



# Observações

— Boletim Epidemiológico

## sumário\_

### \_Editorial

**Alimentação saudável: a composição dos alimentos nas escolhas dos consumidores** p03

*Healthy diet: food composition in consumer choices*

M. Graça Dias

### \_Artigos breves

#### \_Composição dos alimentos

**1\_ Teor de sal em diferentes categorias de alimentos: a realidade portuguesa comparada com outros países europeus** p05

*Salt content in different food categories: the Portuguese reality compared to other European countries*

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

**2\_ Monitorização do teor de açúcar em alimentos disponíveis no mercado português: contributo para promover uma alimentação saudável** p10

*Monitoring sugar content in foods available in the Portuguese market: contribution to promote healthy eating*

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

**3\_ Análise comparativa do teor de iodo em laticínios e bebidas vegetais consumidas em Portugal** p13

*Comparison of iodine content in dairy products and non-dairy beverages consumed in Portugal*

Inês Delgado, Inês Coelho, Marta Ventura, Sara Rodrigues, Marta Ferreira, José Armando L. da Silva, Isabel Castanheira

**4\_ Teores de vitaminas B1 e B2 em frutos e pescado consumidos pela população portuguesa: contributo para o estudo de dieta total** p17

*Vitamin B1 and B2 content in fruits and fish consumed by the Portuguese population: contribution to the total diet study*

Cristina Flores, Mariana Santos

#### \_Segurança alimentar

**5\_ Teor de nitrato em produtos hortícolas e frutos consumidos ao longo do ano em Portugal** p21

*Nitrate content in vegetables and fruits consumed throughout the year in Portugal*

Rita Laia, Ana Rebelo, Celeste Serra, Elsa Vasco

**6\_ Impacto das alterações climáticas na exposição da população portuguesa a aflatoxinas** p25

*Climate change impact on the Portuguese exposure to aflatoxins*

Ricardo Assunção, Carla Martins, Susana Viegas, Carla Viegas, Lea S. Jakobsen, Sara M. Pires, Paula Alvito

#### \_Doenças não transmissíveis

**7\_ Prevalência de excesso de peso e de obesidade em Portugal: resultados do primeiro Inquérito Nacional de Saúde com Exame Físico (INSEF 2015)** p29

*Prevalence of overweight and obesity in Portugal: results from the First Portuguese Health Examination Survey (INSEF 2015)*

Vânia Gaio, Liliana Antunes, Marta Barreto, Ana Gil, Irina Kislaya, Sónia Namorado, Ana Paula Rodrigues, Ana Santos, Baltazar Nunes, Carlos Matias Dias

**8\_ Desenvolvimento de um ensaio de sequenciação de nova geração para acelerar o diagnóstico molecular das doenças lisossomais de sobrecarga** p34

*Development of a next generation sequencing assay for a prompt molecular diagnosis of lysosomal storage disorders*

Marisa Encarnação, Maria Francisca Coutinho, Lisbeth Silva, Liliana Matos, Diogo Ribeiro, Célia Nogueira, Paulo Gaspar, Laura Vilarinho, Sandra Alves

**9\_ Associação entre variantes genéticas e perfil clínico multi-dimensional de doentes com perturbação do espectro do autismo: uma abordagem integrativa** p38

*Complex associations between genetic variants and clinical profiles in autism spectrum disorder patients: an integrative systems biology approach*

Muhammad Asif, Francisco Couto, Astrid M. Vicente



*Saúde ambiental*

- 10\_ Avaliação preliminar da contaminação da água por pireno, formação de derivados de clorados durante o processo de cloração e toxicidade em células HepG2 p 43  
*Preliminary evaluation of water contamination by pyrene, formation of chlorinate derivatives during water disinfection and toxicity in HepG2 cells*  
Silvia José, Patricia I. Morgado, Luísa Jordão

*Doenças infecciosas*

- 11\_ Caracterização fenotípica de isolados de *Salmonella enterica* recebidos no INSA entre 2014 e 2017 p 49  
*Phenotypic characterization of Salmonella enterica isolates received in INSA between 2014 and 2017*  
Leonor Silveira, Ângela Pista, Jorge Machado

- 12\_ Malária: confirmação laboratorial de casos clínicos suspeitos de infeção por *Plasmodium* sp entre 2010-2017 p 52  
*Malaria: laboratory confirmation of clinical suspected cases of Plasmodium sp. between 2010-2017*  
Tânia Reis, Susana Martins, Idalina Ferreira, Anabela Vilares, Maria João Gargate

*Instrumentos de observação e vigilância epidemiológica*

- 13\_ Rede Médicos-Sentinela Local Almada-Seixal: relato de um ano de experiência p 58  
*Local Medical-Sentinel Network Almada-Seixal: report of one year of experience*  
Ana Paula Rodrigues, Joana Oliveira, Ana Cristina Garcia, Célia Santos, Sandra Lopes

## Alimentação saudável: a composição dos alimentos nas escolhas dos consumidores

### *Healthy diet: food composition in consumer choices*

A associação entre uma alimentação saudável e a prevenção de doenças crónicas tem contribuído para um crescente interesse da população pelos alimentos que ingere, no sentido de obter o seu bem-estar físico, mental e emocional, a curto e a longo prazo. As faltas de recursos, tempo e motivação são frequentemente apontadas como entraves à adoção de práticas alimentares que permitem obter uma melhor qualidade de vida. No entanto, perante a multiplicidade de opções que o mercado atual nos oferece, provavelmente a maior dificuldade que o consumidor em geral enfrenta no momento da escolha é a interpretação da informação, quer a nutricional presente na rotulagem, quer a muitas vezes contraditória divulgada nos *media*.

O primeiro princípio fundamental da alimentação está relacionado com as quantidades, que se traduzem em valor energético (vulgarmente designado por calorias). Se consumirmos uma quantidade de alimentos que nos forneçam mais energia do que consumimos, haverá acumulação, que o organismo humano coloca em reserva sob a forma de gordura, conduzindo a um aumento de peso, que por sua vez é um fator de risco de diferentes doenças. Se, pelo contrário, ingerirmos alimentos que nos forneçam menos energia do que a gasta, haverá consumo das reservas, e se a prática se prolongar no tempo, o organismo não terá acesso aos nutrientes em quantidade suficiente para manter o seu equilíbrio, surgindo a médio/longo prazo perturbações na saúde.

O segundo princípio fundamental refere-se à qualidade nutricional dos alimentos ingeridos, isto é, aos nutrientes que fazem parte da sua composição. Produtos hortícolas, frutos, leguminosas e cereais pouco processados são alimentos ricos em compostos bioativos, em nutrientes importantes como fibra, vitaminas, sais minerais, com baixos teores de gordura, sal e açúcar, devendo por isso ser a base da alimentação diária. Alimentos processados com elevados teores de gordura, sal e açúcar deverão ser evitados, sendo por isso muito importante a leitura dos ingredientes descritos na rotulagem. No que se

refere ao açúcar, especial atenção deve ser dada a todos os ingredientes com efeito adoçante para antecipar consequências não intencionais negativas.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda, como objetivos gerais até 2020, o consumo de sal *per capita* próximo de 5 g/dia, de açúcares simples inferior a 50 g/dia e de ácidos gordos *trans* produzidos industrialmente próximo de zero. A nível nacional, o Governo está empenhado em dar prioridade às pessoas, assumindo como fundamental na área da saúde políticas de promoção de uma alimentação saudável. O eixo estratégico das «políticas saudáveis» do Plano Nacional de Saúde (com revisão e extensão a 2020), o Programa Nacional de Promoção da Alimentação Saudável (PNPAS) da Direção-Geral da Saúde (DGS), e, mais recentemente, a Estratégia Integrada para a Promoção da Alimentação Saudável (EIPAS), aprovada pelo Despacho n.º 11418/2017, de 29 de dezembro, que funciona de forma articulada como o PNPAS, são exemplos de iniciativas que visam a melhoria da situação alimentar e nutricional em Portugal.

Na EIPAS, que envolve vários Ministérios, nomeadamente o da Saúde, bem como os diferentes parceiros intervenientes no setor da alimentação numa abordagem integrada da «saúde em todas as políticas» recomendada pela OMS, é definido no primeiro dos seus quatro eixos estratégicos: “*modificar o meio ambiente onde as pessoas escolhem e compram alimentos através da modificação da disponibilidade de alimentos em certos espaços físicos e da promoção da reformulação de determinadas categorias de alimentos*”, promovendo a melhoria da composição dos alimentos disponíveis ao consumidor, particularmente quanto aos seus teores de sal, açúcar e ácidos gordos *trans*. Neste contexto a DGS, o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), a Associação Portuguesa de Empresas de Distribuição (APED), e a Federação das Indústrias Portuguesas Agro-Alimentares (FIPA) estão envolvidos num protocolo de colaboração no âmbito da promoção articulada da auto-reformulação destes nutrientes nas categorias de produtos alimentares (embalados) que mais contribuem para a sua ingestão.

Figura 1: Tabela da Composição de Alimentos



A Tabela da Composição de Alimentos (figura 1) e as ferramentas a ela associadas, a Roda dos Alimentos (figura 2), a Roda da Alimentação Mediterrânica (figura 3) e a informação contida na rotulagem são instrumentos que permitem aos consumidores fazer escolhas informadas de alimentos saudáveis, quer do ponto de vista quantitativo quer qualitativo.

Regimes alimentares específicos, tais como, sem glúten ou sem lactose, deverão apenas ser adotados por indivíduos alérgicos ou intolerantes àqueles componentes, sendo mesmo desaconselhados para quem não sofre destas patologias.

Para além do leite materno nos primeiros meses de vida dos bebés, nenhum alimento único contém todos os nutrientes necessários para manter o corpo humano saudável. Uma alimentação variada e em quantidade adequada, com alimentos com baixo teor de açúcar, sal e gorduras *trans*, é a chave para uma ingestão adequada dos nutrientes necessários ao organismo, sendo que por outro lado a diversidade minimiza a ingestão de contaminantes. Na escolha dos alimentos devem ser privilegiados os alimentos de proximidade e da estação, contribuindo para um menor processamento e diminuição das pegadas ecológica, hídrica e de carbono.

