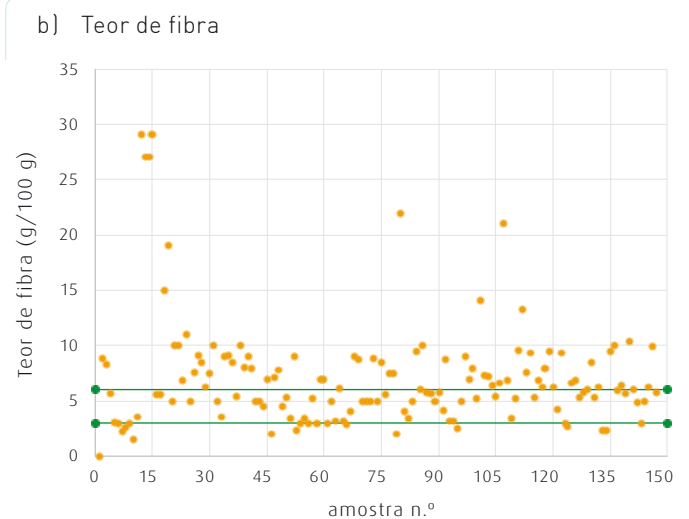
que um alimento é uma fonte de fibras só pode ser feita quando o produto contiver, no mínimo, 3 g de fibras por 100 g; e uma alegação de que um alimento é rico em fibras, só pode ser feita quando o produto contiver, no mínimo, 6 g de fibras por 100 g. Assim, verificou-se que 133 (91%) dos cereais de pequeno-almoço analisados são considerados fonte de fibra, dos quais 75 (51%) são ricos em fibra (**gráfico 2b**).

Relativamente ao teor de sal (**gráfico 2c**), verificou-se que 49% têm o teor desejável (<0,3 g/100 g).

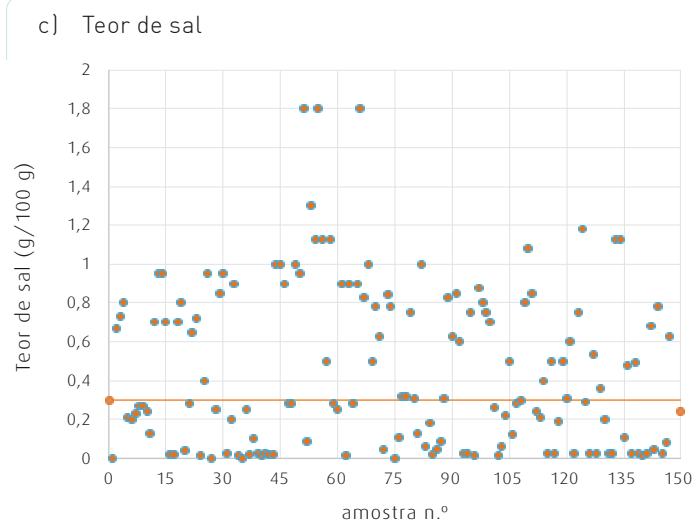
Gráfico 2: Teores de açúcar, fibra e sal em cereais de pequeno-almoço (n=146).



A linha a vermelho representa o limite estabelecido pela EIPAS (5 g/100 g).



As linhas a verde representam alimentos considerados fonte de fibra (>3 g/100 g) e ricos em fibra (>6 g/100 g), de acordo com o Regulamento (CE) N.º 1924/2006.



A linha a vermelho representa o limite estabelecido pela EIPAS (0,3 g/100 g).

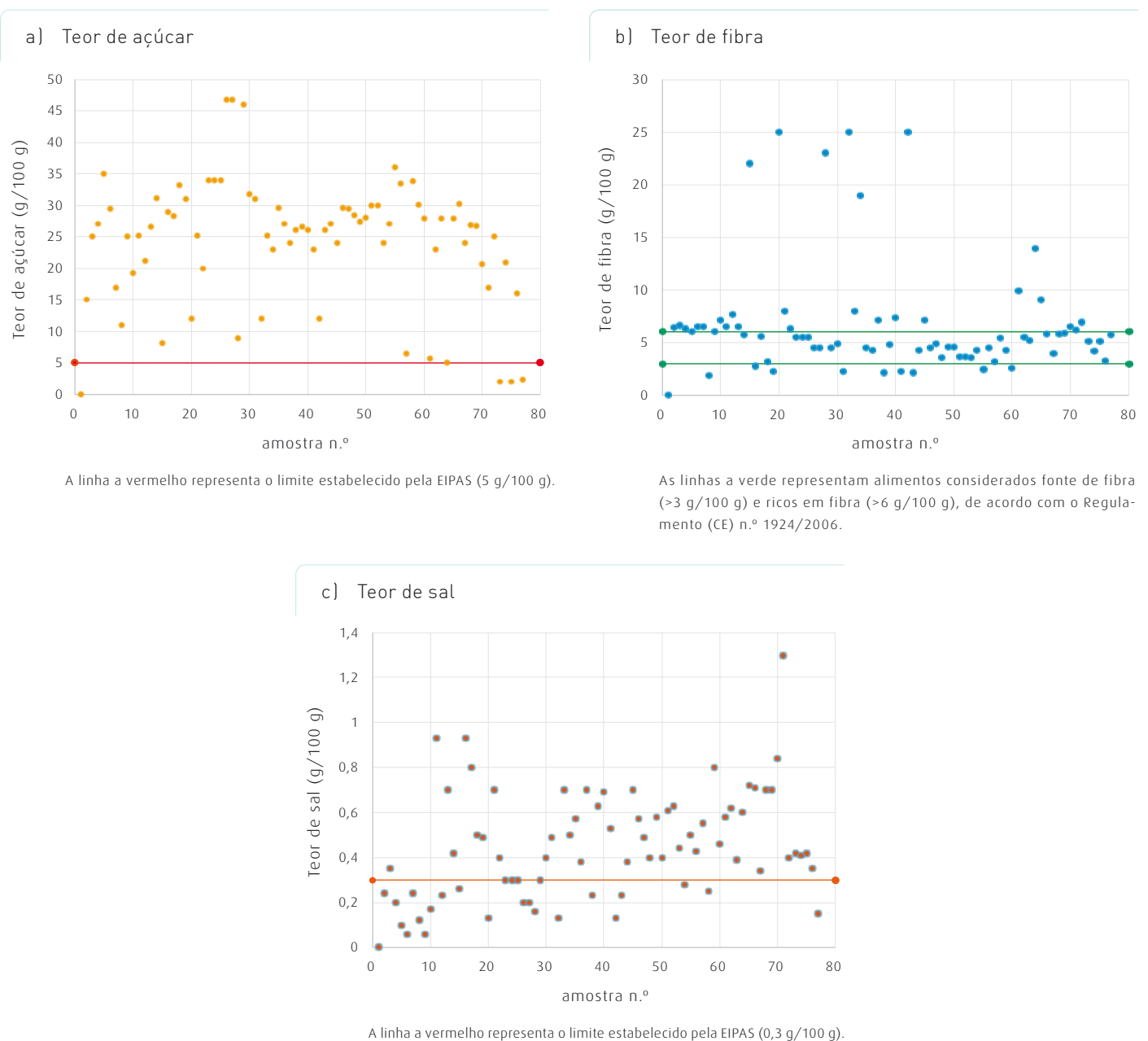


Na amostra de barras de cereais considerada (n=76), apenas 4 (5%) cumpriam com as recomendações da EIPAS para teor de açúcar: 5 g/100 g (gráfico 3a). Nesta amostra, observou-se ainda que, 64 (84%) se encontravam acima de 15 g de açúcar/100 g de alimento. Quanto ao teor de fibra das barras de cereais, 67 (88%) enquadram-se nos valores definidos para a utilização da alegação fonte de fibra (>3g/100g), de

entre os quais 29 (38%) podem considerar-se ricos em fibra (>6g/100g) (gráfico 3b).

Relativamente ao teor de sal, obteve-se uma taxa de satisfação de 33% perante os valores preconizados pela EIPAS (gráfico 3c).

Gráfico 3: Teores de açúcar, fibra, e sal em barras de cereais (n=76).





## **\_Conclusões**

Tendo em consideração a relevância dos alimentos em estudo na alimentação das crianças, é fundamental melhorar a oferta alimentar (dentro e fora do ambiente escolar), apostando na continuação da sua reformulação e contribuindo para inverter a tendência de comportamentos alimentares obesogénicos, com ganhos em termos da sua saúde e económicos.

Neste sentido, é também importante a promoção de hábitos alimentares saudáveis, o aumento da literacia dos consumidores, onde a escolha de alguns alimentos em detrimento de outros pode ser determinante.

Apesar dos elevados valores observados nas medianas das categorias alimentares estudadas, concretamente no que respeita aos teores de sal e açúcar, a enorme discrepância entre os valores máximos e mínimos revelam a possibilidade da sua redução progressiva, educando o gosto do consumidor.

## **Referências bibliográficas:**

- (1) Direção-Geral da Saúde. Alimentação saudável dos 0 aos 6 anos: linhas de orientação para profissionais e educadores. Lisboa: DGS, 2019. <https://nutrimento.pt/activeapp/wp-content/uploads/2019/10/Alimentac%CC%A7a%CC%83o-Sauda%CC%81vel-dos-0-aos-6-anos-.pdf.pdf>
- (2) Rêgo CS. Obesidade em idade pediátrica: marcadores clínicos e bioquímicos associados a comorbilidade. Porto : Abbott Laboratórios, 2008.
- (3) Rito A, Mendes S, Baleia J, et al. Childhood Obesity Surveillance Initiative: COSI Portugal 2019. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2021. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/7783>
- (4) 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%20Brochura%20de%20resultados\\_0.pdf](https://ian-af.up.pt/sites/default/files/IAN-AF%20Brochura%20de%20resultados_0.pdf)
- (5) Despacho n.º 11418/2017, de 29 de dezembro. DR 2.ª série de 2017-12-29, nº 249:29595-8. Aprova a Estratégia Integrada para a Promoção da Alimentação Saudável (EIPAS). <https://files.dre.pt/2s/2017/12/249000000/2959529598.pdf>
- (6) Lima RM. Orientações sobre ementas e refeitórios escolares. Lisboa: Direção-Geral da Educação, 2018. <https://www.dge.mec.pt/sites/default/files/Esaude/oere.pdf>
- (7) Lopes A, Fernandes P, Brazão R, et al. Monitorização do teor de açúcar em algumas categorias de alimentos disponíveis no mercado: realidade portuguesa em 2019. Boletim Epidemiológico Observações. 2020;9(27):4-7. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/7233>
- (8) Vargues AL, Fernandes P, Brazão R, et al. Monitorização do teor de açúcar em alimentos disponíveis no mercado português: contributo para promover uma alimentação saudável. Boletim Epidemiológico Observações. 2018;7(22):10-12. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/5583>



## Monitorização dos teores de energia, lípidos, ácidos gordos saturados e sal numa seleção de alimentos prontos para consumo disponíveis no mercado português, 2021

*Monitoring energy, fat, saturated fatty acids and salt content on a selection of ready-to-eat food available in the Portuguese market, 2021*

Paulo Fernandes, Andreia Lopes, Roberto Brazão, Sidney Tomé, 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

Considerando que é reconhecida a associação entre o consumo excessivo de açúcar e de sal com o desenvolvimento de doenças crónicas, 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. Uma das missões do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, desenvolvida pelo Departamento de Alimentação e Nutrição, é a monitorização de dados relativos aos géneros alimentícios presentes no mercado português, nomeadamente a informação nutricional. Os dados utilizados neste trabalho foram recolhidos durante o ano de 2021 na loja *online* de uma cadeia de hipermercados presente em Portugal, e referem-se ao valor energético e teores de lípidos, de ácidos gordos saturados e de sal em alimentos prontos para consumo, nomeadamente sopas, pratos confeccionados e conservas. As medianas de valores encontrados para as sopas foram de 133 kcal/100 g para a energia, de 9,1 g/100 g para os lípidos, de 0,9 g/100 g para os ácidos gordos saturados e de 1,3 g/100 g para o sal. Para os pratos confeccionados foram de 137 kcal/100 g para a energia, de 4,5 g/100 g para os lípidos, de 1 g/100 g para os ácidos gordos saturados e de 0,9 g/100 g para o sal. Para as conservas foram de 178 kcal/100 g para a energia, de 10,5 g/100 g para os lípidos, de 2,2 g/100 g para os ácidos gordos saturados e de 1,4 g/100 g para o sal. Comparando os valores obtidos com os valores preconizados na EIPAS, no que respeita aos teores de sal, verificou-se que 100% das sopas e pratos confeccionados e 99% das conservas não seguiam as recomendações.

### \_Abstract

Considering the well-known association between excessive sugar and salt intake and the development of chronic diseases, the Integrated Strategy for the Promotion of Healthy Eating (EIPAS) was approved in Portugal. It is based on the promotion of a healthy eating pattern aiming to decrease the daily consumption of sugar and salt among the general population. One of the missions of the National Institute of Health carried by the Food and Nutrition Department is the monitoring of nutritional information of food available on the Portuguese market. The data used in this article were collected during 2021 at the online store of a supermarket chain in Portugal and they refer to energy value, fat, saturated fat and salt content in ready to eat food, namely soups, main dishes and preserves. The median values

for soups were 133 kcal/100 g for energy, 9.1 g/100 g for fats, 0.9 g/100 g for saturated fatty acids and 1.3 g/100 g for salt. For main dishes the median values were 137 kcal/100 g for energy, 4.5 g/100 g for fats, 1.0 g/100 g for saturated fatty acids and 0.9 g/100 g for salt. For the preserves, the median values were 178 kcal/100 g for energy, 10.5 g/100 g for fats, 2.2 g/100 g for saturated fatty acids and 1.4 g/100 g for salt. The collected data was compared with the recommended values of EIPAS, regarding salt content and 100% soups and main dishes and 99% of preserves didn't follow the recommendations.

### \_Introdução

Os resultados obtidos pelo Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física, 2015-2016 (IAN-AF) indicam que aproximadamente 24% da população ingere gordura acima do recomendado (superior a 35% do Valor Energético Total – VET), sendo essa prevalência superior nos adolescentes (30%) e adultos (26%). O contributo percentual de gordura saturada é superior nas crianças (12,1%) e adolescentes (12,0%), apesar do consumo médio ser superior nos adolescentes (28 g/dia) e nos adultos (24 g/dia) <sup>(1)</sup>.

O mesmo estudo revela que, em média, os portugueses consomem 7,4 g 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 (2300 mg/dia) <sup>(1)</sup>.

Quanto ao excesso de peso, o IAN-AF indica que cerca de 5.9 milhões de portugueses (quase 6 em cada 10) têm excesso de peso (pré-obesidade e obesidade) <sup>(1)</sup>.

Para a promoção da saúde, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reforça que os adultos que pratiquem uma dieta rica em frutos e cereais e pobre em gorduras, açúcar e sal apre-



sentam menor risco de desenvolver uma ou mais doenças cardiovasculares e certos tipos de cancro. Uma dieta saudável reduz a probabilidade de desenvolver excesso de peso ou obesidade (2).

Em Portugal, 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 diminuir a ingestão de alguns componentes alimentares, nomeadamente açúcar e sal. Esta Estratégia estabelece teores máximos para, além do açúcar, o sal de 0,2 g/100 g para sopas e pratos principais e de 0,3 g/100 g para os restantes alimentos (3).

### **\_Objetivos**

Monitorizar o valor energético e os teores de lípidos, de ácidos gordos saturados e de sal de três categorias de alimentos disponíveis no mercado português: sopas, pratos prontos para consumo e conservas. Comparar os teores de sal encontrados com as metas preconizadas para 2020, pela EIPAS. Contribuir para, com base no conhecimento da realidade nacional atual, apoiar as autoridades de saúde na definição e avaliação das medidas de saúde pública relacionadas com a alimentação.

### **\_Materiais e métodos**

A seleção dos produtos-alvo do presente estudo baseou-se no facto de todos eles serem produtos prontos para consumo sem requererem preparação culinária.

Procedeu-se à recolha do valor energético, dos teores de lípidos, de ácidos gordos saturados e de sal dos produtos correspondentes às categorias alimentares sopas, pratos prontos para consumo e conservas. Esta recolha de dados foi efetuada através da consulta da informação constante dos rótulos disponibilizados por uma das principais cadeias de supermercados a operar no mercado português, na respetiva loja *online*.

A recolha de dados ocorreu durante o ano de 2021.

Os valores obtidos foram comparados com as recomendações apresentadas na EIPAS, de um teor máximo de sal de 0,2 g/100 g para sopas e pratos principais e um teor máximo de sal para os restantes alimentos de 0,3 g/100 g. Os valores correspondentes aos restantes componentes foram apresentados, não existindo, no entanto, um valor de referência na EIPAS.

### **\_Resultados e discussão**

Recolheram-se os dados de composição relativos à energia, teor de lípidos, de ácidos gordos saturados e de sal de 5 sopas, de 32 pratos e de 196 conservas. Só foram considerados, para este trabalho, os produtos que apresentavam, na informação nutricional online, valores para os quatro parâmetros indicados.

As sopas selecionadas para a recolha da informação nutricional foram as sopas pré-embaladas e prontas para consumo. Os pratos confeccionados foram pratos pré-embalados, prontos para consumo, à base de carne, peixe ou vegetais. As conservas incluíram conservas de produtos à base de carne, conservas de produtos à base de pescado e conservas de produtos à base de vegetais, como salsichas de vegetais. Também foram incluídas nesta categoria conservas de receitas compostas de produtos de origem animal e vegetal.



### Sopas e pratos confeccionados

O número total de sopas consideradas para este trabalho foi de apenas 5 das 17 inicialmente identificadas, verificando-se que 70,6% dos produtos não apresentam a informação nutricional completa para os parâmetros considerados: energia, lípidos, ácidos gordos saturados e sal.

O número de pratos confeccionados pré-embalados considerados para este trabalho foi de 32 dos 45 inicialmente identificados, verificando-se que 28,9% dos produtos não apresentam a informação nutricional completa para os parâmetros considerados: energia, lípidos, ácidos gordos saturados e sal.

Foram determinados os parâmetros estatísticos média, mediana, máximo e mínimo para o conjunto das 37 amostras consideradas (tabela 1).