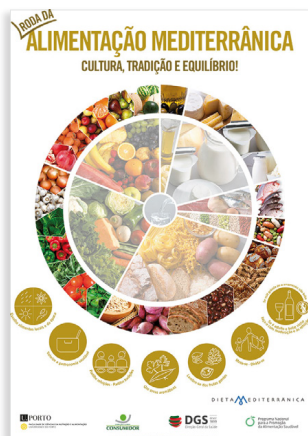
Figura 2: Roda dos Alimentos



Maria da Graça Dias

Coordenadora da Unidade de Observação e Vigilância  
Departamento de Alimentação e Nutrição  
Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP

Figura 3: Roda da Alimentação Mediterrânica



## Teor de sal em diferentes categorias de alimentos: a realidade nacional comparada com outros países europeus

### Salt content in different food categories: the Portuguese reality compared to other European countries

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

roberto.brazao@insa.min-saude.pt

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

#### \_Resumo

As doenças cardiovasculares (DCVs) são a principal causa de morte e de incapacidades em Portugal e no mundo, sendo aos hábitos alimentares inadequados um dos principais fatores responsáveis por esta realidade. O consumo excessivo de sal tem sido diretamente associado ao desenvolvimento da hipertensão arterial e, por conseguinte, de DCVs, tendo, por isso, conduzido à implementação de várias medidas, a nível global, que visam garantir a sua redução progressiva, como forma de prevenção e controlo destas doenças crónicas. A nível nacional, o Governo definiu e aprovou a Estratégia Integrada para a Promoção da Alimentação Saudável (EIPAS), com o objetivo de promover e incentivar o consumo de alimentos enquadrados num padrão alimentar saudável, apostando sobretudo na redução significativa do consumo diário excessivo de sal, açúcar e gordura (ácidos gordos *trans*), para ir de encontro aos níveis recomendados pela Organização Mundial da Saúde. O Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge efetua a avaliação do teor de sal em alimentos e, neste contexto, procedeu à sua monitorização em alimentos disponíveis no mercado nacional, fazendo também, para comparação, o levantamento *online* do teor de sal em alimentos de outros países europeus. As categorias estudadas - sopa, fiambre, queijo e tostas - apresentaram no mercado português, teores médios de sal, em g/100 g, de 0,61; 2,3; 2,6 e 1,2 respetivamente, exigindo um esforço conjunto de todas as partes envolvidas para se atingir a meta geral de 0,3 g de sal por 100 g de alimento (0,2 g/100 g para a sopa) definida na EIPAS para 2020.

#### \_Abstract

Cardiovascular diseases (CVDs) are the leading cause of death and disability in Portugal and in the World, with inadequate dietary habits being one of the main factors responsible for this reality. Excessive salt intake has been directly associated with the development of arterial hypertension and, consequently, of CVDs having led, therefore, to the implementation of several measures, at a global level, aimed at ensuring its progressive reduction, as a form of prevention and control of these chronic diseases. At national level, the Government defined and approved the Integrated Strategy for the Promotion of Healthy Eating (EIPAS), with the objective of promoting and encouraging the consumption of foods in a healthy dietary pattern, in particular focusing on the significant reduction of daily excessive salt, sugar and fat (*trans fatty acids*) consumption, to meet the levels recommended by the World Health Organization. The Food and Nutrition Department of the National Institute of Health Dr Ricardo Jorge assess the salt content in food and, in this context, has monitored several foods available in the national market also making, for comparison, an online compilation of the salt content in foods from other European countries. The food categories studied: soup,

ham, cheese and toasts; presented in the Portuguese market the average salt content, in g/100 g, of 0,61; 2,3; 2,6 and 1,2 respectively, requiring a joint effort of all parties involved to achieve the overall target of 0.3 g/100 g (0.2 g/100 g for soup) defined in EIPAS for 2020.

#### \_Introdução

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte em todo o mundo, tirando a vida a 17,7 milhões de pessoas anualmente, o que corresponde a 31% do total de mortes registadas <sup>(1)</sup> e uma das mais importantes causas de morbilidade, com a consequente perda de anos de vida saudável <sup>(2)</sup>.

O consumo excessivo de sal é um importante fator de risco para o desenvolvimento da hipertensão arterial e consequentemente para o aparecimento de doenças cardiovasculares e de outros problemas de saúde <sup>(3)</sup>, sendo urgente alterar esse comportamento. Como medida de prevenção de doenças crónicas, obtenção de ganhos em saúde e promoção de uma alimentação saudável, a Organização Mundial da Saúde (OMS) definiu o objetivo de reduzir o consumo diário de sal pela população em 30% até 2025, estabelecendo com os países-membros o compromisso de atingirem em 2020 uma ingestão média diária igual ou inferior a 5 g.

Em Portugal, segundo dados recentes do Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física (IAN-AF) <sup>(4)</sup>, o consumo médio diário é de 7,3 g de sal, sendo que 66% das mulheres e 86% dos homens apresentam um nível de ingestão superior a 5 g. O pão e as tostas (18%), os produtos de charcutaria (8%) e as sopas (7%) são os produtos alimentares que mais contribuem para essa ingestão.

Face a esta realidade nacional, foi aprovada a Estratégia Integrada para a Promoção da Alimentação Saudável (EIPAS) (5), que tem, entre outras, a ambição de obter uma redução significativa e sustentável do consumo excessivo de sal, açúcar e gordura (ácidos gordos *trans*) pela população portuguesa. Relativamente ao sal foram definidas diversas medidas, de onde se destacam: i) monitorização do teor de sal em diferentes categorias de alimentos; ii) promoção da adequação dos perfis nutricionais, nomeadamente em relação à quantidade de sal: para os produtos alimentares é pretendido que o valor não seja superior a 0,3 g de sal por 100 g ou 100 ml; para sopas e prato de refeição foi definido que a quantidade de sal presente deve ser inferior ao valor de referência de 0,2 g de sal por 100 g de alimento.

Neste contexto, o Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) procedeu à monitorização do teor de sal em produtos alimentares, de diversas categorias, disponíveis no mercado nacional e em mercados de outros países europeus, para caracterização da realidade atual e monitorização futura.

### \_Objetivos

Compilar, analisar e comparar o teor de sal em diferentes categorias de alimentos comercializados no mercado português e em mercados de outros países europeus, para conhecimento da realidade nacional atual e comparada entre países. Pretende-se apoiar as autoridades de saúde e os parceiros do setor da alimentação na definição e concretização das estratégias e medidas que visem a redução significativa do consumo excessivo de sal pela população portuguesa, de encontro às metas estabelecidas pela OMS e pela EIPAS até 2020.

### \_Material e métodos

Procedeu-se à compilação e avaliação do teor de sal presente em quatro categorias de alimentos - sopa, fiambre, queijo e tostas - comercializados em Portugal e em outros países europeus. Os dados recolhidos foram obtidos a partir de bases de dados de composição de alimentos (BDCA) da rede europeia do *European Food Information Resource Network* (EuroFIR); de determinações analíticas realizadas nos labora-

tórios do INSA no âmbito do projeto Estudos de Dieta Total (TDS, na sigla inglês); diretamente da declaração nutricional presente nos rótulos dos alimentos em estudo (rotulagem) e/ou da informação nutricional *online* disponível nos *sites* dos operadores do retalho alimentar, nacionais e estrangeiros.

Os países europeus considerados correspondem ao local onde os alimentos são comercializados e não onde são produzidos e a sua seleção foi determinada, sobretudo, pela existência de recomendações específicas sobre a redução do consumo de sal no país e, também, pela facilidade de obtenção dos dados necessários.

### \_Resultados e discussão

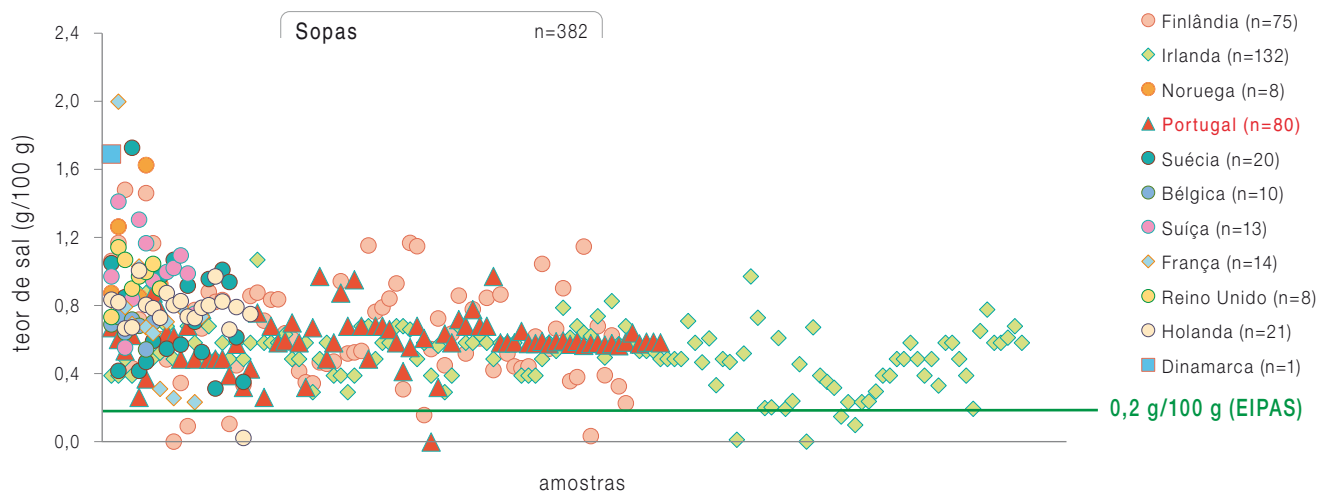
Apresenta-se nos [gráficos 1-4](#) os dados relativos à quantidade de sal presente em sopas prontas para consumo, fiambres (porco, frango e peru), queijos (flamengo, fresco, mozzarella, creme, etc.) e tostas (de diferentes tipos de cereais, normais e integrais), por país de comercialização dos mesmos, conjuntamente com algumas estatísticas.

Relativamente às sopas ([gráfico 1](#)), no total das 382 sopas consideradas, o teor de sal variou entre 0,0 g e 2,05 g por 100 g. Em termos médios, a Irlanda (0,53 g/100 g) e Portugal (0,61 g/100 g) são os países que comercializam sopas com teores de sal mais baixos.

Somente 4 sopas apresentam uma quantidade de sal inferior ao valor de referência da EIPAS para 2020 – de 0,2 g/100 g de alimento – sendo que 3 apresentam um teor de sal de 0,0 g/100 g (Finlândia, Irlanda e Portugal) e 1 tem um teor de 0,2 g/100 g (Irlanda). Alguns dos valores compilados neste estudo são autorreportados pelos operadores do setor alimentar, pelo que a análise dos mesmos deve ser realizada com prudência. Por exemplo, os referidos teores de 0,0 g de sal por 100 g de sopa necessitam de confirmação, dado parecer não considerar o sódio naturalmente presente nos ingredientes.