No que respeita ao teor de sal, as medianas são de 1,3 g /100 g, e de 0,9 g /100 g, para as sopas e pratos confeccionados,

respetivamente, superiores ao objetivo proposto na EIPAS de 0,2 g de sal /100 g (gráfico 1).

O valor energético das sopas (energia) apresenta uma mediana de 133 kcal/100 g, variando entre um mínimo de 38 a 172 kcal/100 g. O valor energético dos pratos confeccionados (energia) apresenta uma mediana de 137 kcal/100 g, variando entre um mínimo de 74 a 650 kcal/100 g.

Relativamente aos lípidos, obtiveram-se as medianas, em g/100 g, de 9,1 e 0,9 para lípidos totais e ácidos gordos saturados, respetivamente, para as sopas e de 4,5 e de 1,0, para lípidos totais e ácidos gordos saturados, respetivamente, para os pratos confeccionados.

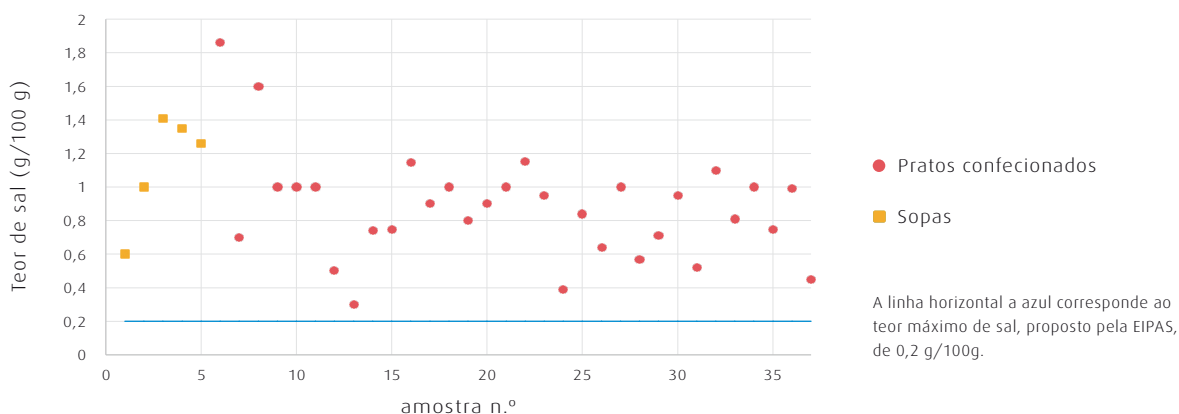
Dos 37 produtos considerados, na categoria sopas e pratos confeccionados, nenhum cumpriu a recomendação da EIPAS de teor máximo de sal de 0,2 g/100 g.

Para os componentes “energia”, “lípidos” e “ácidos gordos saturados”, a EIPAS não define um limite máximo.

Tabela 1: Média, mediana, máximo e mínimo de energia, lípidos, ácidos gordos saturados e sal, em sopas e pratos confeccionados (pratos conf.) (n=37).

|         | Energia (kcal/100 g) |              | Lípidos (g/100 g) |              | Ac. gordos saturados (g/100 g) |              | Sal (g/100 g) |              |
|---------|----------------------|--------------|-------------------|--------------|--------------------------------|--------------|---------------|--------------|
|         | Sopas                | Pratos conf. | Sopas             | Pratos conf. | Sopas                          | Pratos conf. | Sopas         | Pratos conf. |
| Mínimo  | 38                   | 74           | 1,0               | 1,6          | 0,1                            | 0,3          | 0,6           | 0,3          |
| Máximo  | 172                  | 650          | 10,1              | 40,3         | 3,0                            | 11,9         | 1,4           | 1,9          |
| Média   | 119                  | 181          | 7,1               | 8,0          | 1,2                            | 2,3          | 1,1           | 0,9          |
| Mediana | 133                  | 137          | 9,1               | 4,5          | 0,9                            | 1,0          | 1,3           | 0,9          |

Gráfico 1: Teor de sal em sopas e pratos confeccionados, expresso em g de sal por 100 g de produto (n=37).





### Conservas

O número de conservas consideradas para este trabalho foi de 196 das 219 inicialmente identificadas, verificando-se que 10,5% dos produtos não apresentam a informação nutricional completa para os parâmetros considerados: energia, lípidos, ácidos gordos saturados e sal.

Foram determinados os parâmetros estatísticos média, mediana, máximo e mínimo para o conjunto das 196 amostras consideradas (tabela 2)

Das conservas consideradas, apenas duas coincidiram com o limite superior proposto pela EIPAS, de 0,3 g de sal/100 g, sendo a mediana dos teores consideravelmente mais elevada do que a recomendação com 1,4 g/100 g (gráfico 2).

A mediana do valor energético (energia) das conservas foi 178 kcal/100 g, variando entre um mínimo de 67 a 534 kcal/100 g.

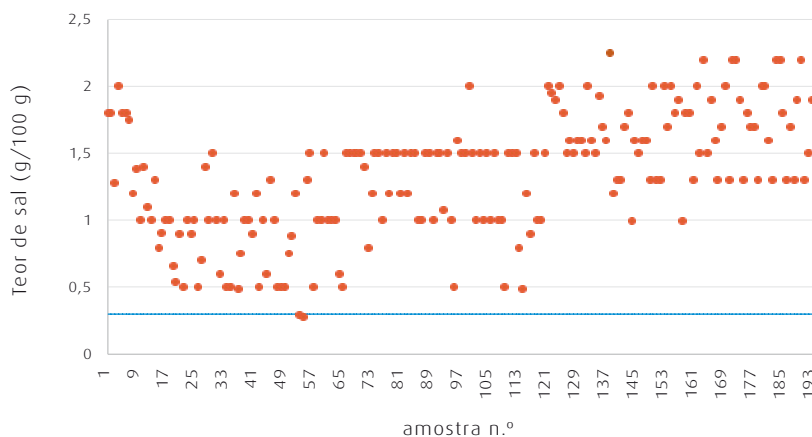
Relativamente aos lípidos, obtiveram-se as medianas, em g/100 g, de 10,5 e 2,2 para lípidos totais e ácidos gordos saturados, respetivamente, para as conservas.

Dos 196 produtos considerados, na categoria conservas, 2 estão de acordo com a recomendação da EIPAS de teor máximo de sal de 0,3 g/100 g, correspondendo a 99% de desadequação àquelas recomendações. No entanto, a EIPAS não define um limite máximo para os componentes “energia”, “lípidos” e “ácidos gordos saturados”.

Tabela 2: Média, mediana, máximo e mínimo de energia, lípidos, ácidos gordos saturados e sal, em conservas (n=196).

|         | Energia<br>(kcal/100 g) | Lípidos<br>(g/100 g) | Ac. gordos saturados<br>(g/100 g) | Sal<br>(g/100 g) |
|---------|-------------------------|----------------------|-----------------------------------|------------------|
| Mínimo  | 67                      | 0,3                  | 0,1                               | 0,3              |
| Máximo  | 534                     | 41,0                 | 9,0                               | 2,3              |
| Média   | 191                     | 11,8                 | 2,7                               | 1,3              |
| Mediana | 178                     | 10,5                 | 2,2                               | 1,4              |

Gráfico 2: Teor de sal em conservas, expresso em g de sal por 100 g de produto (n=196).



A linha horizontal a azul corresponde ao teor máximo de sal, proposto pela EIPAS, de 0,3 g/100g.



## **\_Conclusões**

Da recolha de dados efetuada, quando comparados os valores energéticos das três categorias de produtos, verifica-se uma grande disparidade dos valores de energia e também dos teores de lípidos, provavelmente atribuível ao facto de parte considerável das conservas ter como líquido de conservação gordura (azeite ou óleo vegetal, no caso das conservas de peixe).

Apesar de os limites para estes componentes alimentares não estarem contemplados na EIPAS, esta recolha de informação poderá ser relevante numa perspetiva de monitorização do mercado.

No que respeita aos teores de sal nos grupos de produtos em análise, foi possível verificar que na sua quase totalidade apresentaram teores acima dos valores indicativos preconizados pela EIPAS. Essa condição verificou-se em 100% das sopas e pratos confeccionados e em 99% das conservas.

Os resultados deste trabalho demonstram que será ainda possível a contínua reformulação dos alimentos das categorias em questão, não obstante os resultados positivos decorrentes do esforço de reformulação atualmente em curso no âmbito da EIPAS.

Pode também concluir-se que a qualidade da informação disponível nas lojas *online* necessita de melhorias, dado que 17,1% dos produtos considerados não apresentam informação completa ou correta, correspondente à encontrada na rotulagem.

## **Referências bibliográficas:**

- (1) 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%20Brochura%20de%20resultados\\_0.pdf](https://ian-af.up.pt/sites/default/files/IAN-AF%20Brochura%20de%20resultados_0.pdf)
- (2) Organisation for Economic Cooperation and Development. Health at a Glance 2019: OECD indicators. Paris: OECD Publishing, 2019. <https://doi.org/10.1787/19991312>
- (3) Despacho n.º 11418/2017, de 29 de dezembro. DR 2ª série de 2017-12-29, nº 249:29595-8. Aprova a Estratégia Integrada para a Promoção da Alimentação Saudável (EIPAS). <https://files.dre.pt/2s/2017/12/249000000/2959529598.pdf>



## **Comparação de três métodos para deteção de *Salmonella* em diversos géneros alimentícios**

### *Comparison of three methods for Salmonella detection in different categories of foodstuffs*

Rosália Furtado<sup>1</sup>, Anabela Coelho<sup>1</sup>, Marisa Morais<sup>2</sup>, Ana Lúcia Leitão<sup>2,3</sup>, Margarida Saraiva<sup>1</sup>, Cristina Belo Correia<sup>1</sup>, Rita Batista<sup>1</sup>

rita.batista@insa.min-saude.pt

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

(2) Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa, Caparica, Portugal

(3) Centro de Engenharia Mecânica e Sustentabilidade de Recursos. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa, Caparica, Portugal

#### **\_Resumo**

Em 2020, de acordo com os dados, reportados por 22 Estados-membros e 5 Estados não-membros, constantes do *The European Union One Health 2020 Zoonoses Report*, elaborado em conjunto pela *European Food Safety Authority* (EFSA) e pelo *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), *Salmonella* foi o principal agente etiológico responsável por surtos de origem alimentar, estando envolvida em 694 surtos, que resultaram em 3686 casos de doença, 812 hospitalizações e 7 mortes. Considerando a importância desta bactéria zoonótica na segurança alimentar e na saúde humana, várias estratégias para a sua deteção e controlo em géneros alimentícios têm sido desenvolvidas e implementadas. Neste trabalho de estudo, foram analisadas 137 amostras de géneros alimentícios (78 naturais, potencialmente contaminadas, 21 artificialmente contaminadas com níveis altos de *Salmonella* e 38 artificialmente contaminadas com níveis baixos de *Salmonella*), com o objetivo de comparar o desempenho de três métodos de deteção de *Salmonella* spp.: o método cultural de referência da *International Organization for Standardization* (ISO), ISO 6579-1:2017/Amd 1:2020; um método de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) em tempo real e um método imunoenzimático automatizado. Embora o método de PCR em tempo real tenha sido o mais rápido, foi também o que evidenciou um maior número de falsos positivos e de resultados inconclusivos, estes últimos devido à inibição da reação de PCR. Executando o ensaio de acordo com os protocolos dos métodos ISO e imunoenzimático automatizado, obtiveram-se resultados equivalentes, tendo estes evidenciado ser mais robustos do que o PCR em tempo real ao testar diferentes matrizes alimentares, apesar do seu tempo de resposta ser mais demorado. A escolha de um método de PCR em tempo real pode ser apropriada quando o objetivo é testar matrizes alimentares que se sabe não interferirem com a reação de PCR e nas quais se espera um resultado negativo para *Salmonella*, não necessitando assim de uma confirmação posterior. Todos os métodos analíticos testados neste estudo, evidenciaram vantagens e limitações e, assim, podem ser utilizados como método de eleição para a deteção de *Salmonella* em géneros alimentícios, de acordo com o objetivo da análise laboratorial.

#### **\_Abstract**

In 2020, according to data reported by 22 Member States and 5 non-Member States, included in *The European Union One Health 2020 Zoonoses Report*, prepared jointly by the *European Food Safety Authority* (EFSA) and

the *European Center for Disease Prevention and Control* (ECDC), *Salmonella* was the main agent responsible for foodborne outbreaks, being involved in 694 outbreaks, which resulted in 3686 cases of illness, 812 hospitalizations and 7 deaths. Considering the importance of this zoonotic bacterium in food safety and human health, several strategies for its detection and control in foodstuffs have been developed and implemented. In this study, 137 food samples (78 potentially naturally contaminated, 21 artificially contaminated with high levels of *Salmonella* and 38 artificially contaminated with low levels of *Salmonella*) were analyzed in order to compare the performance of three *Salmonella* spp detection methods: The *International Organization for Standardization* (ISO) Cultural Reference Method, ISO 6579-1:2017/Amd 1:2020; a real-time *Polymerase Chain Reaction* (PCR) method and an automated enzyme-linked immunosorbent method. Although the real-time PCR method was the fastest, it was also the one that showed the highest number of false positives and inconclusive results, the latter due to the inhibition of the PCR reaction. ISO and automated enzyme-linked immunosorbent methods gave equivalent results and proved to be more robust than real-time PCR when testing different food matrices, despite their longer response times. Real-time PCR method may be appropriate when the objective is to test food matrices that are known not to interfere with the PCR reaction and in which a negative result for *Salmonella* is expected, thus not requiring further confirmation. All the analytical methods tested in this study showed advantages and limitations and, therefore, can be used as the method of choice for the detection of *Salmonella* in foodstuffs, according to the purpose of the laboratory analysis.

#### **\_Introdução**

A presença, nos géneros alimentícios, de bactérias patogénicas capazes de causar doenças transmitidas por alimentos continua a ser um importante problema de saúde pública para os consumidores em todo o mundo, com consequências económicas para os produtores e a indústria, desafiando uma abordagem multissetorial *One Health* para a implementação oportuna de medidas preventivas (1).



Em 2020, de acordo com os dados constantes do *The European Union One Health 2020 Zoonoses Report*, elaborado em conjunto pela *European Food Safety Authority* (EFSA) e pelo *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), *Salmonella* foi o agente etiológico mais frequentemente identificado em surtos de toxinfecção de origem alimentar, sendo responsável por 22,5% (N=694) de um total de 3086 surtos reportados. Nestes surtos, este agente foi responsável pelo maior número de hospitalizações (n=812, 48,5% do número total) e por 7 mortes (22,6% do número total). *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. Typhimurium monophasic* foram os serovares predominantes em 92,8% dos surtos causados por *Salmonella*. A ocorrência destes surtos foi frequentemente associada ao consumo de alimentos do grupo “ovos e ovoprodutos”, seguido do grupo “carne e produtos à base de carne” e de “alimentos compostos por múltiplos ingredientes” (2).

O método padrão (*golden standard*) para a deteção de *Salmonella* em géneros alimentícios inclui o uso de técnicas convencionais culturais que utilizam etapas de enriquecimento com seletividade crescente, terminando com o isolamento de *Salmonella* em placas de agar diferencial seletivo. A confirmação é baseada em testes bioquímicos ou realizada por espectrometria de massa (3). Embora esta metodologia seja bastante sensível e menos dispendiosa, é mais trabalhosa, tornando-se menos conveniente quando o objetivo é a análise de um elevado número de amostras. Para além disso, o tempo que decorre até à obtenção do resultado final pode ser muito longo, especialmente para alimentos em natureza (3). Com a finalidade de superar estas desvantagens, têm vindo a ser realizados estudos que visam o desenvolvimento de metodologias de fácil utilização, e ao mesmo tempo rápidas, sensíveis e específicas que possibilitem um *screening*, eliminando a fase cultural das amostras negativas no teste. Têm sido, por exemplo, desenvolvidos vários métodos imunológicos que dependem da ligação antigénio-anticorpo, para a deteção de *Salmonella* (4-6). Os alvos destes ensaios são componentes celulares específicos, como lipossacarídeos ou outras biomoléculas da membrana externa bacteriana. Apesar de um tempo de

ensaio mais curto em comparação com as técnicas de cultura tradicional, a deteção baseada em reações antigénio-anticorpo pode apresentar alguns problemas, como por exemplo a baixa sensibilidade do anticorpo para o microrganismo patogénico e a potencial interferência com contaminantes (7). Os avanços na biotecnologia têm levado também ao desenvolvimento de diversos métodos baseados na deteção de ácidos nucleicos, entre os quais os que utilizam a reação da polimerase em cadeia (PCR) (8,9). Nas abordagens baseadas na PCR, a deteção depende da amplificação de uma sequência que caracteriza o alvo e que pode ser amplificada milhões de vezes em menos de uma hora. Os métodos baseados na PCR têm mostrado especificidade, sensibilidade e precisão e um tempo de análise mais curto, contudo vários constituintes das matrizes alimentares podem inibir a reação.

### **\_Objetivo**

Este estudo teve como objetivo a comparação do desempenho do método convencional cultural de acordo com o método de referência ISO 6579-1:2017/Amd 1:2020, com outras duas metodologias utilizadas para a deteção de *Salmonella* spp: um método baseado na técnica de PCR em tempo real e um sistema imunoenzimático automatizado para a deteção de antígenos de *Salmonella*.

### **\_Materiais e métodos**

Neste estudo foram selecionadas e analisadas 137 amostras de géneros alimentícios, divididas em sete categorias diferentes (carnes cruas, alimentos prontos para consumo, mariscos, especiarias, cacau e derivados, ovoprodutos e laticínios). As amostras foram compradas em diferentes supermercados locais ou recolhidas em unidades de alimentação coletiva. Após aquisição, as amostras foram transportadas e armazenadas a temperatura adequada à sua conservação, e analisadas no prazo máximo de 24 h após a colheita. Destas 137 amostras, consideraram-se 3 grupos: A – 78 testadas como potencialmente contaminadas; B – 21 artificialmente contaminadas com níveis de *Salmonella* de  $10^7$  ufc (unidades formadoras de colónias) /25 g de amostra; e C – 38 artificialmente contamina-



das com níveis de *Salmonella* <120 ufc / 25 g de amostra. Como controlo positivo foram utilizadas três amostras da avaliação externa da qualidade e duas amostras obtidas de água peptonada tamponada (BPW), uma contaminada com *S. Goldcoast* (13 ufc/lentícula) e outra com *S. Typhimurium* (30-120 ufc/lentícula). Como controlo do processo (“branco”) foi utilizada BPW não inoculada.

As amostras foram ensaiadas para a deteção de *Salmonella* pelo método de referência internacional ISO 6579-1:2017/ Amd 1:2020 e por outras duas metodologias de *screening*: uma técnica de PCR em tempo real e um método imunoenzimático automatizado (10).

### Resultados e discussão

Os resultados relativos à deteção de *Salmonella* spp, pelo método de referência ISO 6579-1/Amd 1:2020 e pelo método alternativo, imunoenzimático automatizado, foram coincidentes, para o total de amostras analisadas (tabela 1).

Quando comparados os resultados obtidos pelo método imunoenzimático automatizado e pelo método de referência ISO, para as amostras potencialmente naturalmente conta-

minadas (grupo A), verificamos que em ambos os métodos em 3 das 78 amostras testadas (3,8%) se obteve um resultado positivo, e para as restantes um resultado negativo.

Se compararmos os resultados obtidos pelo método de PCR com os obtidos pelo método de referência ISO, para as amostras potencialmente naturalmente contaminadas (grupo A), verificamos que em 3 das 78 amostras (3,8%) se obtiveram resultados falsos positivos (tabela 1). Este facto pode estar relacionado com a potencial existência de células de *Salmonella* não viáveis, ou viáveis mas não cultiváveis (VBNC) nas amostras, que apesar de não se terem desenvolvido durante a etapa de enriquecimento, puderam ser detetadas por PCR. É importante salientar que, ao contrário das células de *Salmonella* não viáveis, as células de *Salmonella* VBNC podem manter a sua patogenicidade, sendo de referir que a recuperação destas células patogénicas se tornou um importante ramo de investigação devido às implicações que podem ter em saúde pública (11).

Quando analisados os resultados obtidos com os métodos imunoenzimático automatizado e ISO, para as amostras artificialmente contaminadas (grupos B e C), verificamos que,

Tabela 1: Resultados de deteção de *Salmonella* spp. – comparação entre os três métodos utilizados.

| Resultados da deteção de <i>Salmonella</i> spp. |              |   |              |                                  |              |
|---|--------------|---|--------------|----------------------------------|--------------|
| Grupo   | N.º amostras |   | ISO (%)      | Imunoenzimático automatizado (%) | PCR (%)      |
| A   | 78           | + | 3/78 (3,8)   | 3/78 (3,8)                       | 6/78 (7,7)   |
|   |              | - | 75/78 (96,2) | 75/78 (96,2)                     | 59/78 (75,6) |
|   |              | ? | 0/78 (0)     | 0/78 (0)                         | 13/78 (16,7) |
| B   | 21           | + | 21/21 (100)  | 21/21 (100)                      | 21/21 (100)  |
|   |              | - | 0/21 (0)     | 0/21 (0)                         | 0/21 (0)     |
|   |              | ? | 0/21 (0)     | 0/21 (0)                         | 0/21 (0)     |
| C   | 38           | + | 36/38 (94,7) | 36/38 (94,7)                     | 33/38 (86,8) |
|   |              | - | 2/38 (5,3)   | 2/38 (5,3)                       | 2/38 (5,3)   |
|   |              | ? | 0/38 (0)     | 0/38 (0)                         | 3/38 (7,9)   |

+ Resultados positivos; - Resultados negativos; ? Resultados inconclusivos. A – Potencialmente naturalmente contaminadas; B – Artificialmente contaminadas com níveis de *Salmonella* de 10<sup>7</sup> ufc/25 g de amostra; C – Artificialmente contaminadas com níveis de *Salmonella* <120 ufc/25 g de amostra



com exceção de duas amostras de canela, nas quais ocorreu inibição do crescimento microbiano (grupo C), todas as outras amostras artificialmente contaminadas testaram positivo para *Salmonella*, mesmo quando os níveis de contaminação foram inferiores a 5 ufc. Esta inibição do crescimento bacteriano por algumas especiarias, como a canela, é um fenómeno já conhecido e relatado por diversos autores (12,13).

Relativamente ao método de PCR, para além dos resultados falso positivos, verificamos que algumas das matrizes alimentares testadas (cravinho, orégãos, piri-piri, cacau magro, ovos, gema de ovo, camarão e canela) inibiram a PCR, conduzindo por isso a resultados inconclusivos (assinalados com um ? na tabela 1). Em algumas destas matrizes foi possível evitar esta inibição, através da diluição dos ácidos nucleicos extraídos (14). No entanto, neste estudo, não foi possível diminuir a inibição da reação de PCR para os ovos e os orégãos.

Tendo em conta que a gema e a clara de ovo diferem significativamente na sua composição, e que os ovos são o alimento mais comumente reportado como estando envolvido na transmissão de *Salmonella*, decidimos avaliar o efeito inibitório da clara e gema de ovo na amplificação por PCR, concluindo que no ovo a matriz gema, contém mais inibidores do que a matriz clara, resultados que estão de acordo com os descritos anteriormente por Xiaohua He e colaboradores (15).

Na última década, tanto a crescente preocupação por parte da indústria e consumidores com a segurança alimentar, como o impacto económico das doenças transmitidas por alimentos, têm impulsionado o desenvolvimento de novas metodologias para a deteção de agentes patogénicos em alimentos que sejam rápidas, sensíveis e fáceis de usar. No âmbito deste estudo, os métodos alternativos imunoenzimático automatizado e de PCR, foram testados em paralelo com o método padrão ISO 6579-1, como métodos alternativos de *screening* dos resultados negativos.

Comparando os tempos necessários para obter um resultado (positivo para *Salmonella* – Detetado; ou negativo para *Salmonella* – Não detetado) para os três métodos utilizados

neste estudo, podemos concluir que se a amostra a testar for negativa para *Salmonella*, o método de PCR em tempo real é o método mais rápido ( $\approx 24h$ ), seguido pelo método imunoenzimático automatizado ( $\approx 48h$ ) e pelo método ISO ( $\approx 72h$ ). No entanto, sendo o método padrão para a deteção de *Salmonella* o preconizado pela ISO, sempre que se obtém um resultado positivo por um dos métodos alternativos (imunoenzimático automatizado ou PCR em tempo real), a confirmação pelo método ISO é imperativa prolongando o tempo de resposta.

### **\_Conclusões**

Considerando a diversidade de métodos alternativos desenvolvidos nos últimos 20 anos para a deteção de *Salmonella* em alimentos, a escolha da metodologia a utilizar dependerá da situação específica e do objetivo da análise microbiológica.

No contexto deste estudo, consideramos que:

- O método de PCR em tempo real pode ser apropriado para situações em que as matrizes alimentares a testar são de uma só categoria alimentar, se sabe não interferirem com a reação de PCR (ou quando os métodos para a remoção de inibidores, ou para a redução dos seus efeitos são bem conhecidos) e se espera que a maioria das amostras sejam negativas para *Salmonella*.
- O método imunoenzimático automatizado, método validado pela AFNOR, pode ser adequado para testar uma grande diversidade de alimentos quando se espera que a maioria dos resultados seja negativa.
- O método padrão ISO utiliza-se como i) método de referência para todos os tipos de matrizes ii) para os alimentos das categorias incluídas no Regulamento CE N.º 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, sempre que não seja implementado um método validado equivalente, ou iii) como método de referência para confirmar resultados presuntivamente positivos obtidos por qualquer uma das outras metodologias alternativas eleitas.



### Referências bibliográficas:

- (1) Hussain MA, Dawson CO. Economic Impact of Food Safety Outbreaks on Food Businesses. *Foods*. 2013 Dec 12;2(4):585-89. <https://doi.org/10.3390/foods2040585>
- (2) European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 2021;19(12):6971. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6971>
- (3) Bell RL, Jarvis KG, Ottesen AR, et al. Recent and emerging innovations in Salmonella detection: a food and environmental perspective. *Microb Biotechnol*. 2016 May;9(3):279-92. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12359>
- (4) Valdivieso-García A, Desruisseau A, Riche E, et al. Evaluation of a 24-hour bioluminescent enzyme immunoassay for the rapid detection of Salmonella in chicken carcass rinses. *J Food Prot*. 2003 Nov;66(11):1996-2004. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-66.11.1996>
- (5) Schneid AD, Rodrigues KL, Chemello D, et al. Evaluation of an indirect ELISA for the detection of Salmonella in chicken meat. *Braz J Microbiol*. 2006 Sep;37(3):350-55. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000300027>
- (6) Magliulo M, Simoni P, Guardigli M, et al. A rapid multiplexed chemiluminescent immunoassay for the detection of Escherichia coli O157:H7, Yersinia enterocolitica, Salmonella typhimurium, and Listeria monocytogenes pathogen bacteria. *J Agric Food Chem*. 2007 Jun 27;55(13):4933-39. <https://doi.org/10.1021/jf063600b>
- (7) Paniel N, Noguier T. Detection of Salmonella in Food Matrices, from Conventional Methods to Recent Aptamer-Sensing Technologies. *Foods*. 2019 Sep 1;8(9):371. <https://doi.org/10.3390/foods8090371>
- (8) Heymans R, Vila A, van Heerwaarden CAM, et al. Rapid detection and differentiation of Salmonella species, Salmonella Typhimurium and Salmonella Enteritidis by multiplex quantitative PCR. *PLoS One*. 2018 Oct 25;13(10):e0206316. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206316>
- (9) Sahu B, Singh SD, Behera BK, et al. Rapid detection of Salmonella contamination in seafoods using multiplex PCR. *Braz J Microbiol*. 2019 Jul;50(3):807-16. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00072-8>
- (10) Crowley E, Bird P, Fisher K, et al. Evaluation of VIDAS Salmonella (SLM) easy Salmonella method for the detection of Salmonella in a variety of foods: collaborative study. *J AOAC Int*. 2011 Nov-Dec;94(6):1821-34. [https://doi.org/10.5740/jaoacint.cs2011\\_03](https://doi.org/10.5740/jaoacint.cs2011_03)
- (11) Dong K, Pan H, Yang D, et al. Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2020 Jan;19(1):149-83. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12513>
- (12) Hong YJ, Bae YM, Moon B, et al. Inhibitory effect of cinnamon powder on pathogen growth in laboratory media and oriental-style rice cakes (sulgidduk). *J Food Prot*. 2013 Jan;76(1):133-8. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-241>
- (13) Nabavi SF, Di Lorenzo A, Izadi M, et al. Antibacterial Effects of Cinnamon: From Farm to Food, Cosmetic and Pharmaceutical Industries. *Nutrients*. 2015 Sep 11;7(9):7729-48. <https://doi.org/10.3390/nu7095359>
- (14) Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, et al. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol*. 2012 Nov;113(5):1014-26. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
- (15) He X, Carter JM, Brandon DL, et al. Application of a real time polymerase chain reaction method to detect castor toxin contamination in fluid milk and eggs. *J Agric Food Chem*. 2007 Aug 22;55(17):6897-902. <https://doi.org/10.1021/jf0707738>

## \_Aplicação da metodologia Seis Sigma nos parâmetros colesterol total, colesterol LDL e triglicéridos

*Application of the Six Sigma methodology in the parameters total cholesterol, LDL cholesterol and triglycerides*

Ana Patrícia Alberto<sup>(1,3)</sup>, Ana Faria<sup>(1)</sup>, Armandina Miranda<sup>(1,2)</sup>, Helena Correia<sup>(1)</sup>, Vicente Constantino<sup>(2)</sup>, José Gomes Requeijo<sup>(3)</sup>

anapatricia.alberto@hotmail.com

(1) Unidade de Avaliação Externa da Qualidade. Departamento de Epidemiologia, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Unidade de Diagnóstico Laboratorial e Referência. Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis, Instituto Nacional de Saúde Doutor, Lisboa, Portugal

(3) Departamento de Engenharia Mecânica e Industrial. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, Portugal

### \_Resumo

O presente artigo pretende descrever um estudo de caso onde a metodologia Seis Sigma e o método DMAIC foram aplicados aos resultados dos parâmetros Colesterol Total, Colesterol LDL e Triglicéridos do Programa de Avaliação Externa da Qualidade de Química Clínica. O estudo teve como objetivo avaliar os resultados recorrendo à métrica Sigma e propor medidas efetivas na melhoria da qualidade dos resultados dos laboratórios participantes. Foram utilizadas diversas ferramentas para sustentar as decisões tomadas em cada fase do ciclo DMAIC. O estudo foi bem-sucedido na avaliação dos resultados, mas não foram atingidos os objetivos de melhoria, considerando-se uma das principais causas o facto do seu desenvolvimento em ambiente de pandemia.

### \_Abstract

This article intends to describe a case study where the Six Sigma methodology and the DMAIC method were applied to the results from the Total Cholesterol, LDL Cholesterol and Triglycerides parameters of the External Quality Assessment of the Clinical Chemistry Program developed by the Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade. The study aimed to evaluate the results using the Sigma metric and develop improvement measures to increase the quality of the results from the participating laboratories. Several tools were used to support the decisions made at each phase of the DMAIC cycle. The study was successful in evaluating the results; however, the improvement goals were not achieved, considering the pandemic environment during which the study was carried out as one of the main causes.

### \_Introdução

Foram selecionados os parâmetros Colesterol Total, Colesterol LDL e Triglicéridos para o desenvolvimento do presente estudo. A sua monitorização revela-se importante devido à sua frequente associação com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Foi avaliado o resultado do desempenho dos laboratórios participantes do programa de Química Clínica do Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade (PNAEQ).

No caso de estudo aplica-se a metodologia Seis Sigma aos resultados da Avaliação Externa da Qualidade (AEQ) para avaliar o nível de qualidade Sigma e implementar estratégias que permitam uma melhoria da qualidade dos resultados dos laboratórios participantes.

### \_Objetivo

Descrever um estudo de caso onde a metodologia Seis Sigma e o método DMAIC foram aplicados aos resultados dos parâmetros Colesterol Total, Colesterol LDL e Triglicéridos do Programa de Avaliação Externa da Qualidade de Química Clínica.

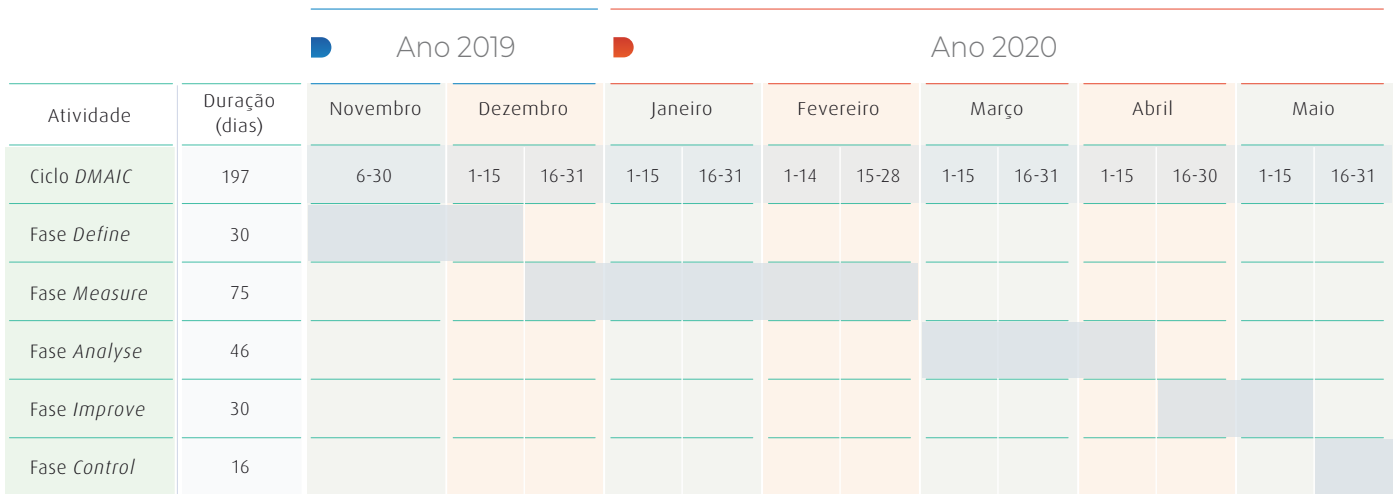
### \_Dados e métodos

O método DMAIC (*Define, Measure, Analyze, Improve, Control*) é composto por cinco fases e contempla diversas ferramentas da qualidade que fornecem uma abordagem estruturada ao projeto. A fase *Define* inicia o estudo e permite a definição das equipas, problemas e processo(s) envolvido(s). São avaliadas as necessidades dos clientes que, no caso do PNAEQ, são os laboratórios participantes dos programas.

Foi definido o cronograma presente na [figura 1](#).



Figura 1: Cronograma do projeto.



Na fase *Measure* são analisados os resultados e calculados os níveis Sigma que definem o nível de qualidade inicial. Foram estudados os resultados do período de 2018 a 2020. O *Bias* é calculado, para cada laboratório *i*, segundo a Equação.

$$Bias \% = \frac{|Valor\ do\ laboratório_i - Valor\ alvo\ da\ amostra|}{Valor\ alvo\ da\ amostra}$$

Considerou-se o valor alvo da amostra o valor de consenso, ou seja, a média dos resultados obtidos pelos laboratórios participantes para cada amostra em estudo. Uma análise de *outliers* permitiu eliminar valores fora do intervalo de  $\pm 3$  desvios padrão.

Utilizaram-se duas abordagens para o cálculo do nível de qualidade Sigma:

1) *Cálculo da Métrica Sigma*: Considera apenas a inexactidão. Os dados são divididos por amostra, método e equipamento para avaliar resultados significativamente diferentes. Estuda a Normalidade dos resultados através do Teste de Kolmogorov-Smirnov e, caso esta não seja verificada, aplica a Transformação de Box-Cox. São obtidos os defeitos por milhão de oportunidades (DPMO) e convertidos em nível de qualidade Sigma.

2) *Cálculo da Métrica Sigma na Área Laboratorial*: Considera a inexactidão (*Bias*) e imprecisão dos resultados (Coeficiente de Variação). É utilizado um modelo de regressão linear que permite estimar as duas componentes do erro: sistemático (inexactidão) e aleatório (imprecisão) (1). O nível de qualidade Sigma é calculado recorrendo ao Erro Total Admissível (ETa), presente na Equação (2).

$$Nível\ Sigma = \frac{ETa - Bias}{CV_I}$$

É calculado o nível de qualidade Sigma por laboratório. Esta abordagem não foi aplicada ao parâmetro Colesterol LDL pela escassez de dados para satisfazer os requisitos mínimos.