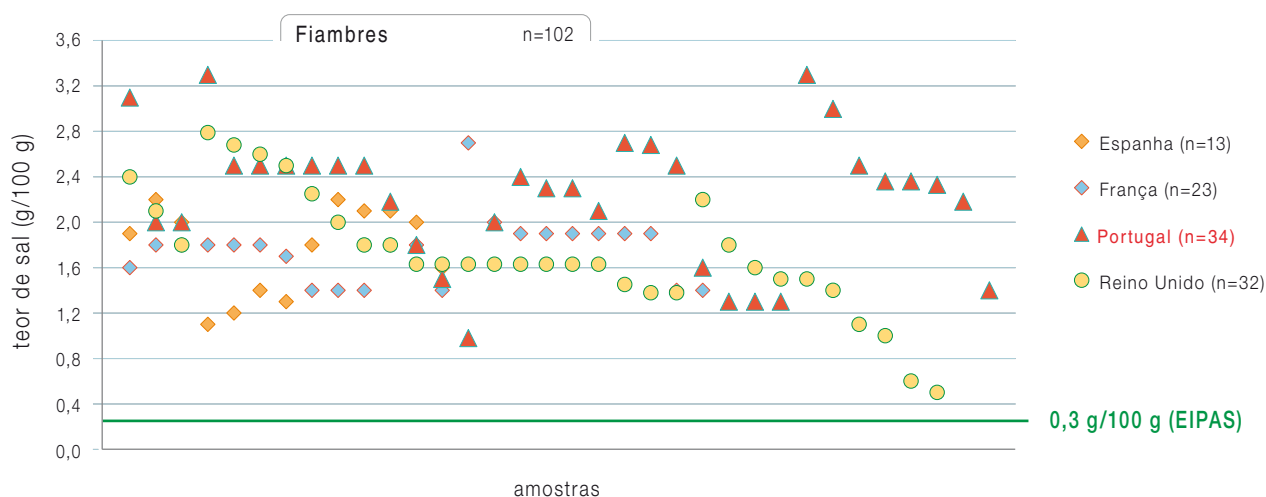
Considerando a mediana dos valores nacionais, para atingir os valores de referência da EIPAS é necessário garantir uma redução do teor de sal de 80% até 2020, o que corresponde a uma redução média anual de 0,13 g/100 g de sopa.

Gráfico 1: Teores de sal em sopas prontas para consumo, comercializadas em diferentes países europeus.



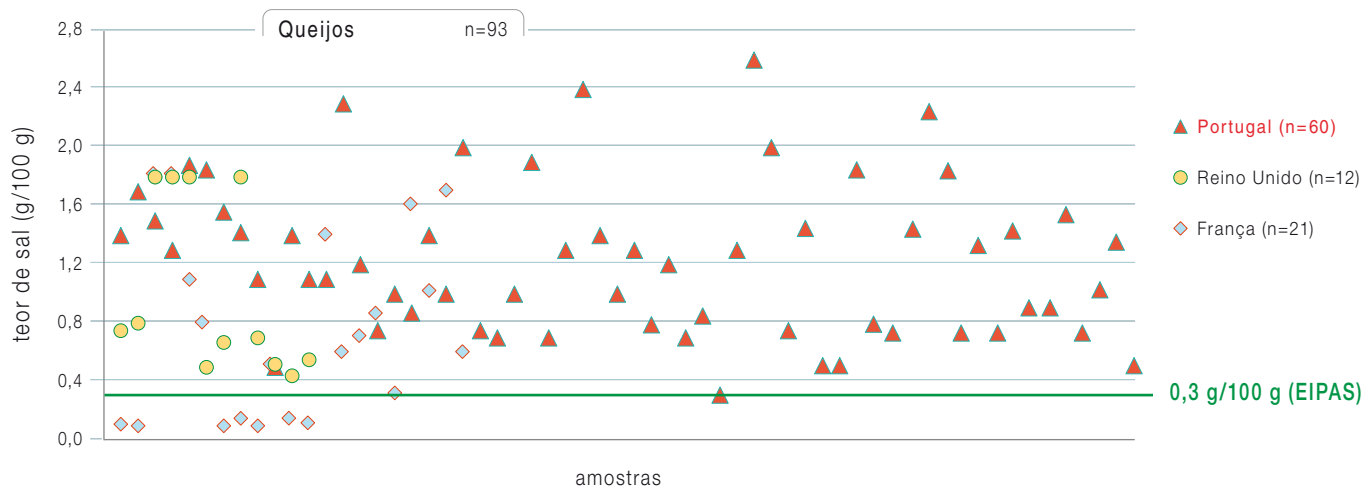
Sal em sopas (g/100 g)	Finlândia (n=75)	Irlanda (n=105)	Noruega (n=8)	Portugal (n=80)	Suécia (n=20)	Bélgica (n=10)	Suíça (n=13)	França (n=14)	Reino Unido (n=8)	Holanda (n=21)	Dinamarca (n=1)
Máximo	1,52	1,10	1,67	<b>1,00</b>	1,78	0,75	1,45	2,05	1,18	1,04	1,74
Mínimo	0,00	0,00	0,70	<b>0,00</b>	0,32	0,27	0,57	0,24	0,76	0,03	1,74
Média	0,67	0,53	1,03	<b>0,61</b>	0,77	0,63	1,02	0,77	1,00	0,78	1,74
Mediana	0,64	0,54	0,93	<b>0,60</b>	0,68	0,70	1,02	0,74	1,01	0,82	1,74
Desvio padrão	0,32	0,18	0,31	<b>0,16</b>	0,35	0,15	0,23	0,44	0,13	0,19	---

Gráfico 2: Teores de sal fiambres, comercializados em diferentes países europeus.



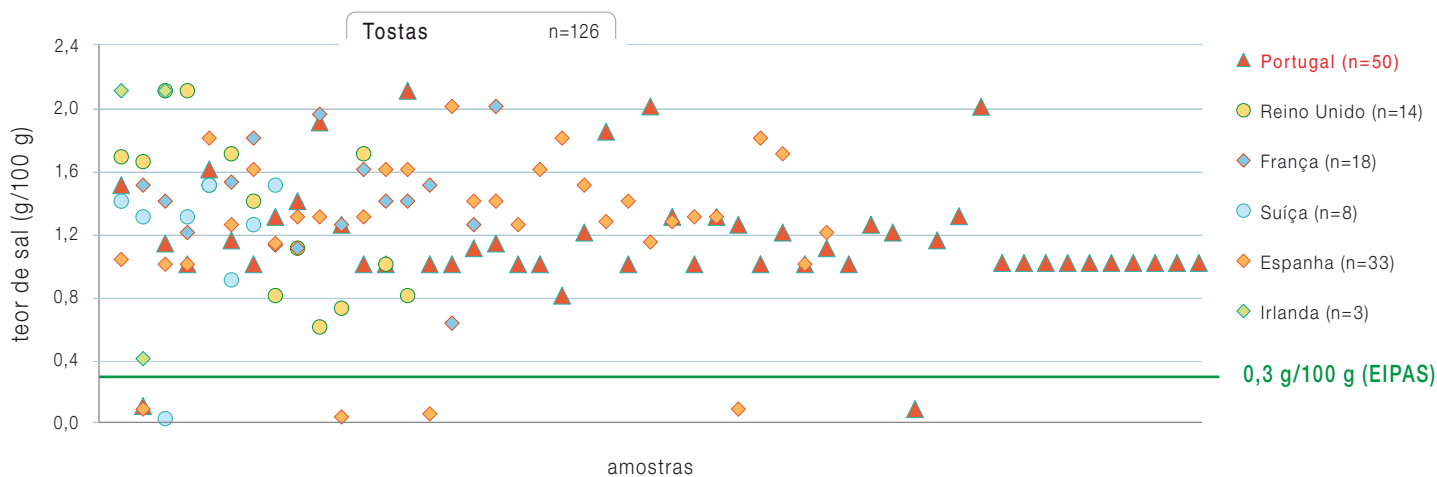
Sal em fiambres (g/100 g)	Espanha (n=13)	França (n=23)	Portugal (n=34)	Reino Unido (n=32)
Máximo	3,00	2,70	<b>3,30</b>	2,79
Mínimo	1,10	1,40	<b>0,98</b>	0,50
Média	1,76	1,76	<b>2,25</b>	1,72
Mediana	1,90	1,80	<b>2,40</b>	1,63
Desvio padrão	0,39	0,29	<b>0,60</b>	0,54

Gráfico 3: Teores de sal em queijos, comercializados em diferentes países europeus.



Sal em queijos (g/100 g)	Portugal (n=60)	Reino Unido (n=12)	França (n=21)
Máximo	2,60	1,80	1,80
Mínimo	0,31	0,44	0,10
Média	1,22	1,01	0,74
Mediana	1,20	0,73	0,60
Desvio padrão	0,52	0,59	0,62

Gráfico 4: Teores de sal e respetivas estatísticas em tostas, comercializadas em diferentes países europeus.



Sal em tostas (g/100 g)	Portugal (n=50)	Reino Unido (n=14)	França (n=18)	Suíça (n=8)	Espanha (n=33)	Irlanda (n=3)
Máximo	2,10	2,10	2,00	1,50	2,00	2,10
Mínimo	0,08	0,60	0,63	0,02	0,03	0,40
Média	1,15	1,35	1,42	1,15	1,23	1,53
Mediana	1,00	1,45	1,40	1,30	1,30	2,10
Desvio padrão	0,37	0,51	0,32	0,49	0,51	0,98

Nos fiambres (**gráfico 2**), num total de 102 dados compilados, os valores variam entre 0,5 g/100 g (Reino Unido) e 3,3 g/100 g (Portugal). Em termos médios, Portugal apresenta nos fiambres o teor de sal mais elevado (2,25 g/100 g).

Nenhum fiambre apresenta um teor de sal inferior ao valor de referência da EIPAS – de 0,3 g/100 g. Considerando a mediana dos valores nacionais, a redução em Portugal deverá ser de 87,5% até 2020, equivalente a uma redução média anual de 0,7 g de sal por 100 g.

Em relação aos queijos (**gráfico 3**), foram compilados 93 dados, sendo que os teores de sal variam de 0,1 g/100 g (França) a 2,6 g/100 g (Portugal). Em termos médios, é novamente o mercado português que se caracteriza por comercializar queijos com maior quantidade de sal por 100 g (1,22 g).

Do total de dados recolhidos apenas 2 queijos têm um teor de sal inferior a 0,3 g/100 g – valor de referência da EIPAS. Se considerarmos a mediana dos valores para Portugal, de 1,20 g/100 g, o objetivo estabelecido pela EIPAS só será alcançado se for garantida uma redução do teor de sal de 75% até 2020, correspondente a uma redução média anual de 0,3 g/100 g.

Finalmente, no que se refere às tostas (**gráfico 4**) foram compilados 126 dados, variando entre um valor mínimo de 0,2 g/100 g (Espanha) e um valor máximo de 2,1 g/100 g (Portugal, Reino Unido e Irlanda).