Ambas as abordagens consideram especificações com base na variabilidade biológica a um nível desejável considerando, para cada parâmetro, os valores da variação intraindividual ( $CV_i$ ) e variação interindividual ( $CV_g$ ) apresentados na base de dados da *European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (EFLM) (2).

Após o cálculo do nível de qualidade Sigma, prosseguiu-se para a fase *Analyse*, onde foram apresentadas e estudadas causas potenciais para uma qualidade inferior à desejada. Na fase *Improve* foram desenvolvidas e implementadas medidas de melhoria que visam o aumento dos níveis



de qualidade. Foi selecionado o plano de melhorias mais adequado e, após a sua implementação, foi realizado um teste-piloto. Na fase *Control*, o principal objetivo é assegurar as condições necessárias à manutenção das medidas implementadas. Foi apresentado um plano de monitorização e controlo.

### **\_Resultados e discussão**

Foi inicialmente definida a meta de obter um nível de 3,5 Sigma. Os resultados dos questionários revelaram que as necessidades dos laboratórios participantes são a diminuição da inexatidão e a harmonização dos resultados interlaboratoriais.

Após o cálculo do *Bias* e tratamento de *outliers*, foram calculados os níveis Sigma. Apresentam-se na [tabela 1](#) os resultados obtidos.

Apesar de ambas as abordagens utilizarem como referência o valor de consenso e especificações baseadas na variabilidade biológica, os resultados apresentam-se semelhantes para o parâmetro Colesterol Total, mas diferentes para o parâmetro Triglicéridos. A diferença pode ser explicada por a primeira abordagem só considerar uma dimensão do erro (*Bias*), enquanto a segunda considera o erro total (ETA). Salienta-se a importância da identificação do método aquando da divulgação do nível de qualidade Sigma.

Ajustou-se o objetivo do projeto para a obtenção de um nível de qualidade Sigma de 4 para o parâmetro Triglicéridos e de 3 para os restantes parâmetros em estudo, considerando os valores da primeira abordagem.

Na fase *Analyze* estudaram-se as possíveis causas para uma qualidade inferior à desejada, prosseguindo à sua hierarquização através do Diagrama de Pareto presente no [gráfico 1](#), recorrendo ao conhecimento de seis técnicos de laboratório. Foram consideradas como causas mais importantes a formação/experiência inadequada (causa 28) e a transcrição incorreta dos resultados (causa 33).

Na fase *Improve*, o Método AHP selecionou como mais adequado a adoção das seguintes medidas:

- Divulgação periódica de melhorias e medidas preventivas;
- Sensibilização para a correta execução do procedimento analítico;
- Realização de ações de formação em qualidade laboratorial.

Foi realizado um teste-piloto composto por um ensaio com duas amostras que apresentou os resultados expostos na [tabela 2](#), calculados recorrendo ao procedimento descrito para a 1.<sup>a</sup> abordagem. Foi feita a comparação com os resultados calculados anteriormente pela 1.<sup>a</sup> abordagem.

Não foi possível calcular os resultados do teste-piloto recorrendo à 2.<sup>a</sup> abordagem devido aos requisitos mínimos de dados desta abordagem.

Com exceção do parâmetro Colesterol Total, os resultados apresentam-se inferiores. O contexto de pandemia pode ter influência nos resultados apresentados pelos laboratórios participantes que não são ainda possíveis de avaliar, podendo ter contribuído para não se atingirem os resultados propostos.

Foi apresentado um plano de monitorização e controlo incluindo medidas para incentivar a continuação de implementação de medidas de melhoria.



Tabela 1: Níveis de qualidade Sigma nos parâmetros Colesterol Total, Colesterol LDL e Triglicéridos do Programa de Avaliação Externa da Qualidade.

|                  | 1.ª Abordagem |      |      | 2.ª Abordagem |      |      |
|------------------|---------------|------|------|---------------|------|------|
|                  | 2018          | 2019 | 2020 | 2018          | 2019 | 2020 |
| Colesterol Total | 2,23          | 2,07 | 2,01 | 2,96          | 2,28 | 2,38 |
| Colesterol LDL   | 1,46          | 1,64 | 2,63 | -             | -    | -    |
| Triglicéridos    | 3,14          | 3,31 | 3,51 | 8,87          | 8,85 | 7,67 |

Gráfico 1: Diagrama de Pareto das causas potenciais do nível inferior de qualidade dos resultados.

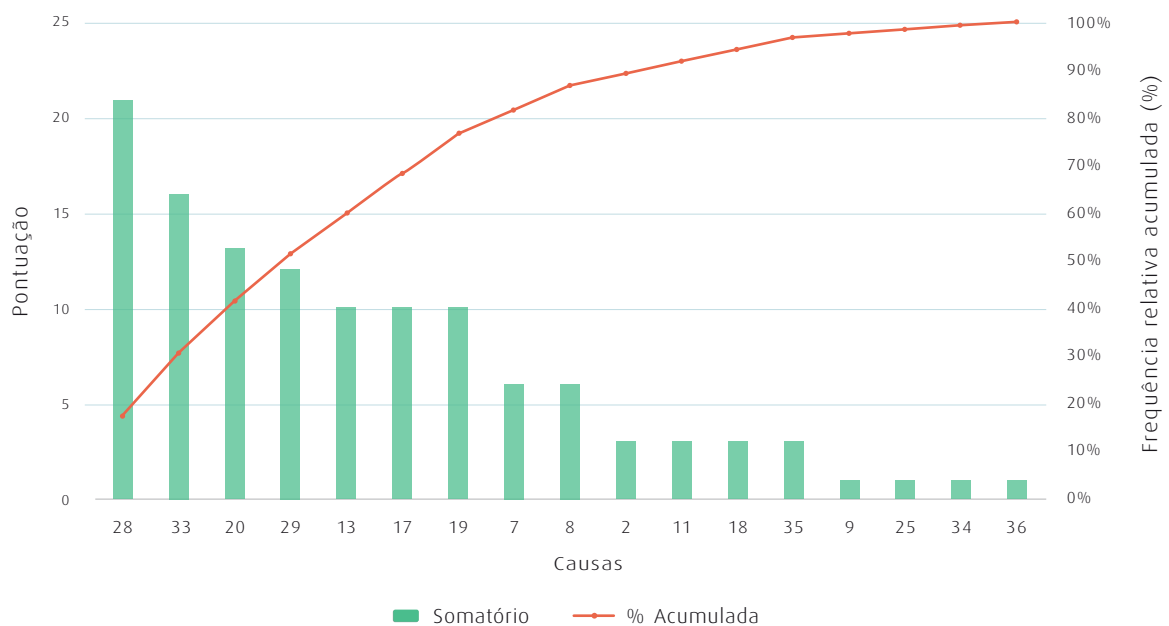


Tabela 2: Nível de qualidade dos resultados – comparação dos resultados do teste-piloto.

|                  | Níveis Sigma – 2020 | Níveis Sigma – 2021 |
|------------------|---------------------|---------------------|
| Colesterol Total | 2,01                | 2,35                |
| Colesterol LDL   | 2,63                | 1,73                |
| Triglicéridos    | 3,51                | 2,99                |



## **\_Conclusões**

Os dados dos parâmetros Colesterol Total, Colesterol LDL e Triglicéridos do Programa de Avaliação Externa da Qualidade (AEQ) de Química Clínica do período de 2018 a 2020 foram analisados e foram estudadas possíveis causas e implementadas ações de melhoria que contribuem para o aumento do nível de qualidade dos resultados dos laboratórios participantes. Apesar do teste-piloto não ter revelado uma melhoria dos resultados consistente, provavelmente devido ao contexto pandémico em que foi realizado, é sugerido um estudo que avalie a qualidade dos resultados nos períodos pré, durante e pós pandemia.

O estudo e o desenvolvimento de ações de melhoria dos resultados laboratoriais apresentam benefícios não só para os laboratórios que participam nos programas de AEQ, como para os doentes que passam a beneficiar de resultados mais fiáveis que contribuem de forma positiva para o diagnóstico/tratamento de patologias.

## **Referências bibliográficas:**

- (1) Meijer P, de Maat MP, Kluit C, et al. Long-term analytical performance of hemostasis field methods as assessed by evaluation of the results of an external quality assessment program for antithrombin. *Clin Chem*. 2002 Jul;48(7):1011-15. <https://doi.org/10.1093/clinchem/48.7.1011>
- (2) European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Biological Variation Database [online]. [consult. 15/02/2021]. [https://biologicalvariation.eu/meta\\_calculations](https://biologicalvariation.eu/meta_calculations)

## **Estudo para a determinação dos valores de referência das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e gama- glutamil transferase (GGT), no soro**

*Study for the determination of the reference values of the enzymes aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and gama- glutamyl transferase (GGT), in serum*

Marta Alvim, Ana Catarina Alves, Margarida Vaz, Suza Almeida, José Vicente Constantino, Mafalda Bourbon

marta.alvim@insa.min-saude.pt

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

### **\_Resumo**

É recomendável que cada laboratório se baseie em protocolos e procedimentos operacionais comuns com a finalidade de obter valores de referência “comuns” e “harmonizados” a nível nacional. O objetivo deste trabalho foi determinar os valores de referência das enzimas AST, ALT e GGT. A metodologia teve como base o documento CSLI / IFCC, C28-A3. A amostra inicial foi de 1688 indivíduos de Portugal continental, dos quais 1122 foram excluídos após a análise dos questionários (com patologias e/ou fumadores) de modo a obtermos uma população considerada “saudável”. Após a quantificação das enzimas por um método enzimático, verificou-se que não houve relevância nos resultados para diferentes grupos etários, embora tenha sido observada diferença estatística significativa quanto ao género ( $p < 0,001$ ). Desta forma, foram calculados os valores de referência para o género feminino e masculino respetivamente da ALT = 7-38U/L e 10-70U/L, da AST = 11-30U/L e 13-53U/L e da GGT = 5-36U/L e 7-80U/L, através do programa IBM SPSS Statistics versão 25. Os valores de referência, no caso do género feminino, foram muito semelhantes aos descritos nos folhetos informativos, enquanto no género masculino verificaram-se valores superiores.

### **\_Abstract**

*It is recommended that each laboratory base itself on common protocols and operating procedures in order to achieve “standard” reference values at national level. The aim of this work is to determine the reference values of the enzymes AST, ALT and GGT. The methodology used was based on the document CSLI / IFCC, C28-A3. From the initial sample of 1688 individuals from mainland Portugal, 1122 were excluded due to the analysis of the questionnaires, (with pathologies and/or smokers) to obtain a population considered healthy We studied 566 serum samples and quantification of enzymes by an enzymatic method in Cobas INTEGRA 400 Plus, showed no significance differences in the results for several age groups, although a statistically significant difference was observed regarding gender ( $p < 0,001$ ). Therefore, the reference values for females and males respectively were calculated for ALT = 7-38U/L and 10-70U/L, for AST = 11-30U/L and 13-53U/L and for GGT = 5- 36U/L and 7-80U/L, through the IBM SPSS Statistics version 25 program. The reference values, for females, were very similar to those described by other publications, while for males, higher values were found.*

### **\_Introdução**

Os valores de referência fornecidos nos relatórios dos laboratórios têm um papel muito importante para auxiliar o clínico a interpretar os resultados dos testes em relação às populações saudáveis. A Federação Internacional de Química Clínica (IFCC, na sigla em inglês) recomendou que cada laboratório definisse os seus próprios valores de referência <sup>(1)</sup>. A diretriz C28-A3 publicada pelo Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI, na sigla em inglês) é fonte de referência nesta área, para que hajam valores de referência “comuns” e “harmonizados” a nível nacional <sup>(2,3)</sup>.

Neste sentido, importa determinar os valores de referência das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e gama- glutamil transferase (GGT). As transaminases são enzimas próprias do fígado, embora não sejam exclusivas deste órgão e têm como função transferir o grupo amina de um aminoácido para um cetoácido (origem do nome). Tanto a AST sérica como a ALT apresentam valores elevados quando os processos patológicos afetam a integridade celular hepática, sendo a ALT uma enzima mais específica do fígado. Além disso, o aumento da atividade da ALT persiste durante mais tempo do que o aumento da atividade da AST. A GGT é utilizada no diagnóstico e monitorização das doenças hepatobiliares, sendo também um teste de despistagem para o alcoolismo oculto. Os valores de referência são calculados através de análise estatística da distribuição dos valores obtidos de uma população considerada saudável, em que os limites são calculados e definem os valores de referência.



## \_Objetivo

O objetivo deste trabalho é determinar os valores de referência das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e gama- glutamil transferase (GGT), numa amostra da população portuguesa, bem como descrever o procedimento para o cálculo dos mesmos.

## \_Métodos

Com base no documento CSLI / IFCC, C28-A3 (2) e após a avaliação dos questionários foram aplicados os critérios de exclusão e particionamento de forma a que os valores de referência sejam determinados com base em uma população "saudável". A amostra foi selecionada do Estudo de prevalência de fatores de risco cardiovascular na população portuguesa (e\_COR), onde participaram 1688 indivíduos, distribuídos pelas cinco regiões de Portugal continental (318 do Algarve, 349 de Lisboa, 340 do Norte, 338 do Centro e 343 do Alentejo). Foram excluídos 826 participantes por apresentarem patologias, bem como 296 participantes por serem fumadores.

A fase pré-analítica é conhecida por ter os maiores erros no processo e envolve fatores biológicos e metodológicos (4,5), foram considerados e respeitadas com rigor todos esses fatores, tendo sido feitas as colheitas aos indivíduos após um jejum de 12h, sendo as condições de transporte e armazenamento feitas segundo as indicações do fabricante (6). A fase analítica inclui o método, o equipamento, os reagentes entre outros fatores. Foi utilizado para a quantificação das três enzimas o mesmo equipamento, Cobas INTEGRA 400 Plus-da Roche. O método para a determinação da atividade catalítica das enzimas ALT e AST está de acordo com a IFCC, mas sem piridoxal-5-fosfato e para o doseamento da GGT foi utilizado um método padronizado contra Szasz. O cálculo dos valores de referência inclui métodos de cálculo não paramétricos de acordo com a distribuição dos dados, deteção de *outliers* pelo método de Dixon (7,8), particionamento e intervalos de confiança. Os limites de referência inferiores foram calculados com o 2,5 percentil e os limites superiores com o 97,5 percentil da distribuição dos valores obtidos da população "saudável" (3).

## \_Resultados

Foram excluídos 826 participantes devido à presença de doenças e com resultados laboratoriais indicativos de diabetes (glucose > 126 mg/dl e /ou valor de hemoglobina glicada (HbA1c) > 6,5%) e hipercolesteremia (colesterol total > 240 mg/dl e/ou valor de colesterol-LDL > 160 mg/dl).

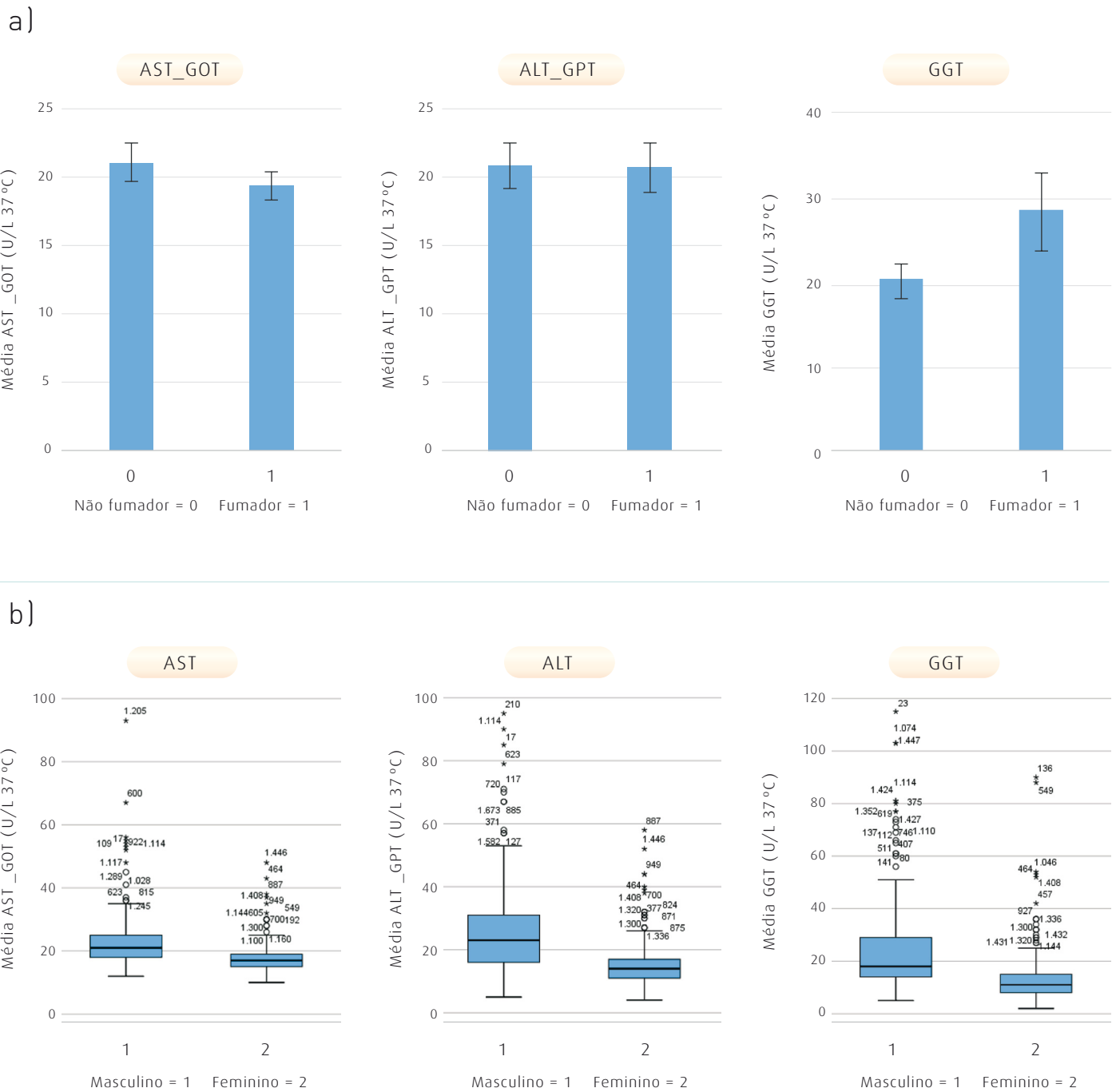
Dos restantes 862 participantes, 566 não eram fumadores e 296 eram fumadores, foi aplicado o teste de normalidade *Kolmogorov- Smimov* para cada um dos parâmetros, obtendo-se uma distribuição "não normal", e como tal aplicou-se o teste de *Mann-Whitney*, para verificar se os fumadores da população de referência deviam ser excluídos. Para a enzima GGT o grupo de não fumadores e fumadores foram estatisticamente diferentes ( $p=0,04$ ), levando à exclusão do grupo dos fumadores (gráfico 1).

As análises subsequentes foram realizadas com amostras de 566 participantes, a fim de avaliar a necessidade de particionamento da amostra quanto às faixas etárias foram definidos inicialmente 3 grupos etários (18 a 34 anos, 35 a 64 anos e 65 a 79 anos). Após uma avaliação estatística verificou-se não apresentar relevância, desta forma a amostra foi avaliada dos 18 aos 79 anos.

Posteriormente procedeu-se a avaliação quanto ao género e neste caso a análise estatística (*Mann-Whitney*), demonstrou uma diferença significativa nos resultados das atividades enzimáticas avaliadas no soro, consoante o género ( $p<0,001$ ) (gráfico 1).



Gráfico 1: ↓ Resultados médios da atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e gama- glutamil transferase (GGT), comparativos entre os grupos dos fumadores e não fumadores (a) e em relação ao género (b).





Os valores de referência foram calculados através do programa SPSS *Statistics* versão 25. por um método não-paramétrico com base na frequência dos resultados para cada

parâmetro, em que o limite inferior corresponde ao percentil 2,5 e o limite superior corresponde ao percentil 97,5 com um intervalo de confiança 95 % (5,9) (tabela 1).

Tabela 1: Valores de referência para as enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e gama- glutamil transferase (GGT), consoante o género.

| Parâmetros (U/L 37°C) | Feminino |       |       | Masculino |       |       |
|-----------------------|----------|-------|-------|-----------|-------|-------|
|                       | ALT      | AST   | GGT   | ALT       | AST   | GGT   |
| N.º resultados        | 318      | 317   | 319   | 241       | 241   | 238   |
| Médias                | 15,19    | 17,68 | 13,18 | 26,65     | 23,27 | 25,05 |
| Percentis             | 2,5      | 7,00  | 11,00 | 5,00      | 10,00 | 7,00  |
|                       | 5        | 8,00  | 12,00 | 6,00      | 11,00 | 9,00  |
|                       | 25       | 11,00 | 15,00 | 8,00      | 16,50 | 13,75 |
|                       | 50       | 14,00 | 17,00 | 11,00     | 23,00 | 18,50 |
|                       | 75       | 17,00 | 19,00 | 15,00     | 31,50 | 29,00 |
|                       | 95       | 27,00 | 25,00 | 29,00     | 55,90 | 69,10 |
|                       | 97,5     | 38,02 | 30,10 | 36,00     | 69,85 | 80,03 |

## \_Discussão e conclusão

Idealmente cada laboratório deveria definir os seus próprios valores de referência, porém se isso não for possível, devido à dificuldade de selecionar uma população de referência considerada “saúdavel” e o custo inerente, deveria validar os valores de referência a utilizar, analisando no mínimo 20 amostras (5,10). Com especial atenção aos critérios de exclusão e particionamento, fatores pré-analíticos e métodos analíticos, deve-se ser capaz de agrupar dados de vários locais, reduzindo assim enormemente o número de amostras que cada laboratório precisa selecionar e proceder ao doseamento e análise. Essa é a ideia por trás dos testes multicêntricos para estabelecer intervalos de referência (5).

Neste trabalho houve particionamento da amostra quanto ao género, mas não houve necessidade de dividir a amostra em relação as diferentes faixas etárias, uma vez que não

foram relevantes as diferenças de atividade enzimática em adultos, embora seja nos indivíduos com idades inferiores aos 18 anos.

Os valores de referência, no caso do género feminino, foram muito semelhantes aos descritos nos folhetos informativos da casa comercial sugeridos para estas metodologias, enquanto no género masculino verificaram-se valores superiores aos descritos nos folhetos informativos.

Como tal os valores de referência calculados para o género masculino devem ser alvo de novos estudos de forma a se verificar se houve influência de outros fatores, como o consumo de bebidas alcoólicas que podem não ter sido devidamente identificados na seleção da população de referência considerada “saúdavel”. Foram descritos outros estudos (9,11,12) que apresentavam, também, valores superiores para algumas destas enzimas, facto que corrobora com a ideia da necessidade de iniciar mais estudos de forma a harmonizar os valores de referência.



Muitos, se não a maioria, dos métodos que usamos nos laboratórios clínicos são mais do que adequados do ponto de vista analítico. Em contraste, os intervalos de referência que acompanham os resultados dos testes em relatórios laboratoriais merecem um maior escrutínio.

Este trabalho realça a importância dos valores de referência serem confiáveis e precisos para ajudar o clínico a interpretar os resultados dos testes para populações saudáveis.

Para estudos futuros do cálculo de valores de referência, o efeito genético parece ser a área mais desafiadora bem como os estudos de valores de referência para faixas etárias pediátricas e geriátricas, limites de decisão clínica e particionamento por efeitos genéticos (3).

- (11) Ceriotti F, Henny J, Queraltó J, et al.; IFCC Committee on Reference Intervals and Decision Limits (C-RIDL), Committee on Reference Systems for Enzymes (C-RSE). Common reference intervals for aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and  $\gamma$ -glutamyl transferase (GGT) in serum: results from an IFCC multicenter study. *Clin Chem Lab Med*. 2010 Nov;48(11):1593-601. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2010.315>
- (12) Estey MP, Cohen AH, Colantonio DA, et al. CLSI-based transference of the CALIPER database of pediatric reference intervals from Abbott to Beckman, Ortho, Roche and Siemens Clinical Chemistry Assays: direct validation using reference samples from the CALIPER cohort. *Clin Biochem*. 2013 Sep;46(13-14):1197-219. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.04.001>

#### Referências bibliográficas:

- (1) Ozarda Y, Ichihara K, Barth JH, et al.; Committee on Reference Intervals and Decision Limits (C-RIDL), International Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Protocol and standard operating procedures for common use in a worldwide multicenter study on reference values. *Clin Chem Lab Med*. 2013 May;51(5):1027-40. <https://doi.org/10.1515/cclm-2013-0249>
- (2) Clinical and Laboratory Standards Institute. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory, 3rd Edition. Malvern, PA: CLSI, 2010. [https://clsi.org/media/1421/ep28a3c\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/1421/ep28a3c_sample.pdf)
- (3) Ozarda Y. Reference intervals: current status, recent developments and future considerations. *Biochem Med (Zagreb)*. 2016;26(1):5-16. <https://doi.org/10.11613/BM.2016.001>
- (4) Plebani M, Sciacovelli L, Aita A, et al. Harmonization of pre-analytical quality indicators. *Biochem Med (Zagreb)*. 2014 Feb 15;24(1):105-13. <https://doi.org/10.11613/BM.2014.012>
- (5) Horowitz GL. Reference Intervals: Practical Aspects. *EJIFCC*. 2008 Oct 16;19(2):95-105. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4975204/>
- (6) Roche Diagnostics. Informações técnicas – Teste para determinação de Aspartato Aminotransferase (ASTL- versão 9.0), Alanine Aminotransferase (ALT- versão 8.0) e Gama – glutamyltransferase (GGT- versão 13.0).
- (7) Fuentes Arderiu X. Intervalos de referência biológicos 1 [online] [consult. 24-01-2022] <https://www.ifcc.org/media/215857/Intervalos%20de%20referencia%20biol%20B3gicos%20DIV.pdf>
- (8) Solberg HE. The IFCC recommendation on estimation of reference intervals. The RefVal program. *Clin Chem Lab Med*. 2004;42(7):710-14. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2004.121>
- (9) Horn PS, Pesce AJ. Reference intervals: an update. *Clin Chim Acta*. 2003 Aug;334(1-2):5-23. [https://doi.org/10.1016/s0009-8981\(03\)00133-5](https://doi.org/10.1016/s0009-8981(03)00133-5)
- (10) Crowley E, Bird P, Fisher K, et al. Evaluation of VIDAS Salmonella (SLM) easy Salmonella method for the detection of Salmonella in a variety of foods: collaborative study. *J AOAC Int*. 2011 Nov-Dec;94(6):1821-34. [https://doi.org/10.5740/jaoacint.cs2011\\_03](https://doi.org/10.5740/jaoacint.cs2011_03)

## **Perturbação do espectro do autismo: identificação de variantes em genes envolvidos no mecanismo regulador da expressão génica *nonsense-mediated mRNA decay***

*Autism spectrum disorder: identification of gene variants involved in the nonsense-mediated mRNA decay*

Ana Rita Marques<sup>1,2</sup>, João Xavier Santos<sup>1,2</sup>, Hugo Martiniano<sup>1,2</sup>, Joana Vilela<sup>1,2</sup>, Célia Rasga<sup>1,2</sup>, Luísa Romão<sup>1,3</sup>, Astrid Moura Vicente<sup>1,2</sup>

astrid.vicente@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) Instituto de Biosistemas e Ciências Integrativas. Faculdade de Ciência, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

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

### **\_Resumo**

A Perturbação do Espectro do Autismo (PEA) é uma patologia do neurodesenvolvimento caracterizada por dificuldades de socialização e/ou comunicação e por comportamentos estereotipados e repetitivos. Estudos de heritabilidade indicam que fatores genéticos contribuem para 50-80% do risco de desenvolver PEA, mas os mecanismos genéticos não são bem conhecidos. Neste estudo, exploramos a contribuição para o risco de PEA de genes que codificam proteínas envolvidas num mecanismo regulador da expressão génica, o *Nonsense-Mediated mRNA Decay* (NMD). Para este fim, compilámos uma lista de 46 genes envolvidos no NMD e investigámos a presença de *Single Nucleotide Variants* (SNVs) e *Copy Number Variants* (CNV) nestes genes em duas amostras populacionais de indivíduos diagnosticados com PEA (n=1828 e n=3570, respetivamente). Identificámos variantes raras (MAF<1% em controlos) com efeito deletério de acordo com uma predição *in silico*, e verificámos se afetam domínios proteicos necessários para o NMD. Identificámos 270 SNVs em 524 pacientes com PEA e 38 CNVs em 38 pacientes com PEA. Destas, 136 variantes (122 SNVs e 11 CNVs) estão localizadas em regiões dos genes que codificam domínios proteicos importantes para o funcionamento do mecanismo de NMD. Deste modo, colocamos a hipótese de que estas variantes possam afetar a função normal do NMD e, consequentemente, contribuir para alterações na expressão dos genes-alvo, podendo assim constituir um fator de risco para a PEA.

### **\_Abstract**

*Autism Spectrum Disorder (ASD) is a neurodevelopmental condition characterized by impaired social/communication skills and stereotyped/repetitive behaviors. Genetic factors account for 50-80% of the familial risk of ASD, but genetic determinants are not fully understood. In this study, we explored the contribution to ASD etiology of genes involved in an important post-transcriptional regulatory mechanism, the Nonsense-Mediated mRNA Decay (NMD). We first compiled a group of 46 genes encoding NMD factors and regulators. In these genes, we searched for Single Nucleotide Variants (SNVs) and Copy Number Variants (CNVs) in two samples of ASD patients (n=1828 and n=3570, respectively). In genes with rare variants (MAF<1% in controls) predicted *in silico* to be deleterious, we further investigated whether these variants affect protein domains required for NMD. We identified 270 SNVs in 524 ASD patients and 38 CNVs in 38 ASD patients. We found 136 variants (122 SNVs and 11 CNVs)*

*located within protein domains that may affect proper NMD function and consequently contribute to changes in the expression of NMD targets. This study suggests that genetic variants that cause NMD impairment may constitute a risk factor to ASD pathophysiology.*

### **\_Introdução**

A Perturbação do Espectro do Autismo (PEA) é uma patologia do neurodesenvolvimento caracterizada por dificuldades de comunicação e socialização associadas à presença de comportamentos repetitivos e estereotipados (1) e manifestações clínicas heterogéneas. A etiologia da PEA ainda não está bem esclarecida, o que impossibilita o desenvolvimento de terapias eficazes. Muitos estudos têm sido desenvolvidos para determinar as causas da PEA, conduzindo à descoberta de fatores genéticos, epigenéticos e ambientais associados à suscetibilidade para a perturbação. Sendo a origem da PEA tão heterogénea, coloca-se a hipótese de que mecanismos reguladores da expressão génica possam contribuir para o desenvolvimento da patologia quando afetados.

Existem vários mecanismos de controlo de qualidade da expressão génica, entre os quais, o decaimento do mRNA mediado por mutações nonsense (*Nonsense-Mediated mRNA Decay*, NMD). O mecanismo de NMD permite degradar transcritos que contenham codões de terminação de tradução prematura (*premature translation termination codon*, PTC), reduzindo a sua abundância, mas também é responsável pela regulação da expressão de ~10% de transcritos fisiológicos (2). A função do NMD é essencial durante o



neurodesenvolvimento (3-6) e depende de várias proteínas. Alguns genes que codificam fatores do NMD foram anteriormente implicados na PEA. Por exemplo, foram identificadas mutações no gene *UPF3B* em indivíduos que exibem características do autismo (6,7) e foi demonstrado que mutações *missense* neste gene alteram a diferenciação das células progenitoras neuronais devido a uma disfunção do processo de NMD (5,6). Adicionalmente, um estudo recente mostrou que a perda da proteína FMRP, codificada pelo gene *FMR1*, que representa uma das principais causas de deficiência intelectual e autismo, resulta numa hiperativação do mecanismo de NMD (8). Assim, testámos a hipótese de que alterações em genes que codificam para proteínas envolvidas no NMD podem contribuir para a PEA através da análise de variantes em genes envolvidos no mecanismo NMD, numa amostra populacional de grande dimensão com PEA.

## \_Objetivos

Este estudo teve como objetivo a identificação de variantes em genes que codificam proteínas envolvidas no mecanismo de NMD em indivíduos diagnosticados com perturbação do espectro do autismo (PEA) e a análise do seu contributo para o risco de PEA.

## \_Material e métodos

Os genes que codificam fatores e reguladores do NMD (do-ravante denominados genes NMD), foram selecionados através de uma pesquisa na literatura e em bases de dados, incluindo a Gene Ontology AmiGO (<http://amigo.geneontology.org>) (9) e a Reactome ([www.reactome.org](http://www.reactome.org)) (10).

Foram analisadas três *datasets* de indivíduos com PEA: *Autism Sequencing Consortium* (ASC, n=1828) (11), *Autism Genome Project* (AGP, n=2446) (12) e *Simons Simplex Collection* (SSC, n=1024) (13) para identificar Variantes Nucleotídicas Pontuais (*Single Nucleotide Variants*, SNVs) e Variantes de Número de Cópias (*Copy Number Variants*, CNVs) nos genes NMD. A sequenciação do exoma completo permite identificar SNVs nas regiões codificantes do genoma (exões), enquanto os CNVs nestes *datasets* foram detetados através da tecnologia de arrays. Estimámos ainda a fre-

quência destas variantes em populações controlo sem historial de doença neurológica, nomeadamente 60146 controlos da GnomAD v2.1.1 (<https://gnomad.broadinstitute.org/>, para SNVs) e 10355 controlos da Database of Genomic Variants (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>, para CNVs). Para identificar as variantes potencialmente deletérias, seleccionámos apenas variantes raras em controlos (MAF<1%), nomeadamente os CNVs que continham regiões codificantes dos genes em análise, assim como os SNVs classificados como deletérios *in silico* pelos programas Polyphen (14) e SIFT (15) (*missense predicted damaging and deleterious*, MISPD) ou como perda de função (*loss-of-function*, LoF). Adicionalmente, pesquisamos na literatura quais os domínios proteicos comprovadamente necessários para o correto funcionamento do NMD e identificamos as variantes deletérias localizadas nestas regiões.

## \_Resultados e discussão

Da literatura e bases de dados foram identificados 46 genes que codificam proteínas envolvidas no processo de NMD (tabela 1). Estes genes foram divididos em grupos de acordo com sua função no NMD: EJC – fatores e reguladores do complexo de junção exão-exão (*Exon Junction Complex*, EJC); SURF-DECID – componentes do complexo SMG1-UPF1-eRF1-eRF3 (SURF) e indutores de decaimento (DECID); mRNA decay – fase de decaimento do mRNA; ER-NMD – resposta NMD no Retículo Endoplasmático (RE); Regulatório – envolvido na regulação do NMD (tabela 1). Destes 46 genes, 7 são genes candidatos para PEA descritos na base de dados SFARI (<https://gene.sfari.org/>). Verificámos ainda na *Human Protein Atlas* ([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)) (16) que todos os 46 genes são expressos no cérebro humano.

A presença de SNVs nestes genes foi analisada nos exomas do *dataset* ASC (N=1828) e de CNVs nos *datasets* AGP (n=2446) e SSC (n=1024). Identificámos 270 SNVs potencialmente deletérios (por predição *in silico*) em 38 genes NMD em 28,7% (524/1828) dos pacientes com PEA, dos quais 11,5% (31/270) são classificados como LoF e 88,5% (239/270) como MISPD (figura 1).