Em termos médios, é em Portugal e na Suíça que se comercializam as tostas com menor quantidade de sal por 100 g (1,15 g) e, por outro lado, é na Irlanda que esse teor médio é mais elevado (1,53 g/100 g).

Apenas 2 tostas apresentam um teor de sal igual ou inferior ao valor de referência da EIPAS – de 0,3 g/100 g – que são comercializadas nos mercados suíço (0,2 g/100 g) e espanhol (0,3 g/100 g). Considerando a mediana dos valores em Portugal, estes produtos deverão sofrer uma redução do teor de sal presente de 70% até 2020, o que corresponde a uma redução média anual de 0,23 g/100 g.

## \_Conclusões

A monitorização dos teores de sal nas diferentes categorias de alimentos em estudo permite conhecer a realidade atual, contribuir para a definição de estratégias para sua redução e acompanhar a evolução dos mesmos até 2020.

Em termos gerais, verifica-se que Portugal e os países europeus avaliados apresentam elevadas quantidades de sal nos géneros alimentícios considerados, sendo ínfimo o número de valores que são iguais ou inferiores aos valores de referência da EIPAS, de 0,2 g de sal por 100 g de alimento, para as sopas, e de 0,3 g por 100 g para os fiambres, queijos e tostas.

Considerando a recomendação da Organização Mundial da Saúde, de um consumo diário de sal *per capita* próximo de 5 g em 2020, e tendo em linha de conta o contributo das categorias analisadas para a ingestão de sal em Portugal, é fundamental intervir junto dos consumidores e da indústria, nomeadamente para que se proceda reformulação nutricional destes produtos alimentares, estabelecendo prioridades de acordo com as quotas de mercado, como forma de promoção de uma alimentação mais saudável e de prevenção da doença e promoção da saúde.

### Referências bibliográficas:

- (1) World Health Organization. Cardiovascular disease [Em linha]. [consult. 15/6/2018]. Disponível em: [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/en/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/)
- (2) Direção-Geral da Saúde. Programa Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável. Juntos Contra o Sal [Em linha]. [consult. 15/6/2018]. Disponível em: <https://www.dgs.pt/em-destaque/juntos-contr-o-sal.aspx>
- (3) Direção-Geral da Saúde. Programa Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável. Alimentação Saudável: Sal [Em linha]. [consult. 15/6/2018]. Disponível em: <http://www.alimentacaosaudavel.dgs.pt/nutriente/sal/>
- (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/resultados>
- (5) Despacho n.º 11418/2017. DR 2ª série de 2017-12-29, n.º 249:29595-8. Aprova a Estratégia Integrada para a Promoção da Alimentação Saudável (EIPAS). <https://dre.pt/pesquisa/-/search/114424591/details/normal?l=1>

## Monitorização do teor de açúcar em alimentos disponíveis no mercado português: contributo para promover uma alimentação saudável

*Monitoring sugar content in foods available in the Portuguese market: contribution to promote healthy eating*

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

andreia.vargues@insa.min-saude.pt

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

### \_Resumo

O excesso de peso e a obesidade representam um grave problema de saúde pública, que afeta mais de metade da população mundial e que tem enormes implicações no aparecimento de diversas doenças crónicas, nomeadamente diabetes e doenças cérebro-cardiovasculares. Estudos científicos têm evidenciado a associação do consumo excessivo de açúcar ao desenvolvimento da obesidade e da diabetes tipo 2. Neste âmbito, o Governo português aprovou uma 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. O Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Laboratório Nacional de Referência e parceiro estratégico na implementação da EIPAS, através do seu Departamento de Alimentação e Nutrição, procedeu à monitorização do teor de açúcar em cereais de pequeno-almoço e iogurtes (sólidos e líquidos), disponíveis no mercado português. Estas categorias apresentaram medianas de teor de açúcar de 22,0 g; 12,0 g e 12,1 g, por 100 g (por 100 mL, no caso dos iogurtes líquidos), respetivamente, o que evidencia a necessidade de intervir junto dos operadores económicos e consumidores, para se garantir uma redução para os valores definidos na EIPAS, 5 g/100 g para alimentos sólidos e 2,5 g/100 mL para os líquidos.

### \_Abstract

Overweight and obesity represent a serious public health problem, which affects more than half the world's population and has enormous implications for the emergence of various chronic diseases, including diabetes, cerebrovascular diseases. Scientific studies have related excessive sugar intake with the development of obesity. In this context, Portuguese Government approved an Integrated Strategy for the Promotion of Healthy Eating (EIPAS), based on the promotion of a healthy eating pattern that, among other objectives, aims at a progressive reduction of daily sugar consumption. The National Institute of Health Dr Ricardo Jorge, National Reference Laboratory and strategic partner in the EIPAS implementation, through its Department of Food and Nutrition, monitored the sugar content in breakfast cereals and yoghurts (solids and liquids) available in the Portuguese market. The categories studied presented medians with a sugar content of 22.0 g; 12.0 g and 12.1 g, per 100 g (or 100 mL, for liquids), respectively, which evidences the need to intervene with economic operators and consumers in order to guarantee an effective reduction for the values defined in EIPAS, for 5 g/100 g for solid foods and 2.5 g/100 ml for liquids.

### \_Introdução

Atualmente, os hábitos alimentares inadequados da população portuguesa são o fator de risco que mais contribui para o total de anos de vida saudável perdidos (15,8%), e um determinante importante de diversas doenças crónicas, representando estas 86% da carga de doença no nosso sistema de saúde (1). O excesso de peso, a obesidade, a diabetes, as doenças cardiovasculares, as desordens músculo-esqueléticas e diversos tipos de cancro lideram, nacional e mundialmente, as principais causas de morte e de incapacidade.

Para inverter o aumento em prevalência e significado deste tipo de doenças, a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Comissão Europeia recomendam que as estratégias nacionais de alimentação e nutrição devem assentar numa abordagem de intervenção multissetorial, designadamente com o objetivo de modificar a oferta alimentar de determinados alimentos, nomeadamente os que apresentam elevado teor de açúcar; incentivar ações de reformulação nutricional dos produtos alimentares através de uma ação articulada com a indústria alimentar; capacitar os cidadãos e profissionais que trabalham ou influenciam o consumo de alimentos para as escolhas alimentares saudáveis.

A estratégia nacional para a promoção da alimentação saudável (EIPAS), baseia-se na premissa de que todos devem contribuir para a criação de ambientes promotores da saúde e do bem-estar das populações e preconiza entre outras medidas a monitorização do teor de açúcar nas seguintes categorias de alimentos: bebidas não alcoólicas, laticínios, bolachas e sobremesas doces, produtos de pastelaria, cereais de pequeno-almoço, refeições prontas a consumir, molhos, gelados e fruta em conserva e a promoção de iniciativas que

permitam sensibilizar a população relativamente ao impacto na saúde do consumo excessivo de açúcar (2).

No que se refere ao açúcar, a EIPAS pretende contribuir para que o consumo diário de açúcar simples, em 2020, se aproxime de 50 g/dia e um máximo de 25 g/dia em menores de idade, através da reformulação das categorias de alimentos que mais contribuem para a sua ingestão.

Nesse sentido, as recomendações da EIPAS para o teor de açúcar são 5 g/100 g para alimentos sólidos e 2,5 g/100 mL para os líquidos.

Em articulação com os objetivos da EIPAS monitorizou-se o teor de açúcar nas categorias de alimentos cereais de pequeno-almoço e iogurtes (sólidos e líquidos), disponíveis no mercado português.

### \_Objetivo

Monitorizar o teor de açúcar em determinadas categorias de alimentos disponíveis no mercado português para apoiar as autoridades de saúde na discussão e definição dos planos de reformulação da composição dos produtos alimentares, a realizar com as entidades do setor, com vista atingir as metas preconizadas para 2020, pela EIPAS.

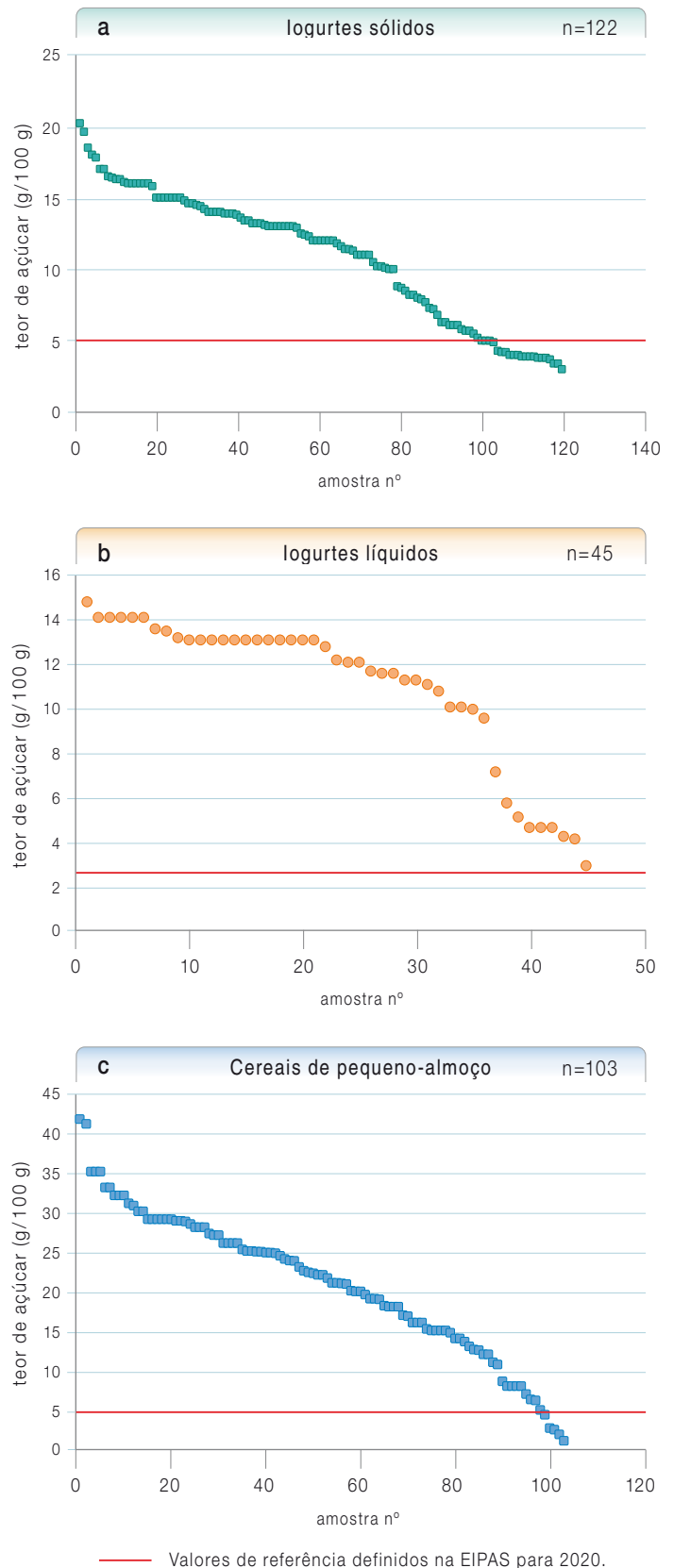
### \_Materiais e métodos

O teor de açúcar foi avaliado nas categorias alimentares, cereais de pequeno-almoço e iogurtes (sólidos e líquidos). Os dados foram recolhidos através dos rótulos disponibilizados eletronicamente pelas maiores cadeias de supermercados a operar no mercado português assim como através da Tabela da Composição de Alimentos (3). Os valores extraídos foram comparados com as recomendações definidas na EIPAS para 2020 para o teor de açúcar: 5 g/100 g para alimentos sólidos e 2,5 g/100 mL para os líquidos.

### \_ Resultados e discussão

Os resultados obtidos apresentam-se no gráfico 1, respetivamente para os iogurtes sólidos, iogurtes líquidos e cereais de pequeno-almoço.

Gráfico 1: ↓ Teor de açúcar em iogurtes sólidos (a) e líquidos (b) e em cereais de pequeno-almoço (c).



Numa amostra de 167 iogurtes (**gráfico 1a-b**) (122 sólidos e 45 líquidos), verificou-se que 22 iogurtes sólidos cumprem os valores estabelecidos na EIPAS para 2020. No que respeita os iogurtes líquidos, nenhum cumpre esses valores. As medianas do teor de açúcar nos iogurtes sólidos e líquidos correspondem a 12,0 g/100 g e 12,1 g/100 mL, o que implicaria por parte da indústria uma redução média anual de 2,3 g/100 g e 3,2 g/100 mL, respetivamente, sendo que nestas categorias terá que se ter em consideração a presença natural de açúcar, sob a forma de lactose.

Numa amostra de 103 cereais de pequeno-almoço (**gráfico 1c**), verificou-se que 6 cumprem a recomendação preconizada para 2020. Para este grupo de alimentos a mediana é 22 g/100 g, o que implicaria por parte da indústria uma redução média anual de 5,7 g/100 g, para atingir o objetivo geral estabelecido para 2020. Nesta amostra, os cereais que cumprem os valores estabelecidos para 2020, correspondem a flocos de milho e integrais.

### **\_Conclusão**

O reduzido número de cereais de pequeno-almoço e iogurtes com teor de açúcar inferior a 5 g/100 g (ou 2,5 g/100 mL, para os líquidos) evidencia e necessidade de intervir junto dos operadores económicos e dos consumidores, para se obter uma redução gradual e efetiva do consumo de açúcar pela população portuguesa, até 2020.

O facto de serem alimentos frequentemente consumidos por crianças poderá reforçar a necessidade de intervenção nestas categorias de alimentos.

Outras categorias de alimentos que contribuem para o elevado consumo de açúcar em Portugal serão alvo de estudo. Os valores obtidos deverão ser combinados com o consumo pela população e as quotas de mercado para o estabelecimento das prioridades de intervenção.

### **Referências bibliográficas:**

- (1) Direção-Geral da Saúde, Direção de Serviços de Informação e Análise. A Saúde dos Portugueses 2016. Lisboa: DGS, 2017. <https://comum.rcaap.pt/handle/10400.26/18278>
- (2) Despacho n.º 11418/2017. DR 2ª série de 2017-12-29, n.º 249:29595-8. Aprova a Estratégia Integrada para a Promoção da Alimentação Saudável (EIPAS). <https://dre.pt/pesquisa/-/search/114424591/details/normal?l=1>
- (3) Departamento de Alimentação e Nutrição. Tabela da Composição de Alimentos - Versão 2.0 [Em linha]. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2015. <http://portfir.insa.pt/foodcomp/introduction>

## Análise comparativa do teor de iodo em laticínios e bebidas vegetais consumidas em Portugal

### Comparison of iodine content in dairy products and non-dairy beverages consumed in Portugal

Inês Delgado<sup>1,2</sup>, Inês Coelho<sup>1,2</sup>, Marta Ventura<sup>1,3</sup>, Sara Rodrigues<sup>4</sup>, Marta Ferreira<sup>4</sup>, José Armando L. da Silva<sup>5</sup>, Isabel Castanheira<sup>1</sup>

ines.delgado@insa.min-saude.pt

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

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

(3) Marine and Environmental Sciences Centre, Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Costa da Caparica, Portugal.

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

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

#### Resumo

Os laticínios pertencem ao grupo de alimentos com maior teor de iodo. Atualmente, cada vez mais a população portuguesa está a substituir os laticínios por bebidas vegetais. Como estas bebidas têm geralmente teores de iodo baixo, leva-nos a uma preocupação acrescida sobre o impacto desta popularidade das bebidas vegetais nas necessidades de iodo nos consumidores. O iodo é um micronutriente essencial para a síntese das hormonas da tiroide, presente em pequenas quantidades no corpo humano. O principal objetivo deste trabalho foi a determinação de iodo em laticínios e bebidas vegetais consumidas em Portugal. A metodologia escolhida para a quantificação deste nutriente foi a espectrometria de massa acoplada a plasma indutivo (ICP-MS) precedida por extração em meio básico com placa de aquecimento de grafite. Foram analisadas 41 amostras, 15 leites, 20 iogurtes e 6 bebidas vegetais comercializadas por marcas de grande aceitação pela população portuguesa. Verificou-se que os iogurtes apresentavam maiores concentrações de iodo, seguido do leite e por fim, as bebidas vegetais. Estas apresentaram na sua maioria valores inferiores ao limite de quantificação. Estes resultados levam-nos a concluir que as populações com dietas restritas em laticínios (intolerância à lactose, alergia à proteína do leite ou *vegans*) poderão ter um risco acrescido de uma ingestão inadequada em iodo.

#### Abstract

Dairy products belong to the food group with higher iodine content. Nowadays, the Portuguese population is increasingly replacing dairy products for non-dairy beverages. As these beverages are generally low in iodine content, it leads to an impact on iodine status in consumers due to an increased popularity of non-dairy beverages. Iodine is an essential micronutrient for the synthesis of thyroid hormones, present in small amounts in the human body. The main objective of this work was the determination of iodine in dairy products and non-dairy beverages consumed in Portugal. The methodology for the quantification of this nutrient was inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) preceded by basic extraction in graphite heating block. We analysed 41 samples, 15 milks, 20 yoghurts and 6 non-dairy beverages marketed by brands of great acceptance by the Portuguese population. Yoghurts had higher iodine concentrations, followed by milk and finally non-dairy beverages. Most of non-dairy beverages presented values below the limit of quantification. Therefore, populations with restricted diets in dairy products (lactose intolerance, milk protein allergy or *vegans*) may lead to an inadequate intake of iodine.

#### Introdução

O iodo é indispensável para a saúde, pois é necessário na síntese, sendo parte da estrutura química, de hormonas tiroideias (1). Estas são fundamentais para o desenvolvimento de vários órgãos, com especial importância para o cérebro, para o crescimento das crianças e para regular funções tão importantes como a frequência cardíaca e temperatura corporal. A deficiência em iodo é a causa mais comum da deficiência cognitiva. A deficiência crónica de iodo pode levar a distúrbios que incluem deficiência mental e formação de bócio (disfunção da tiroide), um aumento da glândula tiroide que implica uma produção inadequada de hormonas da tiroide (2). A Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA, na sigla inglês) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceram 150 µg por dia como a dose diária recomendada de ingestão de iodo para adultos saudáveis, enquanto que para crianças e mulheres grávidas ou lactentes é, respetivamente, 120 µg por dia e 200 µg por dia (3,4).

Os alimentos são a maior fonte natural de iodo, em virtude de não ser produzido pelo organismo. Os laticínios pertencem os grupos de alimentos que mais contribuem para a ingestão diária de iodo (5). Diversos trabalhos publicados sobre a quantificação de iodo nos laticínios estimam uma contribuição entre 25% e 70% da dose diária recomendada (DDR) (6). Nos dias de hoje, muitas pessoas com dietas restritas estão a substituir os laticínios por bebidas vegetais. Algumas das razões são a alergia à proteína do leite, a intolerância à lactose e a dietas *vegans*. Fazendo uma análise

combinada com o teor de iodo e com os dados de consumo, pode-se afirmar que a principal fonte de iodo, atualmente, é o leite e alguns laticínios (7). Como o leite é uma fonte tão importante de iodo na dieta, e tem vindo a sofrer um declínio no seu consumo ao ser substituído por bebidas vegetais, levantou-se uma preocupação acrescida sobre a ingestão de iodo por este grupo de pessoas consumidoras apenas de bebidas vegetais (8).

### \_Objetivo

O principal objetivo deste trabalho foi a determinação de iodo em laticínios e bebidas vegetais consumidas em Portugal.