**Tabela 1:** ↓ Lista de genes humanos que codificam fatores e reguladores do mecanismo de *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD).

| Grupo       | Símbolo do gene |               |                |
|-------------|-----------------|---------------|----------------|
| EJC         | <i>EIF4A3</i>   | <i>MAGOHB</i> | <i>PYM1</i>    |
|             | <i>RBM8A</i>    | <i>CASC3</i>  | <i>RNPS1</i>   |
|             | <i>MAGOH</i>    | <i>ICE1</i>   |                |
| SURF-DECID  | <i>UPF1</i>     | <i>GSPT1</i>  | <i>RUVBL2</i>  |
|             | <i>UPF2</i>     | <i>NCBP1</i>  | <i>SMG1</i>    |
|             | <i>UPF3B</i>    | <i>NCBP2</i>  | <i>SMG8</i>    |
|             | <i>EIF4E</i>    | <i>DHX34</i>  | <i>SMG9</i>    |
|             | <i>ETF1</i>     | <i>RUVBL1</i> |                |
| mRNA decay  | <i>SMG5</i>     | <i>PNRC2</i>  | <i>PARN</i>    |
|             | <i>SMG7</i>     | <i>DCP2</i>   | <i>MOV10</i>   |
|             | <i>SMG6</i>     | <i>XRN1</i>   | <i>PPP2CA</i>  |
|             | <i>CNOT8</i>    | <i>DIS3L</i>  | <i>PPP2R1A</i> |
|             | <i>DCP1A</i>    | <i>DIS3L2</i> | <i>EXOSC10</i> |
| ER-NMD      |                 | <i>NBAS</i>   |                |
| Regulatório | <i>PABPC1</i>   | <i>FMR1</i>   | <i>SEC13</i>   |
|             | <i>EIF4G1</i>   | <i>EIF3E</i>  | <i>GNL2</i>    |
|             | <i>UPF3A</i>    | <i>SRSF1</i>  |                |

A cinza estão marcados os genes candidatos do autismo de acordo com a base de dados SFARI (<https://gene.sfari.org/>).

O *NBAS*, um fator importante para a resposta do NMD no retículo endoplasmático (17), foi o gene com mais SNVs identificados: 25 em 5.4% (98/1828) da população ASC (tabela 2). Adicionalmente, os genes com SNVs presentes em mais de 1% dos indivíduos PEA foram: *DIS3L2* (4%), *DIS3L* (3%), *SMG7* (2%), *CASC3* (1,9%), *DCP1A* (1,7%), *ICE1* (1,6%), *DHX34* (1,5%) e *SMG6* (1,3%) (figura 1). Três destes genes codificam as proteínas *CASC3*, *ICE1* e *DHX34*, que promovem a ativação do NMD, enquanto os outros genes codificam proteínas envolvidas na degradação do mRNA. Analisámos os domínios proteicos afetados pelos SNVs identificados neste estudo, e verificamos que grande parte das variantes se localizam nos domínios proteicos necessários para o NMD. Por exemplo, os SNVs identificados nos genes

que codificam os fatores *up-frameshift* (*UPF1*, *UPF2* e *UPF3*) e supressor *with morphogenesis in genitalia* (*SMG1*, *SMG5*, *SMG6*, *SMG7*, *SMG8* e *SMG9*) localizam-se maioritariamente em regiões que codificam domínios essenciais para a função do NMD. Adicionalmente, encontramos variantes numa região do *UPF3B*, onde já foram descritas mutações que interferem com a função do NMD (6).

A análise conjunta dos *datasets* AGP e SSC, levou à descoberta de 38 CNVs contendo a totalidade ou parte de 18 dos 46 genes NMD, em 1% (38/3570) dos indivíduos com PEA. Destes CNVs, 8 são deleções e 30 são duplicações. Verificámos que os CNVs que incluem genes inteiros ou domínios funcionais importantes para o NMD são raros nos indivíduos com PEA (0,4%), mas extremamente raros em indivíduos controlo (<0,1%).

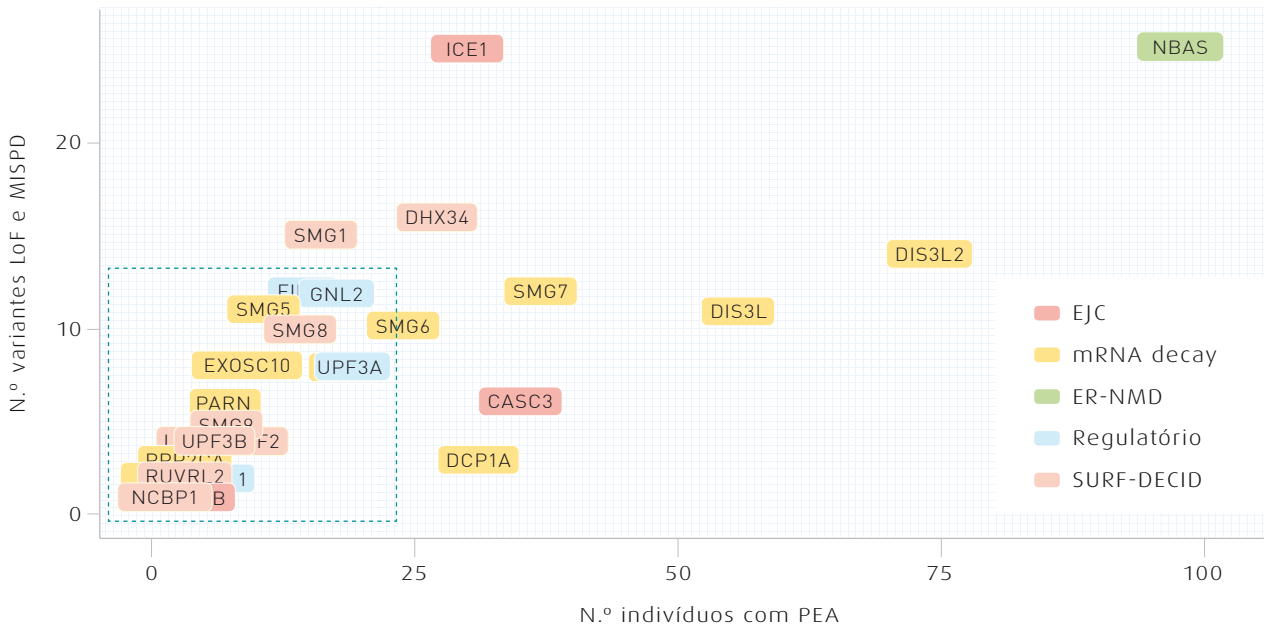
No total, foram identificadas 136 variantes (122 SNVs e 11 CNVs) em 23 genes, localizadas em regiões que codificam domínios proteicos importantes para a sua função no NMD (tabela 2), em 258 indivíduos com PEA. A *classificação in silico* dos SNVs como tendo um efeito deletério, sugere que possam afetar o mecanismo de NMD e contribuir para alterações na expressão dos genes-alvo. É notável que existam pelo menos 1277 genes-alvo de NMD expressos em células neuronais (8). Será agora fundamental a validação funcional destas variantes, através de estudos funcionais em linhas celulares ou da análise de expressão dos seus genes-alvo.

O NMD desempenha um papel importante na diferenciação neuronal (6) e a magnitude da sua resposta pode influenciar a diferenciação celular numa fase inicial do desenvolvimento (3). Muitas das variantes genéticas reportadas em indivíduos diagnosticados com PEA são mutações LoF, que levam à inserção de um PTC. O NMD é essencial na proteção contra estes erros genéticos, sendo, portanto, plausível que a disfunção deste mecanismo afete a expressão destes genes, influenciando o risco de PEA. No contexto da literatura hoje, os presentes resultados sugerem que uma disfunção do mecanismo de NMD pode constituir um fator de risco para a fisiopatologia da PEA.

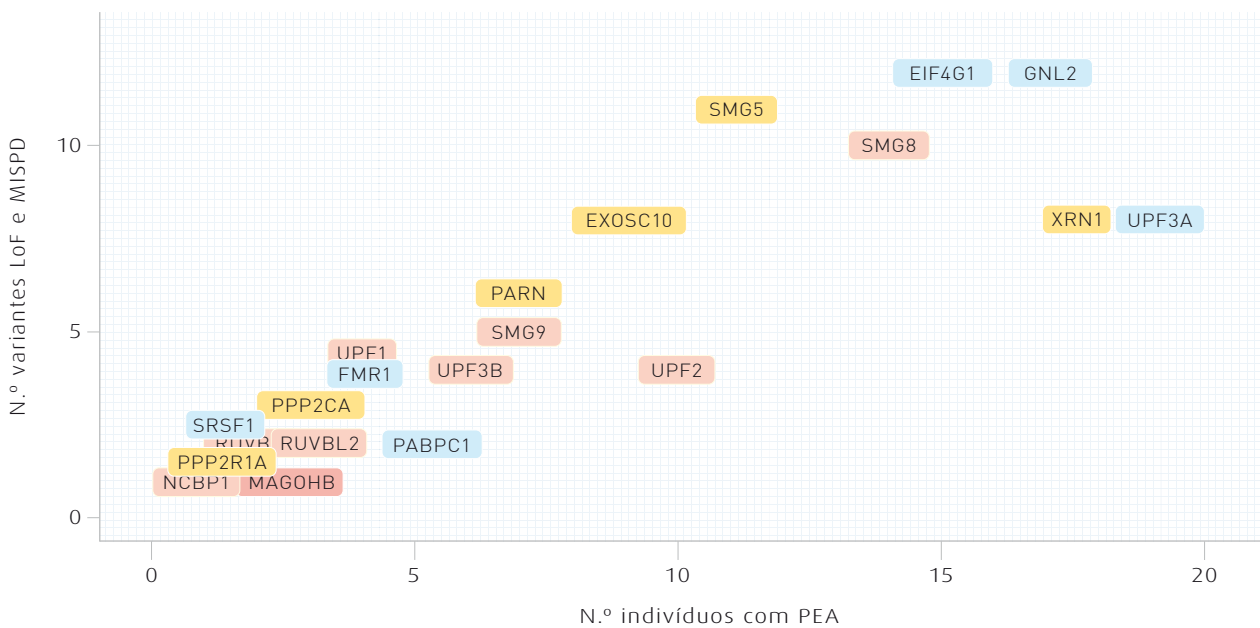


Figura 1: Representação dos genes com SNVs identificados em indivíduos com perturbação do espectro do autismo (PEA).

a) Genes identificados, marcados com cores de acordo com a sua função no *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD)



b) Grupo de genes com variantes identificadas em <1% dos indivíduos com PEA





**Tabela 2:** ↓ Número de SNVs e CNVs localizados em regiões dos genes que codificam domínios importantes para a sua função no *non-sense-mediated mRNA decay* (NMD) em 258 indivíduos com perturbação do espectro do autismo (PEA).

| Gene                         | Localização | SNVs <sup>(1)</sup> |       | CNVs <sup>(1)</sup> | PEA n <sup>(2)</sup> |
|------------------------------|-------------|---------------------|-------|---------------------|----------------------|
|                              |             | LoF                 | MISPD |                     |                      |
| <i>EJNBAS</i> <sup>(3)</sup> | 2p24.3      | 5                   | 20    | 1                   | 99                   |
| <i>DHX34</i>                 | 19q13.32    | 2                   | 12    | 1                   | 25                   |
| <i>GNL2</i> <sup>(3)</sup>   | 1p34.3      | 1                   | 11    | –                   | 17                   |
| <i>SMG7</i>                  | 1q25.3      | –                   | 8     | –                   | 14                   |
| <i>SMG1</i>                  | 16p12.3     | 1                   | 12    | –                   | 13                   |
| <i>UPF2</i>                  | 10p14       | 1                   | 3     | 1                   | 11                   |
| <i>UPF3A</i>                 | 13q34       | 1                   | 2     | 2                   | 11                   |
| <i>ICE1</i>                  | 5p15.32     | 2                   | 7     | –                   | 10                   |
| <i>SMG8</i>                  | 17q22       | –                   | 6     | –                   | 8                    |
| <i>GSPT1</i>                 | 16p13.13    | –                   | 4     | 1                   | 7                    |
| <i>UPF3B</i>                 | Xq24        | 1                   | 3     | 1                   | 7                    |
| <i>ETF1</i>                  | 5q31.2      | 1                   | 3     | –                   | 6                    |
| <i>SMG6</i>                  | 17p13.3     | –                   | 2     | 1                   | 6                    |
| <i>RBM8A</i>                 | 1q21.1      | –                   | –     | 2                   | 4                    |
| <i>SMG9</i>                  | 19q13.31    | 1                   | 1     | –                   | 4                    |
| <i>UPF1</i>                  | 19p13.11    | –                   | 4     | –                   | 4                    |
| <i>CASC3</i>                 | 17q21.1     | –                   | 3     | –                   | 3                    |
| <i>RUVBL2</i>                | 19q13.33    | –                   | 1     | 1                   | 2                    |
| <i>SEC13</i> <sup>(3)</sup>  | 3p25.3      | –                   | 2     | –                   | 2                    |
| <i>SMG5</i>                  | 1q22        | –                   | 2     | –                   | 2                    |
| <i>EIF4A3</i>                | 17q25.3     | –                   | 1     | –                   | 1                    |
| <i>RUVBL1</i>                | 3q21.3      | –                   | 1     | –                   | 1                    |
| <i>SRSF1</i>                 | 17q22       | –                   | 1     | –                   | 1                    |

<sup>(1)</sup> Número de SNVs e CNVs localizados em regiões do gene que codificam domínios necessários para a função do mecanismo de NMD; <sup>(2)</sup> Número de indivíduos com PEA para os quais foram identificados SNVs e CNVs nos genes indicados; <sup>(3)</sup> Estes genes são fatores conservados do mecanismo de NMD mas ainda não se conhecem os domínios essenciais para a sua função.

SNVs, *Single Nucleotide Variants*; CNVs, *Copy Number Variants*.



## \_Conclusões

Este estudo encontrou evidência de um possível contributo do funcionamento anómalo do *Nonsense-Mediated mRNA Decay* (NMD) na perturbação do espectro do autismo (PEA).

Tendo um papel importante na regulação pós-transcricional, o NMD, se disfuncional, pode contribuir para a PEA através da desregulação da expressão dos seus genes-alvo. Por outro lado, pode ainda contribuir para a PEA, e para a sua heterogeneidade fenotípica, se a capacidade de degradação do mRNA mediada por mutações *nonsense* for afetada.

Uma melhor compreensão do mecanismo de NMD e das suas funções pode constituir uma oportunidade de desenvolvimento de intervenções terapêuticas para o tratamento e prevenção da PEA.

## Referências bibliográficas:

- (1) American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 5th ed. Washington: APA, 2013. <http://dx.doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596>
- (2) Wittmann J, Hol EM, Jäck HM. hUPF2 silencing identifies physiologic substrates of mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *Mol Cell Biol*. 2006 Feb;26(4):1272-87. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.4.1272-1287.2006>
- (3) Lou CH, Dumdie J, Goetz A, et al. Nonsense-Mediated RNA Decay Influences Human Embryonic Stem Cell Fate. *Stem Cell Reports*. 2016 Jun 14;6(6):844-57. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.05.008>
- (4) Notaras M, Allen M, Longo F, et al. UPF2 leads to degradation of dendritically targeted mRNAs to regulate synaptic plasticity and cognitive function. *Mol Psychiatry*. 2020 Dec;25(12):3360-79. Epub 2019 Oct 21. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0547-5>
- (5) Jolly LA, Homan CC, Jacob R, et al. The UPF3B gene, implicated in intellectual disability, autism, ADHD and childhood onset schizophrenia regulates neural progenitor cell behaviour and neuronal outgrowth. *Hum Mol Genet*. 2013 Dec 1;22(23):4673-87. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt315>
- (6) Alrahbeni T, Sartor F, Anderson J, et al. Full UPF3B function is critical for neuronal differentiation of neural stem cells. *Mol Brain*. 2015 May 27;8:33. <https://doi.org/10.1186/s13041-015-0122-1>
- (7) Domingo D, Nawaz U, Corbett M, et al. A synonymous UPF3B variant causing a speech disorder implicates NMD as a regulator of neurodevelopmental disorder gene networks. *Hum Mol Genet*. 2020 Aug 29;29(15):2568-78. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddaa151>
- (8) Kurosaki T, Imamachi N, Pröschel C, et al. Loss of the fragile X syndrome protein FMRP results in misregulation of nonsense-mediated mRNA decay. *Nat Cell Biol*. 2021 Jan;23(1):40-48. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-00618-1>
- (9) Carbon S, Ireland A, Mungall CJ, et al. ; AmiGO Hub; Web Presence Working Group. AmiGO: online access to ontology and annotation data. *Bioinformatics*. 2009 Jan 15;25(2):288-9. Epub 2008 Nov 25. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn615>
- (10) Fabregat A, Sidiropoulos K, Viteri G, et al. Reactome diagram viewer: data structures and strategies to boost performance. *Bioinformatics*. 2018 Apr 1;34(7):1208-14. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx752>
- (11) Buxbaum JD, Daly MJ, Devlin B, et al; Autism Sequencing Consortium. The autism sequencing consortium: large-scale, high-throughput sequencing in autism spectrum disorders. *Neuron*. 2012 Dec 20;76(6):1052-6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.008>
- (12) Pinto D, Pagnamenta AT, Klei L, et al. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature*. 2010 Jul 15;466(7304):368-72. <https://doi.org/10.1038/nature09146>
- (13) Sanders SJ, Ercan-Sencicek AG, Hus V, Luo R, et al. Multiple recurrent de novo CNVs, including duplications of the 7q11.23 Williams syndrome region, are strongly associated with autism. *Neuron*. 2011 Jun 9;70(5):863-85. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.002>
- (14) Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010 Apr;7(4):248-9. <https://doi.org/10.1038/nmeth0410-248>
- (15) Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*. 2009;4(7):1073-81. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.86>
- (16) Sjöstedt E, Zhong W, Fagerberg L, et al. An atlas of the protein-coding genes in the human, pig, and mouse brain. *Science*. 2020 Mar 6;367(6482):eaay5947. <https://doi.org/10.1126/science.aay5947>
- (17) Longman D, Jackson-Jones KA, Maslon MM, et al. Identification of a localized nonsense-mediated decay pathway at the endoplasmic reticulum. *Genes Dev*. 2020 Aug 1;34(15-16):1075-88. <https://doi.org/10.1101/gad.338061.120>

## Avaliação do desempenho de uma core-facility de sequenciação genómica especializada em saúde pública

### Performance evaluation of a genomic sequencing core-facility specialized in public health

Luís Vieira<sup>1,2</sup>, Catarina Silva<sup>1,2</sup>, Sílvia Duarte<sup>1</sup>, Joana Mendonça<sup>1</sup>, Dina Carpinteiro<sup>1,2</sup>, Daniel A. Sampaio<sup>1</sup>, José Ferrão<sup>1</sup>, Daniela Santos<sup>1</sup>, Miguel Machado<sup>1</sup>, Joana Isidro<sup>3</sup>, Paula Barreiro<sup>1</sup>, Glória Isidro<sup>1</sup>

luis.vieira@insa.min-saude.pt

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

(2) Centro de Toxicogenómica e Saúde Humana. NOVA Medical School|Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal

(3) Unidade de Bioinformática. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

#### \_Resumo

A Unidade de Tecnologia e Inovação (UTI) do Departamento de Genética Humana foi criada em 2009 pelo despacho normativo n.º 15/2009. Apesar de estar integrada num departamento técnico científico, esta unidade constituiu-se desde logo como *core-facility* de sequenciação genómica do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA). Este papel envolve uma gestão contínua de prioridades dos serviços a prestar aos utilizadores, no âmbito da resposta a diferentes problemas de saúde pública, aliada a uma preocupação permanente com a qualidade dos resultados e os tempos de resposta. Neste trabalho, apresentamos os resultados da avaliação do desempenho da UTI, desde a introdução da tecnologia de *Next-Generation Sequencing* (NGS) em 2013, em termos de: (i) métricas de produção da Unidade, (ii) impacto dos resultados publicados no âmbito de colaborações científicas com os grupos de investigação do INSA ou de entidades externas e de (iii) avaliação dos serviços através de um inquérito dirigido aos utilizadores. Até final de 2021, o número de ensaios de NGS e de citações dos trabalhos publicados cresceram, por ano, 39% e 61%, respectivamente. Os utilizadores avaliaram de forma muito positiva os serviços prestados pela UTI em 2021. Globalmente, estes resultados demonstram que o modelo de trabalho de "*core-facility*" exercido pela UTI é uma mais-valia na resposta aos problemas da saúde pública em Portugal.