### \_Materiais e métodos

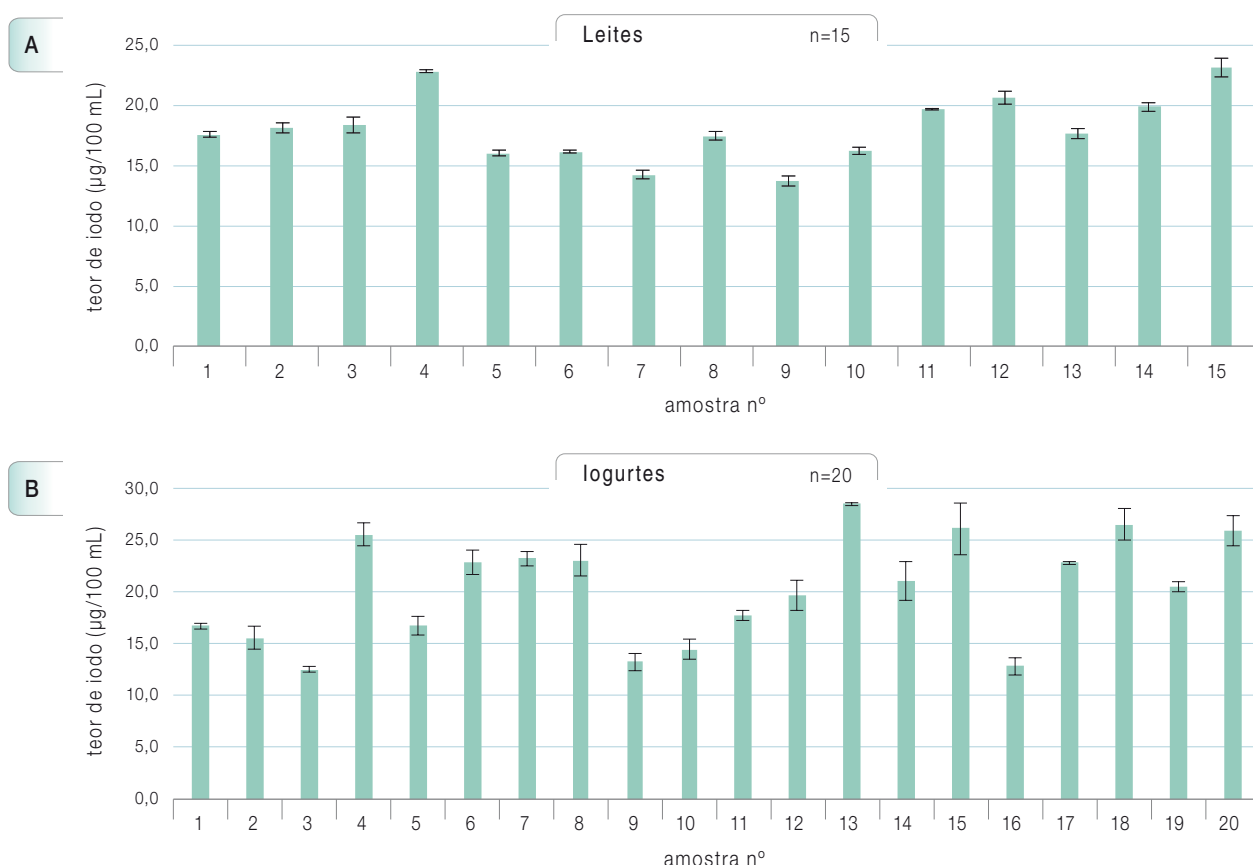
Foram selecionadas amostras de leite meio gordo, iogurte natural sólido e bebidas vegetais (soja, arroz, coco e amêndoa) consumidas em Portugal. Foram analisadas no total 41 amostras, 15 leites, 20 iogurtes e 6 bebidas vegetais recolhidas

entre as marcas de maior aceitação pelo consumidor. O teor de iodo foi determinado por espectrometria de massa com plasma indutivo acoplado (ICP-MS) tendo como referência a norma BS EN 15111:2007 (9). Os resultados foram obtidos em triplicado em condições de garantia da qualidade suportados pelos requisitos descritos na NP EN ISO/IEC 17025:2005 (10). O teor de iodo foi expresso em  $\mu\text{g}$  de iodo por 100 mL de alimento.

### \_Resultados e discussão

No gráfico 1 pode ser observado que a concentração de iodo em leites e iogurtes consumidos em Portugal é bastante similar, 18 e 20  $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ , respetivamente. Foi no iogurte que se observou o teor mais elevado de iodo. Sendo que a amostra de iogurte que apresentou o valor mínimo foi a amostra número 3 ( $13 \pm 0,3 \mu\text{g}/100\text{ mL}$ ) e a marca de iogurte com o valor máximo,  $29 \pm 0,1 \mu\text{g}/100\text{ mL}$ , foi a 13. Alguns autores reportam valores inferiores aos obtidos neste estudo,

Gráfico 1: Teor de iodo em leites (a) e iogurtes (b) consumidos em Portugal, expressos pela média e desvio padrão (n=3).



17 µg/100 mL e 15 µg/100 mL (11,12). Provavelmente diferentes rações para animais ou tratamentos na produção do iogurte podem estar na origem desta diferença.

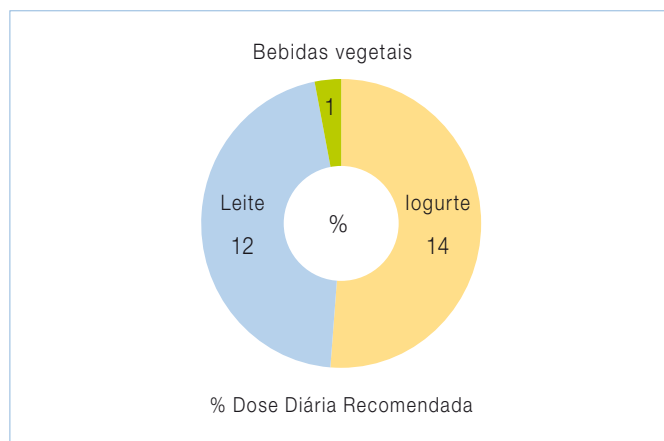
No que respeita aos leites o valor mínimo encontrado foi de  $14 \pm 0,4$  µg/100 mL (amostra 9) e o valor máximo  $23 \pm 0,8$  µg/100 mL (amostra 15). Na literatura foram encontrados resultados similares para leites meio gordo consumidos noutros países, 19 µg/100 mL e 23 µg/100 mL (12,13). Apesar de serem teores de iodo similares aos obtidos neste estudo estas diferenças podem ser causadas por variações geográficas e sazonais (11,14). Diversos autores compararam a concentração de iodo do leite no verão e no inverno, e desde há algum tempo é reconhecido que o teor de iodo varia com as estações do ano, sendo que o leite do verão contém menos iodo do que o leite de inverno (15). Isto pode ser explicado, possivelmente devido às vacas leiteiras terem uma alimentação rica em suplementos, com teores de iodo mais elevados, no inverno do que no verão (16).

Em relação às amostras de bebidas vegetais analisadas, 66,7% destes resultados encontram-se abaixo do limite de quantificação (LQ - 0,6 µg/100 mL), isto é, 4 amostras abaixo do LQ do total de 6 analisadas. O valor médio obtido para o teor de iodo em bebidas vegetais foi de 1,2 µg/100 mL. Estes resultados estão de acordo com a literatura (17), confirmando as preocupações sobre o aporte de iodo nos consumidores deste tipo de bebidas.

Considerando que, para um adulto saudável a dose diária recomendada de iodo é de 150 µg por dia e tendo em conta as porções de 100 mL de alimento calculou-se a contribuição de cada grupo, leites, iogurtes e bebidas vegetais, para a dose diária recomendada.

Como se pode observar no gráfico 2, para pessoas com intolerância à lactose, alérgicas ao leite, ou sob dietas restritivas voluntárias como os veganos, a alternativa aos produtos lácteos pode ser através de bebidas vegetais, mas apenas se estas forem fortificadas com iodo, pois esta fortificação é extremamente necessária para que a ingestão de iodo recomendada possa assegurada. Outros estudos indicam que a

Gráfico 2: Contribuição de cada grupo, leite, iogurte e bebidas vegetais consumidas em Portugal para o aporte diário de iodo, em adultos.



concentração de iodo em bebidas alternativas não fortificadas é 1,7% do conteúdo de iodo em leites, enquanto que bebidas vegetais com fortificação apresentam concentrações de iodo 26% mais baixas do que os leites (17).

### Conclusões

O método analítico foi aplicado com sucesso para determinar o conteúdo de iodo em bebidas lácteas e não lácteas com diferentes teores de iodo. Estes resultados, combinados com dados de consumo, são um contributo para estimar uma ingestão real de iodo na dieta da população portuguesa.

Os iogurtes contribuem mais para suprir a dose diária recomendada de iodo, seguida dos leites e por fim, as bebidas vegetais. Comparando os produtos lácteos com os produtos não lácteos, ou seja, as bebidas vegetais, observou-se uma grande variação no teor de iodo, tendo em conta que as bebidas analisadas não eram fortificadas em iodo, estes apresentavam concentrações muito inferiores às bebidas lácteas.

Os resultados destacam que indivíduos e grupos de população com dietas restritas em produtos lácteos podem ter em risco o aporte diário de iodo. Os resultados estão alinhados com aqueles que defendem a necessidade de caracterização de iodo em alimentos para apoiar campanhas de fortificação dos alimentos em iodo.

**Referências bibliográficas:**

- (1) Limbert E, Prazeres S, São Pedro M, et al. Thyroid Study Group of the Portuguese Endocrine Society. Iodine intake in Portuguese pregnant women: results of a countrywide study. *Eur J Endocrinol.* 2010;163(4):631-5. <https://doi.org/10.1530/EJE-10-0449>
- (2) Rohner F, Zimmermann M, Jooste P, et al. Biomarkers of nutrition for development-iodine review. *J Nutr.* 2014;144(8):1322S-42S. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4093988/>
- (3) European Food Safety Authority. Outcome of a public consultation on the draft Scientific Opinion of the EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) on the essential composition of infant and follow-on formulae. Parma: EFSA, 2014. <https://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/en-633>
- (4) Joint FAO/WHO Expert Consultation on Human Vitamin and Mineral Requirements. World Health Organization. Department of Nutrition for Health and Development. Vitamin and mineral requirements in human nutrition: report. 2nd ed. Geneva: WHO, 2004. <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42716/9241546123.pdf?ua=1>
- (5) Leufroy A, Noël L, Bouisset P, et al. Determination of total iodine in French Polynesian foods: method validation and occurrence data. *Food Chem.* 2015;169:134-40. Epub 2014 Aug 7.
- (6) van der Reijden OL, Zimmermann MB, Galetti V. Iodine in dairy milk: Sources, concentrations and importance to human health. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2017;31(4):385-95.
- (7) Smyth PP, Burns R, Casey M, et al. Maintenance of iodine intake. *Thyroid Research.* 2013;6(Suppl 2):A52. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3618016/>
- (8) L. Chambers. Are plant-based milk alternatives putting people at risk of low iodine intake?. *Nutr Bull.* 2018;43(1):46-52.
- (9) British Standards Institution. BS EN 15111:2007 - Foodstuffs. Determination of trace elements. Determination of iodine by ICP-MS (inductively coupled plasma mass spectrometry).
- (10) International Organization for Standardization. ISO/IEC 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
- (11) Dahl L, Opsahl JA, Meltzer HM, et al. Iodine concentration in Norwegian milk and dairy products. *Br J Nutr.* 2003;90(3):679-85.
- (12) Girelli ME, Coin P, Mian C, et al. Milk represents an important source of iodine in schoolchildren of the Veneto region, Italy. *J Endocrinol Invest.* 2004;27(8):709-13.
- (13) Arrizabalaga JJ, Jalón M, Espada M, et al. Iodine concentration in ultra-high temperature pasteurized cow's milk. Applications in clinical practice and in community nutrition. *Med Clin (Barc).* 2015;145(2):55-61. Epub 2014 Sep 18.
- (14) Rasmussen LB, Larsen EH, Ovesen L. Iodine content in drinking water and other beverages in Denmark. *Eur J Clin Nutr.* 2000;54(1):57-60.
- (15) Stevenson MC, Drake C, Givens DI. Further studies on the iodine concentration of conventional, organic and UHT semi-skimmed milk at retail in the UK. *Food Chem.* 2018;239:551-555. Epub 2017 Jun 30. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.135>
- (16) Flachowsky G, Franke K, Meyer U, et al. Influencing factors on iodine content of cow milk. *Eur J Nutr.* 2014;53(2):351-65. Epub 2013 Nov 2.
- (17) Bath SC, Hill S, Infante HG, et al. Iodine concentration of milk-alternative drinks available in the UK in comparison with cows' milk. *Br J Nutr.* 2017;118(7):525-32. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5650045/>

## Teores de vitaminas B1 e B2 em frutos e pescado consumidos pela população portuguesa: contributo para o estudo de dieta total

*Vitamin B1 and B2 content in fruits and fish consumed by the Portuguese population: contribution to the total diet study*

Cristina Flores, Mariana Santos

cristina.flores@insa.min-saude.pt

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

### Resumo

As vitaminas são nutrientes indispensáveis ao crescimento e à manutenção da vida. A maioria das vitaminas não é sintetizada pelo organismo humano sendo fornecida apenas pela dieta. Os Estudos de Dieta Total (TDS) são uma ferramenta de saúde pública utilizada para avaliar a exposição da população a substâncias químicas, benéficas e prejudiciais, através da alimentação, analisando os alimentos tal como consumidos. No âmbito do estudo de dieta total piloto realizado em Portugal no período de 2014-2016, foram avaliados os teores de tiamina e riboflavina em 31 amostras do grupo Frutos e produtos à base de fruta e 25 amostras do grupo Peixe, produtos da pesca, anfíbios, répteis e invertebrados, e estimado o contributo para a Dose Diária de Referência (DDR). A metodologia analítica utilizada para a quantificação das vitaminas foi a cromatografia líquida de alta resolução, segundo as normas EN 14122 para a tiamina e EN 14152 para a riboflavina, cumprindo os requisitos descritos na NP EN ISO/IEC 17025:2005. De acordo com os resultados obtidos, tanto o pescado como a fruta poderão ser fontes importantes de riboflavina. Em relação à tiamina, a maioria das amostras estudadas apresenta valores inferiores a 4,5% da DDR.

### Abstract

Vitamins are essential nutrients for growth and maintenance of life and cannot be synthesized by the human body being only provided by diet. Total Diet Studies (TDS) is a public health tool used to assess the population's exposure to beneficial and harmful chemicals through food by analysing foods as consumed. In the context of total dietary pilot study carried out in Portugal in the period of 2014-2016, the contents of thiamine and riboflavin, in 31 samples from the fruit group and fruit products and 25 samples from the Fish group, fishery products, amphibians, reptiles and invertebrates were assessed and the contribution to the Recommended Dietary Intake (DDR) was estimated. The analytical methodology used for the quantification of vitamins was liquid high-resolution chromatography according to EN 14122 for thiamine and EN 14152 for riboflavin, as required in NP EN ISO / IEC 17025: 2005. According to the results, both fish and fruit may be important sources of riboflavin. Regarding thiamine, most of the samples studied presented values below 4.5% of DDR

### Introdução

As vitaminas são nutrientes indispensáveis ao crescimento e à manutenção da vida. A maioria das vitaminas não é sintetizada pelo organismo humano sendo fornecida apenas pela dieta. Quando a dieta é desequilibrada e inadequada, podem surgir várias doenças associadas à falta de certas vitaminas (1).

As vitaminas lipossolúveis são representadas pelas vitaminas A, D, E e K. As vitaminas hidrossolúveis incluem a vitamina C e as vitaminas do complexo B (1). Esta simples classificação reflete a biodisponibilidade das vitaminas, e como a solubilidade influencia a absorção intestinal e pelos tecidos (2).

Neste estudo serão abordadas as vitaminas, B1 (tiamina) e B2 (riboflavina), que estão disponíveis em diversos grupos de alimentos.

A tiamina foi a primeira das vitaminas hidrossolúveis a ser descoberta no início do século XX. A sua deficiência no organismo é responsável pelo aparecimento do beribéri (desordens do sistema nervoso), o que levou, em 1885, a Marinha Japonesa a aumentar o consumo de carne e vegetais na dieta da tripulação, uma vez que a doença era prevalente no século XIX (1).

Nos alimentos de origem animal, mais de 90% da tiamina está presente na forma fosforilada, com predominância da tiamina difosfato (TDP). Em menores quantidades, estão presentes a tiamina monofosfato (TMP) e a tiamina trifosfato (TTP). Nos produtos de origem vegetal, a vitamina ocorre predominantemente na forma não fosforilada (1,2).

A tiamina é uma das vitaminas do complexo B mais sensíveis à temperatura, levando a grandes perdas durante o processamento térmico dos alimentos (2). Esta vitamina é obtida

exclusivamente através da alimentação, pois o Homem não consegue sintetizá-la <sup>(1)</sup>, e uma vez que não é armazenada no organismo deve ser fornecida diariamente. A deficiência de tiamina afeta os sistemas nervoso e cardiovascular e ocorre devido ao consumo insuficiente através da dieta e/ou pelo aumento da necessidade de ingestão durante a gravidez, lactação, entre outros <sup>(1,3)</sup>.

A riboflavina foi descoberta em 1920 em extratos de leveduras, apresentando uma capacidade de evitar a pelagra <sup>(1)</sup>. A riboflavina é mais estável ao calor e à oxidação, contudo, apresenta sensibilidade à luz <sup>(4)</sup>.

Riboflavina é um termo genérico que engloba a riboflavina e as formas biologicamente ativas das quais esta é precursora: flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD). Estas formas, atuam como cofatores de um grupo de enzimas, as flavoproteínas, que estão envolvidas em diversas vias metabólicas onde catalisam reações de oxidação-redução, como agentes oxidantes ou transportadores de electrões <sup>(1)</sup>.

As deficiências da riboflavina são raras, uma vez que estão relacionadas com o metabolismo de outras vitaminas, verificando-se uma deficiência conjunta de diferentes vitaminas. Alguns estudos recentes demonstram que a riboflavina poderá ter um papel determinante na concentração plasmática de homocisteína, um fator de risco para doença cardiovascular <sup>(5)</sup>.

O fornecimento de riboflavina é feito através da alimentação, sendo os extratos de levedura a melhor fonte natural de riboflavina, a carne, o leite, os ovos e o queijo outras fontes adequadas desta vitamina <sup>(1,6)</sup>.

Dose Diária Recomendada ou de Referência (DDR) de um nutriente é o valor estimado para a quantidade diária de ingestão que satisfaz as necessidades da quase totalidade (97-98%) dos indivíduos saudáveis de um determinado género ou grupo etário <sup>(7)</sup>. Para os adultos as DDR de tiamina variam entre 1,1-1,5 mg/dia e entre 1,1-1,6 mg/dia para a riboflavina <sup>(8-10)</sup>.

## \_Objetivos

Este trabalho teve como objetivos determinar os teores de tiamina e riboflavina em dois grupos de alimentos importantes da dieta portuguesa, seguindo planos de amostragem e metodologias analíticas adotadas no projeto *Total Diet Study Exposure* (TDS-Exposure), e, para estes alimentos, estimar a contribuição para as doses diárias de referência (DDR).

## \_Material e métodos

A definição da amostragem do estudo, recolha e preparação das amostras seguiu as metodologias harmonizadas a nível europeu no âmbito do projeto TDS-Exposure <sup>(11)</sup>. Neste projeto a amostragem e seleção de alimentos baseou-se nos dados de consumo alimentar, por forma a serem representativas do consumo e da forma como os alimentos são consumidos no país.

Neste estudo foram analisadas 31 amostras do grupo Frutos e produtos à base de fruta e 25 amostras do grupo Peixe, produtos da pesca, anfíbios, répteis e invertebrados. Cada amostra é composta por 12 subamostras representativas dos hábitos de consumo, para aquele tipo de alimento. A amostragem foi realizada na Área Metropolitana de Lisboa (municípios a norte do rio Tejo). No grupo dos Frutos e produtos à base de fruta, as amostras foram colhidas em 4 épocas diferentes, por forma estar refletida a sazonalidade. No grupo do Peixe, produtos da pesca, anfíbios, répteis e invertebrados, as amostras foram preparadas segundo os processos culinários mais utilizados, em concordância com os hábitos de consumo da população portuguesa.

A metodologia analítica utilizada para a quantificação das vitaminas foi a cromatografia líquida de alta resolução, segundo as normas EN 14122 <sup>(12)</sup> para a tiamina e EN 14152 <sup>(13)</sup> para a riboflavina, cumprindo os requisitos descritos na NP EN ISO/IEC 17025:2005 <sup>(14)</sup>.

O contributo percentual de cada amostra para a DDR (adultos), de tiamina e riboflavina foi calculado a partir dos valores indicadas no Regulamento UE nº 1169/2011 <sup>(9)</sup>: 1,1 mg/dia para a tiamina e 1,4 mg/dia para a riboflavina.

Os limites de quantificação (LQ) das metodologias analíticas utilizadas correspondem respetivamente a 4,5% e 1,4% das DDR consideradas na comparação, para a tiamina e riboflavina, respetivamente.