#### \_Abstract

The Technology and Innovation Unit (UTI) of the Department of Human Genetics was established in 2009 by the normative order no. 15/2009. Despite being integrated in a technical and scientific department, this unit was from the beginning constituted as the genomic sequencing core-facility of the National Institute of Health Doutor Ricardo Jorge (INSA). This role involves continuous management of service priorities to be provided to users, within the scope of responding to different public health problems, combined with a permanent concern with the quality of data and response time. In this work, we present the results of the UTI performance evaluation since the introduction of the Next-Generation Sequencing (NGS) technology in 2013, in terms of: (i) Unit production metrics, (ii) impact of the results published in the scope of scientific collaborations with INSA research groups or external entities, and (iii) evaluation of services through a survey aimed at users. By the end of 2021, the number of NGS assays and citations of

published works grew by 39% and 61% annually, respectively. Users evaluated very positively the services provided by the UTI in 2021. Overall, these results demonstrate that the "*core-facility*" work model exercised by the UTI is an asset in responding to public health problems in Portugal.

#### \_Introdução

Atualmente, a resposta aos problemas de saúde requer a existência de tecnologias sofisticadas, capazes de fornecer dados de relevância clínica ou epidemiológica, que se traduzam em melhores diagnósticos individuais ou na tomada rápida de decisões em matéria de saúde pública. É o caso das tecnologias de sequenciação de nova geração (*Next-Generation Sequencing*, NGS) que hoje permitem, num mesmo período de tempo, sequenciar mais cerca de mil milhões de bases de DNA do que há 35 anos atrás, e cujo impacto no conhecimento científico é similar ao da invenção do microscópio (1). No entanto, este tipo de tecnologias está geralmente associado a custos de aquisição e operação elevados e requer a formação de recursos humanos altamente especializados, o que torna a sua implementação exigente e dispendiosa.

Nas grandes instituições académicas ou científicas, as plataformas de sequenciação estão sediadas em laboratórios centralizados designados por *core-facilities*. A centralização permite a utilizadores internos ou externos, oriundos de áreas científicas distintas (por ex., genética humana ou microbiologia), aceder a tecnologias de ponta, materiais relevantes e apoio técnico especializado, incluindo análise



de dados, o que não é sustentável em cada laboratório individual. As *core-facilities* devem ter a capacidade de adaptar os seus colaboradores e equipamentos de forma a oferecer um conjunto vasto de aplicações e garantir a manutenção, calibração, operacionalidade e atualização regular dos equipamentos, a reutilização de protocolos entre utilizadores, a formação e treino de estudantes, técnicos e investigadores, e trabalhar com procedimentos estandardizados e validados de acordo com sistemas de gestão da qualidade, respeitando orçamentos e prazos de resposta (2).

A Unidade de Tecnologia e Inovação (UTI) do Departamento de Genética Humana foi criada em janeiro de 2009 pelo despacho normativo n.º 15/2009 (3), constituindo-se desde então como *core-facility* de sequenciação genómica do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA). De acordo com o artigo 24º do Regulamento Interno do INSA (4), à UTI compete, especificamente, "o desenvolvimento e a execução de ensaios moleculares no âmbito da investigação e da prestação de serviços (...) empregando tecnologia de ponta" e "desenvolver e avaliar as condições de aplicação de novas tecnologias (...)". Dada a sua matriz primordial de *core-facility*, a UTI adotou ao longo dos últimos 13 anos uma estratégia que visou a atualização tecnológica e metodológica, a diversificação do portefólio de serviços, a adesão ao sistema de gestão da qualidade do INSA e, mais recentemente, a implementação de *pipelines* e métodos de bioinformática para análise de dados de sequenciação em genética humana. A UTI exerce um modelo de operação híbrido, ou seja, em que a parte principal da sua atividade corresponde a serviços inclusos de sequenciação "de Sanger", NGS, análise de fragmentos e biologia computacional/bioinformática, executados sob a exclusiva responsabilidade dos colaboradores da Unidade, e outra parte em que os utilizadores internos do INSA podem operar autonomamente alguns dos equipamentos da Unidade. Atualmente, a Unidade está equipada com tecnologias de sequenciação capilar (*Applied Biosystems*) e de NGS de 2ª (*Illumina*) e 3ª (*Oxford Nanopore Technologies*) gerações, e servidores de alto desempenho para tarefas de computação. Na **tabela 1** estão sumarizados os principais serviços que são realizados atualmente na UTI.

**Tabela 1:** ↓ Principais serviços executados na Unidade de Tecnologia e Inovação do Departamento de Genética Humana, INSA.

| Serviço  |
|--|
| Genotipagem  |
| Análise de fragmentos  |
| Sequenciação de 1ª geração                                       |
| Sequenciação "de Sanger"   |
| Sequenciação de 2ª geração                                       |
| Diagnóstico pré-natal não invasivo                               |
| Sequenciação de exoma clínico e análise de variantes             |
| Sequenciação de exoma completo e análise de variantes            |
| Sequenciação de painéis de genes (específicos de doença)         |
| Sequenciação de pequenos genomas (bactérias e vírus)             |
| Sequenciação de pequenos RNAs e análise de expressão diferencial |
| Sequenciação de transcriptoma                                    |
| Sequenciação metagenómica 16S rRNA e análise taxonómica          |
| Sequenciação de 3ª geração*                                      |
| Sequenciação de genoma humano                                    |
| Sequenciação de metiloma humano e análise de metilação (5'-mC)   |
| Sequenciação de pequenos genomas (bactérias)                     |

\* disponível apenas no âmbito de projetos de investigação.

A UTI trabalha lado a lado com investigadores e técnicos de diferentes áreas temáticas, na busca de novas descobertas científicas, no esclarecimento de surtos epidémicos e na obtenção de diagnósticos mais rápidos e completos. Este papel exige um elevado sentido de responsabilidade e uma gestão de prioridades eficaz, por forma a que todas as solicitações sejam respondidas em tempo útil, sem negligenciar os requisitos de qualidade. Neste contexto, o desempenho desta Unidade deve ser medido de forma periódica, com base em diferentes métricas preconizadas para a avaliação da eficiência e eficácia de *core-facilities* (5,6). No caso da UTI, pretendeu-se avaliar o desempenho da Unidade tendo por base os serviços de sequenciação "de Sanger", análise de fragmentos e NGS, realizados desde a introdução desta última tecnologia em 2013, de acordo com os 3 planos seguintes: (i) métricas dos serviços inclusos da UTI,



incluindo número de amostras processadas, quantidade de sequência gerada e tempo de resposta, ao longo dos anos, (ii) número e impacto das publicações científicas em que a UTI foi solicitada a colaborar com investigadores internos e externos, enquanto *core-facility* especializada em sequenciação de DNA e análise de fragmentos, e (iii) opinião dos utilizadores internos sobre os serviços prestados pela UTI em 2021, obtida através de um inquérito de resposta anónima. Neste trabalho, apresentamos os resultados desta avaliação.

## \_Métodos

As métricas dos serviços da UTI foram obtidas entre 2013 e 2021 por diferentes métodos. Até junho de 2017, o número de amostras recebidas foi obtido a partir dos registos efetuados manualmente ou de forma semi-automatizada (*script* em linguagem VBA), no *Microsoft Excel*. A partir de julho de 2017, foi implementado um sistema de gestão de *tickets online* (*ServiceDesk* UTI) com base na plataforma OTRS (Rexpondo), para submissão dos pedidos de serviços à UTI, gestão interna dos pedidos e entrega de resultados. Após receção de cada pedido de serviço foi atribuído um nível de prioridade, em função do tipo de atividade e/ou urgência, respetivamente:

- Prioridade 1: Atividade de diagnóstico ou saúde pública, com carácter de urgência
- Prioridade 2: Atividade de diagnóstico ou saúde pública, sem carácter de urgência
- Prioridade 3: Atividade de investigação e desenvolvimento, avaliação externa da qualidade ou vigilância epidemiológica.

Os dados de produção e de tempo de resposta foram extraídos da base de dados do *ServiceDesk* UTI, no final de cada ano, através de um *script* em linguagem *Python* desenhado internamente.

Neste trabalho, apresentam-se somente os tempos de resposta para a sequenciação "de Sanger", por se tratar do serviço mais requisitado desde a criação da UTI e pelo facto

de as amostras serem usualmente processadas em conjuntos de número fixo (96 ou múltiplos de 96 amostras), de acordo com um único método. As médias dos tempos de resposta foram calculadas separadamente para os anos de 2018, 2019, 2020 e 2021, numa base de 24 horas/dia e 7 dias/semana, em função da prioridade atribuída a cada pedido de serviço.

O total de sequência de DNA obtido em cada corrida de sequenciação realizada nos equipamentos de NGS foi obtido diretamente a partir dos dados fornecidos pela aplicação *Sequencing Analysis Viewer* (*Illumina*) ou, indiretamente, através do pacote de bibliotecas *InterOp* (*Illumina*) através do relatório MultiQC (7).

A colaboração em atividades de investigação foi avaliada tendo por base os artigos publicados com revisão por pares, entre 2015 e 2021 inclusive, cujo trabalho de sequenciação e/ou análise de fragmentos tenha sido integralmente realizado na UTI e em que, pelo menos, um membro da equipa da UTI fosse coautor. O número de citações e a classificação das áreas de investigação dos artigos publicados, foram obtidos a partir da informação disponibilizada pela *Web of Science* (Clarivate).

A opinião dos utilizadores dos serviços da UTI foi obtida através de um inquérito elaborado com a aplicação *Google Forms*. O inquérito foi constituído por um total de 10 perguntas com resposta de escolha múltipla obrigatória e 1 pergunta com resposta livre (opcional), que procuraram obter o perfil dos utilizadores dos serviços da UTI (4 perguntas) e a avaliação dos mesmos sobre os serviços prestados (7 perguntas). O inquérito foi enviado aos 100 requisitantes internos que solicitaram 1 ou mais serviços à UTI entre 5 de janeiro e 30 de dezembro de 2021 inclusive. O número total de serviços prestados neste período foi de 1708, correspondente a um total acumulado de 49452 amostras. As respostas foram coletadas de forma anónima, automatizada e agregada pela aplicação *Google Forms*, entre os dias 5 e 14 de janeiro de 2022 inclusive.



## \_Resultados

### *Amostras processadas*

Entre 2013 e 2021, a UTI foi responsável por produzir resultados de sequenciação e genotipagem para um total de 334471 amostras provenientes de utilizadores internos e externos, das quais apenas 0,8% (2781 amostras) corresponderam a serviços externos faturáveis. O número de amostras anual apresentou um comportamento relativamente estável até 2017, variando entre um mínimo de 35227 e um máximo de 39659 amostras, e evidenciou uma ligeira tendência decrescente entre 2018 e 2020, em resultado de uma redução acentuada nas amostras de sequenciação "de Sanger" ([gráfico 1a](#)). No entanto, em 2021, o número de amostras processadas atingiu o valor mais alto de sempre (49452 amostras), o que se deveu maioritariamente à sequenciação por NGS de 18766 amostras de genoma do novo coronavírus SARS-CoV-2, mas também a um aumento das amostras de sequenciação "de Sanger" (9,8%) e de análise de fragmentos (13,7%), relativamente a 2020.

A partir de 2013, em consequência da introdução do primeiro equipamento de NGS na UTI (*MiSeq*, *Illumina*), observou-se uma transição gradual da sequenciação "de Sanger" para a NGS, evidenciada na variação oposta do número de amostras processadas em cada tecnologia ao longo dos anos, e que foi transversal a diferentes áreas de trabalho do INSA. No entanto, em 2021, a sequenciação "de Sanger" ainda representava cerca de 42% do total das amostras processadas pela UTI. A tecnologia de electroforese capilar, utilizada na sequenciação "de Sanger", serve também de base à metodologia de análise de fragmentos, que está muito associada a *kits* comerciais ou ensaios padronizados internamente, incluídos no âmbito do diagnóstico genético (por exemplo, pesquisa de aneuploidias em diagnóstico pré-natal) ou da vigilância epidemiológica (por exemplo, ribotipagem de *Clostridium difficile*). Nos últimos 3 anos, o número de amostras processadas para análise de fragmentos apresentou uma tendência crescente, tendo inclusive atingido o valor máximo anual (7200 amostras) em 2021.

### *Quantidade de sequência produzida por tecnologias de NGS*

Após a aquisição do equipamento *MiSeq*, a UTI reforçou a capacidade instalada em 2018 com o equipamento *NextSeq 550 (Illumina)*, que permite gerar cerca de 8x mais sequência que o *MiSeq*. Entre 2013 e 2021, estes 2 equipamentos foram responsáveis pela quase totalidade dos serviços de NGS realizados pela UTI. Conforme representado no [gráfico 1b](#), o número de ensaios de NGS e/ou a quantidade de sequência produzida têm vindo a aumentar de forma continuada desde 2013, demonstrando o sucesso da UTI na implementação da transição tecnológica da sequenciação "de Sanger" para a NGS. Até final de 2021, foram gerados mais de 8,5 terabases de sequência de DNA, através de 646 ensaios realizados nas 2 plataformas de NGS, o que equivale ao somatório da sequência haplóide de ~2800 genomas humanos. A partir de 2018, efetuou-se a transferência progressiva dos ensaios realizados no equipamento *MiSeq* para o *NextSeq 550*, os quais representaram a maioria (55,9%) dos ensaios de NGS realizados em 2021.

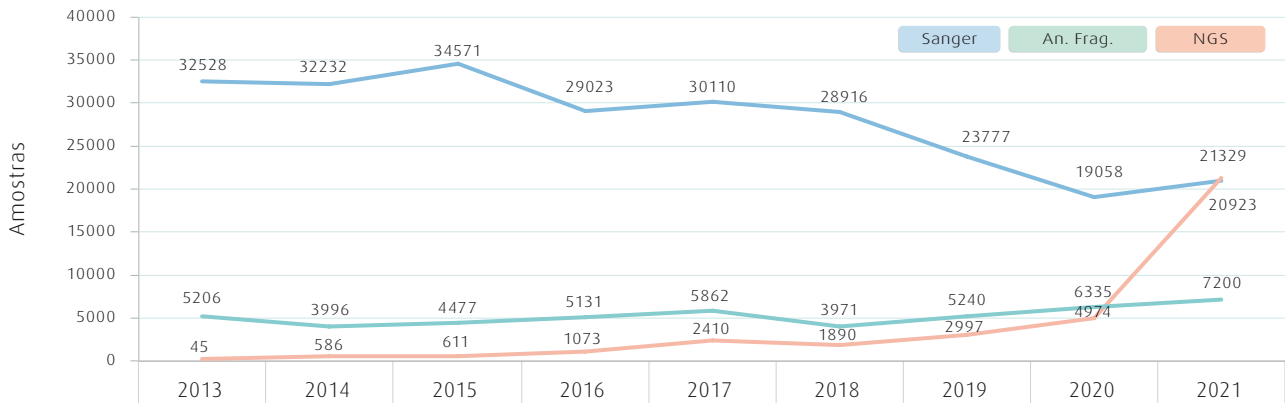
### *Tempos de resposta*

O tempo de resposta na sequenciação "de Sanger" tem vindo a decrescer desde 2018 de forma consistente, variando entre um mínimo de 1,4 dias e um máximo de 3,6 dias no último ano, de acordo com a respetiva prioridade ([gráfico 1c](#)). Este decréscimo acompanhou a redução anual do número de amostras entre 2018 e 2020. No entanto, em 2021, os tempos de resposta melhoraram face a 2020, apesar do aumento do número de amostras. Este efeito reflete, em parte, a adoção ao regime de teletrabalho no INSA durante a pandemia da COVID-19, uma vez que os resultados da eletroforese capilar puderam ser analisados remotamente, devido à disponibilização de ligações VPN aos equipamentos.

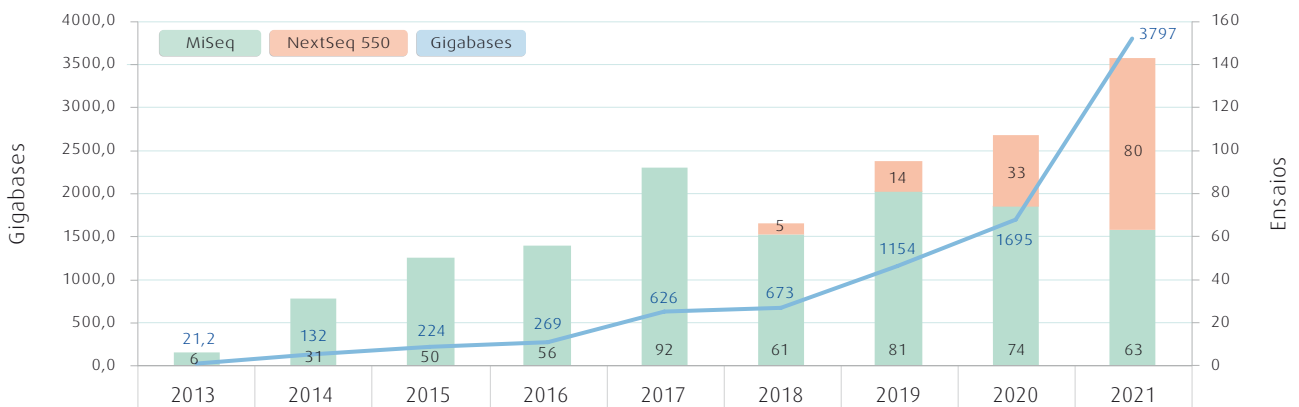


**Gráfico 1:** ↓ Métricas dos serviços incluídos da Unidade de Tecnologia e Inovação (UTI) do Departamento de Genética Humana, INSA.

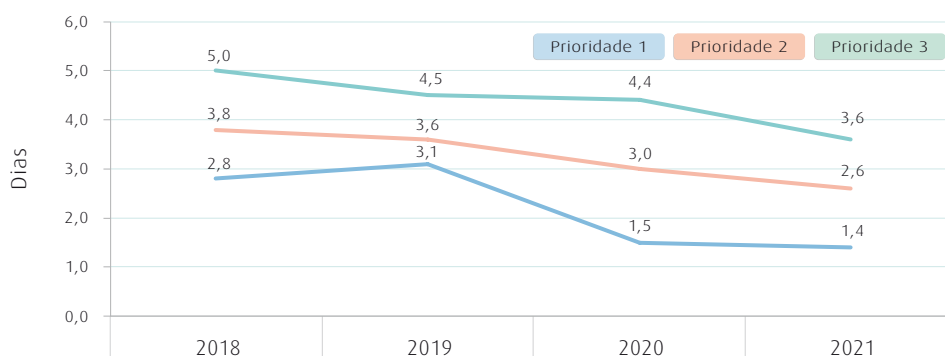
a) Evolução do número de amostras processadas pela UTI para sequenciação "de Sanger", NGS e análise de fragmentos, entre 2013 e 2021.



b) Evolução do número de corridas de NGS nos equipamentos MiSeq e NextSeq 550, e do número correspondente de gigabases produzido, entre 2013 e 2021.



c) Evolução do tempo de resposta em sequenciação "de Sanger", de acordo com o nível de prioridade do serviço requisitado, entre 2018 e 2021.





artigos breves\_ n. 10

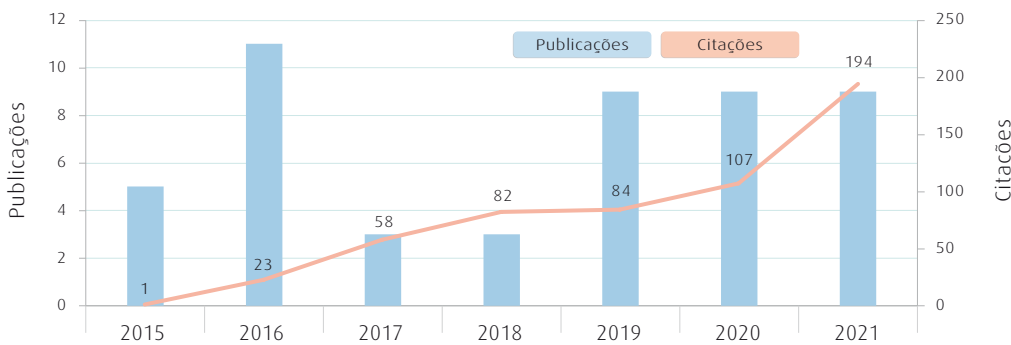
**Colaboração científica e áreas de investigação**

Entre os anos de 2015 e 2021, inclusive, foram publicados 49 artigos em revistas com revisão por pares (média de 7 artigos/ano), em que a equipa da UTI colaborou ativamente utilizando os seus recursos tecnológicos e materiais. A larga maioria dos artigos (93,8%) teve como base exclusiva, ou maioritária, dados obtidos com as várias plataformas de NGS, enquanto que os restantes (6,2%) incluíram dados obtidos unicamente com a tecnologia de eletroforese capilar. Entre 2015 e 2021, o número de citações dos artigos publicados foi de 549 (média de 11,2 citações por artigo),

tendo aumentado de ano para ano, de forma consistente (gráfico 2).

No conjunto dos artigos publicados, verificou-se uma elevada transversalidade das áreas de investigação em que foi possível aplicar resultados de sequenciação. No entanto, de um total de 19 áreas identificadas, sobressaíram claramente a microbiologia e as doenças infecciosas, que corresponderam, no seu conjunto, a 49% (24 artigos) e a 26,5% (13 artigos) do total de artigos em que a UTI colaborou nos últimos 7 anos (figura 1).

**Gráfico 2:** Métricas das colaborações científicas da Unidade de Tecnologia e Inovação (UTI) do Departamento de Genética Humana, INSA.



Evolução do número de publicações com revisão por pares em que a UTI colaborou ativamente, entre 2015 e 2021, e do respetivo número de citações, de acordo com os dados disponíveis na Web of Science.

**Figura 1:** Representação gráfica das áreas de investigação em que a equipa da Unidade de Tecnologia e Inovação do Departamento de Genética Humana/INSA colaborou, através da participação em publicações por pares, entre 2015 e 2021.



A dimensão de cada mosaico é proporcional ao número de artigos de cada área de investigação, sendo que algumas publicações podem ser classificadas pela Web of Science em mais do que uma área de investigação.



### *Inquérito aos utilizadores*

A taxa de resposta ao inquérito foi de 26% e os resultados obtidos para cada questão de escolha múltipla estão representados no [gráfico 3](#). Em 2021, o espectro de utilizadores dos serviços da UTI cobria diferentes áreas temáticas do INSA, incluindo a genética humana (46,2%), as doenças infecciosas (30,8%), as doenças não transmissíveis (19,2%) e a saúde ambiental (3,8%). Do total de utilizadores que responderam ao inquérito, a maioria está adstrita às atividades de prestação de serviços (53,8%) e/ou investigação e desenvolvimento (53,8%), sendo que 30,8% acumula duas ou mais atividades distintas. A larga maioria dos utilizadores desempenha funções técnicas em diferentes carreiras do Estado (73,1%), sendo que uma parte significativa destes técnicos (21,1%) também está a realizar o doutoramento. A qualificação académica mais frequente dos utilizadores é o mestrado (46,2%), seguida de doutoramento (34,6%) e de licenciatura (19,2%).

Em 2021, a larga maioria dos utilizadores (84,6%) recorreu à sequenciação "de Sanger" na sua atividade regular, enquanto que menos de metade solicitou também, ou unicamente, serviços de NGS (42,3%) ou análise de fragmentos (38,5%). Globalmente, mais de metade dos utilizadores (57,7%) recorreram a 2 ou mais serviços da UTI. A quase totalidade dos inquiridos (84,6%) considerou que a UTI, no final de 2021, se encontrava totalmente atualizada a nível tecnológico. A totalidade dos utilizadores indicou também que a qualidade dos resultados produzidos pela UTI foi "excelente" (61,5%) ou "boa" (38,5%), enquanto que a interação com a equipa da UTI foi classificada por 53,8% como "excelente" e por 38,5% como "boa". O tempo de resposta da UTI foi avaliado de forma menos consensual pelos inquiridos, tendo sido classificado como "excelente" (23,5%), "bom" (61,5%), "aceitável" (11,5%) ou "insatisfatório" (3,8%). Finalmente, a maioria dos utilizadores (69,2%) considerou que os resultados produzidos pela UTI tiveram um impacto elevado nos seus respetivos trabalhos.

### **\_Conclusões**

A introdução da tecnologia de sequenciação de nova geração (NGS) no INSA, em 2013, foi um marco crucial e indispensável no crescimento e desenvolvimento das atividades de investigação e prestação de serviços. Os resultados da avaliação da atividade da Unidade de Tecnologia e Inovação (UTI) do seu Departamento de Genética Humana nos últimos nove anos, que se descrevem neste trabalho, confirmam o sucesso da adaptação a uma tecnologia disruptiva e a novos métodos de trabalho. Durante este período, a UTI colaborou na investigação em saúde pública em diferentes áreas científicas e aumentou mais de 500x o total de sequência de DNA produzida anualmente. Este trabalho abriu lugar a descobertas científicas [\(8\)](#) e a novos diagnósticos [\(9\)](#), e alavancou os recursos indispensáveis, entre outros, à monitorização da diversidade genética de SARS-CoV-2 no contexto da pandemia da COVID-19 em Portugal [\(10\)](#).

A forte aposta na tecnologia de NGS não descurou o apoio e dedicação da UTI aos restantes serviços, de que são exemplo a resposta ao aumento de amostras processadas para análise de fragmentos e a redução no tempo de resposta para sequenciação "de Sanger", que ocorreram de forma gradual e consistente, nos últimos três anos. No entanto, uma parte dos utilizadores inquiridos sobre os serviços da UTI defende que o tempo de resposta dos serviços é um aspecto ainda a melhorar. Por outro lado, a maioria considera que os resultados obtidos pela UTI são de elevada qualidade e têm um impacto relevante nos diversos trabalhos do INSA.

Apesar de ser consensual entre os inquiridos que a Unidade está atualizada tecnologicamente, a UTI está já a preparar-se para uma nova transição tecnológica, através da sequenciação do genoma e epigenoma humano baseada em nanoporos [\(11\)](#) e da sua aplicação ao estudo de doenças raras.

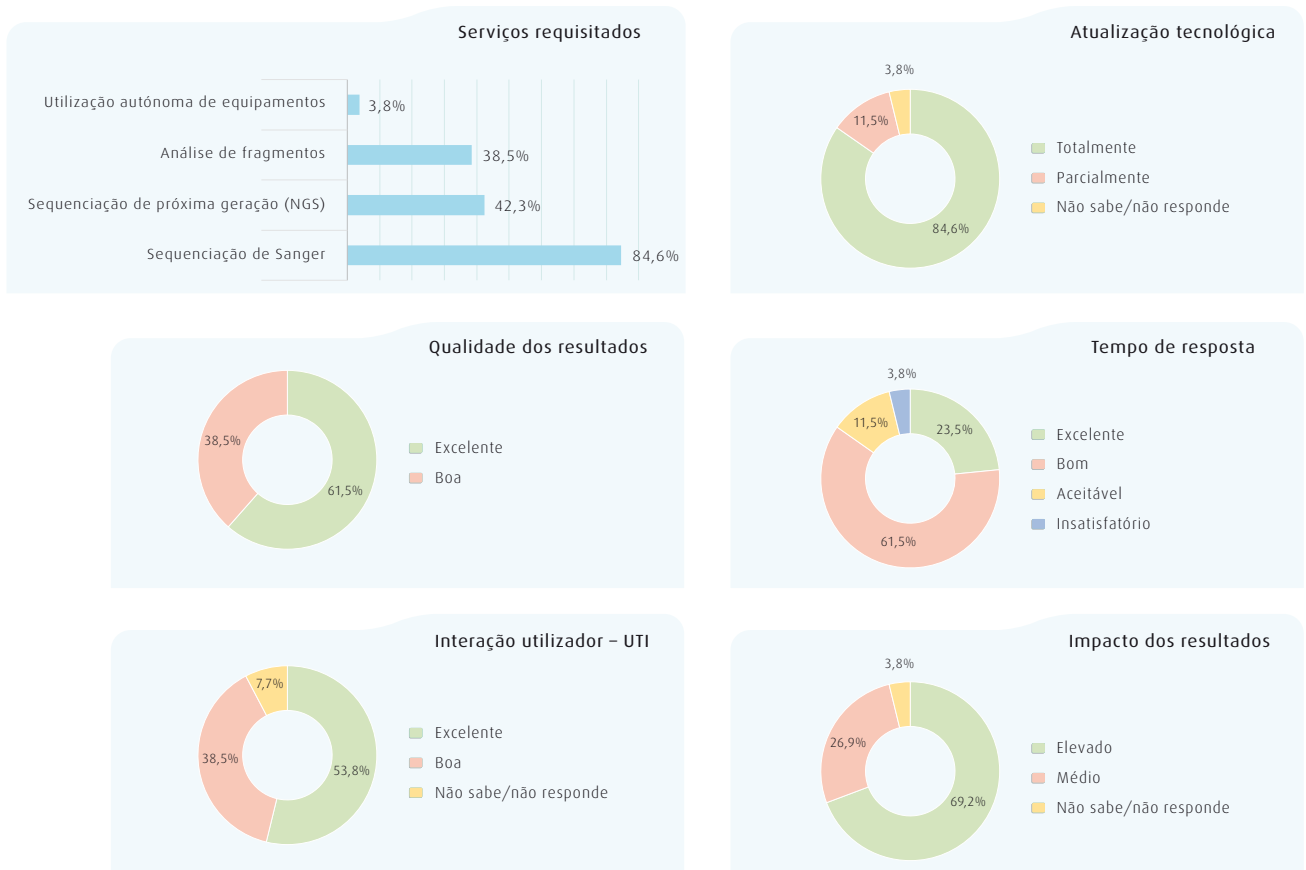


Gráfico 3: Inquérito aos utilizadores dos serviços da Unidade de Tecnologia e Inovação (UTI) do Departamento de Genética Humana/INSA durante 2021.

a) Resultados relativos ao perfil dos utilizadores (4 perguntas).



b) Resultados relativos à avaliação dos serviços (6 perguntas).





### Agradecimentos:

Os autores agradecem à Sónia Pedro, Ana Cardoso e Catarina Ventura pelo trabalho laboratorial desenvolvido na UTI durante os anos de 2009 a 2012, ao João Galhardo e Pedro Mansinho pela implementação do ServiceDesk UTI, ao José Luís Monteiro pela disponibilização regular e atempada dos dados de produção do ServiceDesk UTI, e aos grupos de investigação do INSA e de entidades externas com os quais a UTI teve a oportunidade de colaborar desde 2013.

### Financiamento:

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto GenomePT (POCI-01-0145-FEDER-022184), cofinanciado pelo Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (Compete2020), Programa Operacional Regional de Lisboa (Lisboa 2020) e Programa Operacional Regional do Algarve (CRESC Algarve2020), através do Portugal 2020 e do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), e pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT). Este trabalho foi também suportado por Fundos FEDER através do Programa Operacional Fatores de Competitividade – COMPETE e por Fundos Nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito do projeto UID/BIM/00009/2019 (Centro de Toxicogenómica e Saúde Humana – ToxOmics).

### Referências bibliográficas:

- (1) Shendure J, Balasubramanian S, Church GM, et al. DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature*. 2017 Oct 19;550(7676):345-53. <https://doi.org/10.1038/nature24286>. Erratum in: *Nature*. 2019 Apr;568(7752):E11.
- (2) Meder D, Morales M, Pepperkok R, et al. Institutional core facilities: prerequisite for breakthroughs in the life sciences: Core facilities play an increasingly important role in biomedical research by providing scientists access to sophisticated technology and expertise. *EMBO Rep*. 2016 Aug;17(8):1088-93. <https://doi.org/10.15252/embr.201642857>
- (3) Despacho normativo n.º 15/2009, de 7 de abril. DR 2ª Série 17-05-2013, n.º 68:2958-60. Procede à transferência de competências do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P., exercidas pelo Centro de Genética Médica Doutor Jacinto Magalhães daquele instituto, para o Centro Hospitalar do Porto, E.P.E. <https://data.dre.pt/eli/dec-lei/68/2013/05/17/p/dre/pt/html>
- (4) Regulamento n.º 329/2013, 2 de agosto. DR 2ª Série 28-08-2013, n.º 165:26855-64. Regulamento interno do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I. P. <https://dre.pt/dre/detalhe/regulamento/329-2013-2797415>
- (5) Lanati A, Marzano M, Manzari C, et al. Management at the service of research: ReOmicS, a quality management system for omics sciences. *Palgrave Commun*. 2019;5:75. <https://doi.org/10.1057/s41599-019-0283-0>.
- (6) Gregory CW. Building a Quality Management System in a Core Facility: A Genomics Core Case Study. *J Biomol Tech*. 2020 Jul;31(2):57-65. <https://doi.org/10.7171/jbt.20-3102-004>
- (7) Ewels P, Magnusson M, Lundin S, et al. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*. 2016 Oct 1;32(19):3047-8. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>
- (8) Pinto M, Borges V, Antelo M, et al. Genome-scale analysis of the non-cultivable *Treponema pallidum* reveals extensive within-patient genetic variation. *Nat Microbiol*. 2016 Oct 17;2:16190. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.190>
- (9) Nogueira C, Silva L, Pereira C, et al. Targeted next generation sequencing identifies novel pathogenic variants and provides molecular diagnoses in a cohort of pediatric and adult patients with unexplained mitochondrial dysfunction. *Mitochondrion*. 2019 Jul;47:309-317. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2019.02.006>
- (10) Borges V, Isidro J, Cortes-Martins H, et al.; Portuguese network for SARS-CoV-2 genomics, Gomes JP. Massive dissemination of a SARS-CoV-2 Spike Y839 variant in Portugal. *Emerg Microbes Infect*. 2020 Dec;9(1):2488-2496. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1844552>
- (11) Silva C, Machado M, Ferrão J, et al. Whole human genome 5'-mC methylation analysis using long read nanopore sequencing. *bioRxiv* 2021.05.20.444035 (preprint). <https://doi.org/10.1101/2021.05.20.444035>



## ficha técnica\_

**\_Título:** Boletim Epidemiológico Observações

**\_Periodicidade:** Quadrimestral

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

**\_Numeração:** 2.ª série

Volume 11, número 31  
janeiro-abril 2022

**\_Diretor**

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

**\_Editores**

Carlos **Matias Dias**, Departamento de Epidemiologia

Elvira **Silvestre**, Biblioteca da Saúde

**\_Conselho Editorial Científico**

Carlos **Matias Dias**, Departamento de Epidemiologia

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

Jorge **Machado**, Departamento de Doenças Infecciosas

Manuela **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**

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

Entidade proprietária:

**Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge**

Sede de redação/editor:

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

**NIPC:** 501427511

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

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

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

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

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