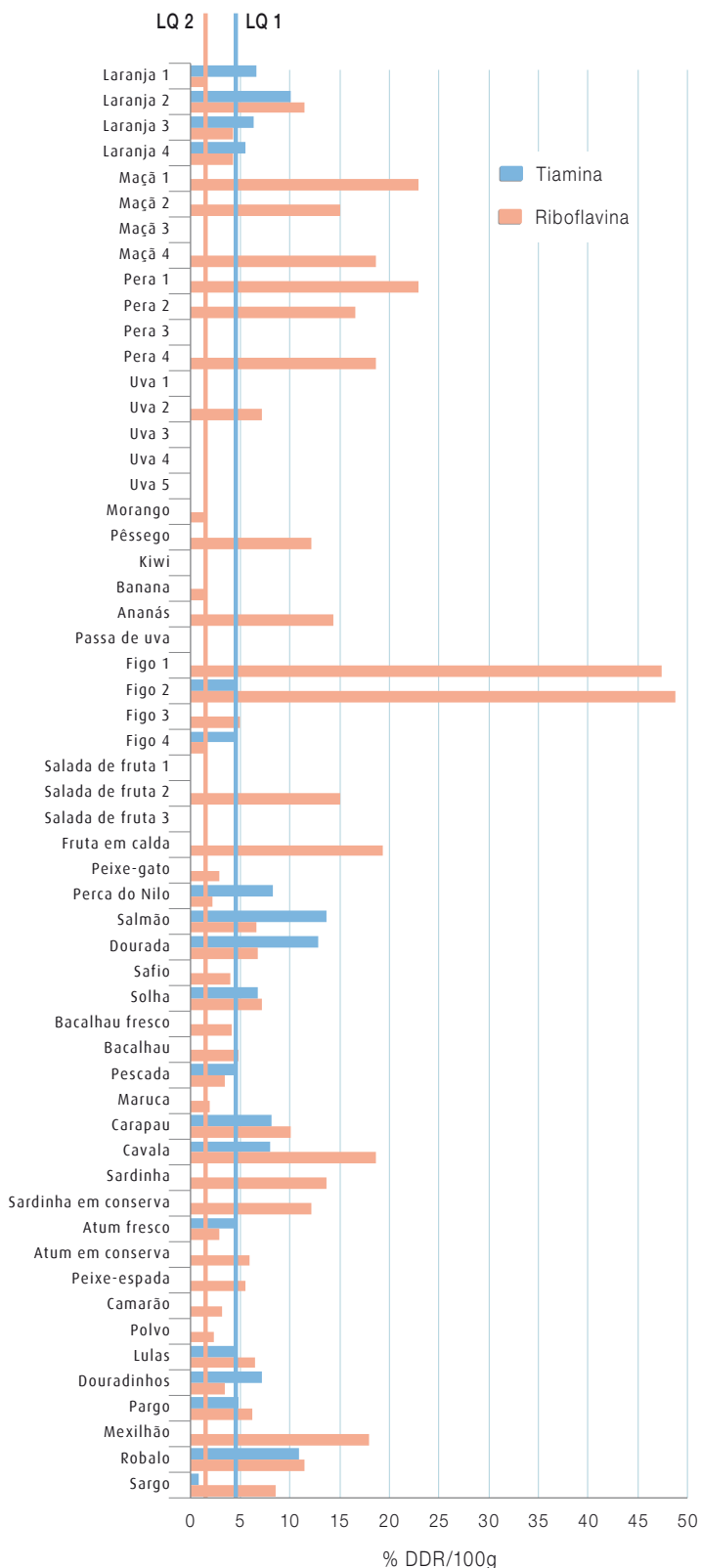
## \_Resultados e discussão

Os valores de riboflavina encontrados nas amostras de fruta variam entre 0,020 mg/100g no morango e 0,68 mg/100g no figo seco. Relativamente à tiamina, só foram encontrados valores superiores ao LQ, nas amostras de laranja e figo seco (tabela 1).

Tabela 1: Teor de vitamina B1 e B2 nos frutos e pescado mais consumidos em Portugal (mg/100g parte edível).

Fruto (n=31)	Tiamina mg/100g	Riboflavina mg/100g	Pescado (n=25)	Tiamina mg/100g	Riboflavina mg/100g
Laranja 1	0,072	0,023	Peixe-gato	<0,050	0,040
Laranja 2	0,11	0,16	Perca do Nilo	0,090	0,030
Laranja 3	0,070	0,060	Salmão	0,15	0,092
Laranja 4	0,060	0,060	Dourada	0,14	0,094
Maçã 1	<0,050	0,32	Safio	<0,050	0,056
Maçã 2	<0,050	0,21	Solha	0,074	0,10
Maçã 3	<0,050	<0,020	Bacalhau fresco	<0,050	0,058
Maçã 4	<0,050	0,26	Bacalhau	<0,050	0,067
Pera 1	<0,050	0,32	Pescada	0,049	0,048
Pera 2	<0,050	0,23	Maruca	<0,050	0,027
Pera 3	<0,050	<0,020	Carapau	0,089	0,14
Pera 4	<0,050	0,26	Cavala	0,087	0,26
Uva 1	<0,050	<0,020	Sardinha	<0,050	0,19
Uva 2	<0,050	0,10	Sardinha em conserva	<0,050	0,17
Uva 3	<0,050	<0,020	Atum fresco	0,051	0,040
Uva 4	<0,050	<0,020	Atum em conserva	<0,050	0,082
Uva 5	<0,050	<0,020	Peixe-espada	<0,050	0,077
Morango	<0,050	0,020	Camarão	<0,050	0,044
Pêssego	<0,050	0,17	Polvo	<0,050	0,033
Kiwi	<0,050	<0,020	Lulas	0,050	0,090
Banana	<0,050	0,021	Douradinhos	0,079	0,048
Ananás	<0,050	0,20	Pargo	0,053	0,086
Passa de uva	<0,050	<0,020	Mexilhão	<0,050	0,25
Figo 1	<0,050	0,66	Robalo	0,12	0,16
Figo 2	0,050	0,68	Sargo	0,0096	0,12
Figo 3	<0,050	0,070			
Figo 4	0,050	0,023			
Salada fruta 1	<0,050	<0,020			
Salada fruta 2	<0,050	0,21			
Salada fruta 3	<0,050	<0,020			
Fruta em calda	<0,050	0,27			

Gráfico 1: Teor de vitamina B1 e B2 nos frutos e pescado mais consumidos em Portugal (mg/100g parte edível).



LQ - Limite de quantificação do método DDR - Dose Diária Referência

Nas amostras de pescado (gráfico 1), verificou-se que a cavala é a que tem o teor mais elevado em riboflavina; 19% da DDR por 100g de parte edível, sendo a perca do Nilo, a maruca e o polvo as que menos contribuem para a ingestão desta vitamina. Nas restantes amostras de pescado o teor de tiamina varia entre 4% e 14% da DDR por 100g de parte edível.

### Conclusão

De acordo com os resultados obtidos, tanto o pescado como a fruta poderão ser fontes importantes de riboflavina. Em relação à tiamina, a maioria das amostras estudadas apresenta valores inferiores a 4,5% da DDR, que corresponde ao limite de quantificação do método analítico utilizado.

### Referências bibliográficas:

- (1) Ball GFM. Vitamins: their role in the human body. London: Blackwell Publishing, 2004.
- (2) Ball GFM. Vitamins in foods: analysis, bioavailability, and stability. New York: Taylor & Francis Group, 2006.
- (3) Diéguez A, Hierrezuelo J. Tiamina. Medisan. 1997; 1(1):23-29.
- (4) Insel P, McMahon K, Bernstein M, et al. Water - Soluble vitamins. In: Nutrition. 4th ed. Massachusetts, EUA: Jones and Bartlett Publishers, 2007, p. 429-66.
- (5) Powers HJ. Riboflavin (vitamin B-2) and health. Am J Clin Nutr. 2003;77(6):1352-60.
- (6) Kohlmeier M. Water-soluble vitamins and non-nutrients: inositol. In: Nutrient metabolism: structures, functions and genetics. San Diego: Academic Press, 2003. p. 634-42.
- (7) Joint FAO/WHO Expert Consultation on Human Vitamin and Mineral Requirements & World Health Organization. Dept. of Nutrition for Health and Development. Vitamin and mineral requirements in human nutrition: report. 2nd ed. Geneva: World Health Organization, 2004. <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42716/9241546123.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- (8) Bender, DA. Nutritional biochemistry of the vitamins. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2003.
- (9) União Europeia. Regulamento n.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de outubro de 2011, relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios. <http://data.europa.eu/eli/reg/2011/1169/oj>
- (10) Joint FAO/WHO Expert Consultation Bangkok, Thailand. Human vitamin and mineral requirements: report. Rome: Food and Nutrition Division FAO, 2001. <http://www.fao.org/3/a-y2809e.pdf>
- (11) Dias MG, Vasco E, Pité M, et al. Estudo de dieta total piloto para avaliação da ingestão de nutrientes e da exposição a contaminantes: amostragem. Boletim Epidemiológico Observações. 2015;4(Supl 5):7-9. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/3008>
- (12) BS EN 14122:2014. Foodstuffs– Determination of vitamin B1 by High Performance Liquid Chromatography.
- (13) BS EN 14152:2014. Foodstuffs – Determination of vitamin B2 by High Performance Liquid Chromatography.
- (14) NP EN ISO/IEC 17025:2005. Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração.

## Teor de nitrato em produtos hortícolas e frutos consumidos ao longo do ano em Portugal

### Nitrate content in vegetables and fruits consumed throughout the year in Portugal

Rita Laia<sup>1,3</sup>, Ana Rebelo<sup>2,3</sup>, Celeste Serra<sup>1</sup>, Elsa Vasco<sup>3</sup>

elsa.vasco@insa.min-saude.pt

(1) Área Departamental de Engenharia Química, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, Lisboa, Portugal.

(2) Departamento de Ciências da Terra, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Costa de Caparica, Portugal.

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

#### \_Resumo

Os nitratos são comuns na natureza e amplamente encontrados em alimentos, água e solo, embora sejam os produtos hortícolas a sua principal fonte de ingestão. Os produtos hortícolas têm uma função nutricional essencial e desempenham um papel importante na proteção da saúde mas quando consumidos em excesso, os nitratos podem causar efeitos adversos. No sentido de poder avaliar a exposição alimentar da população a nitratos é importante determinar os teores de nitratos nos alimentos na forma como são consumidos e conhecer como os seus valores podem ser influenciados pela sazonalidade. Neste estudo, a quantificação do nitrato foi realizada através de um método HPLC-UV aplicado em 17 amostras diferentes de produtos hortícolas e frutos obtidas através do estudo piloto no âmbito do projeto *Total Diet Study Exposure* (TDS-Exposure). O teor de nitrato nas amostras variou entre 11 e 2369 mg/kg de produto. Na alface, produto hortícola que possui teores máximos legislados, a concentração de nitrato em todas as amostras foi menor que os limites máximos permitidos (2500 a 4500 mg/kg). Relativamente ao efeito da sazonalidade, as variações encontradas em algumas das amostras não foram na sua maioria significativas.

#### \_Abstract

Nitrates compounds are common in nature and widely found in foods, waters and soils, although vegetables are considered the main source of dietary nitrate intake. Vegetables have an essential nutritional function and play an important role in health protection, but when consumed in excess, nitrates could cause adverse effects. In order to assess the dietary exposure of the population to nitrates, it is important to determine the levels of nitrates in food in the way they are consumed and to know how their values can be influenced by seasonality. In this study, nitrate quantification was performed using an HPLC-UV method applied to 17 different samples of vegetables and fruits obtained through the pilot study under the *Total Diet Study Exposure* project (TDS-Exposure). The nitrate content in the samples ranged between 11 and 2369 mg/kg of product. In the lettuce, vegetable that has maximum legislated contents, the concentration of nitrate in all the samples was smaller than the maximum permitted levels (2500 a 4500 mg/kg). Regarding the effect of seasonality, the variations found in some of the samples were not mostly significant.

#### \_Introdução

O nitrato ocorre naturalmente nas plantas onde é acumulado. O potencial para acumulação depende de vários fatores bióticos e abióticos e nas plantas, é nas folhas que se encontra a maior concentração em nitrato. As sementes, frutos e tubérculos apresentam, na sua maioria, teores mais reduzidos. Os nitratos são usados na agricultura como fertilizante e no processamento de alimentos como aditivo alimentar, nomeadamente, em carnes (1,2).

Embora os nitratos não sejam aparentemente tóxicos, os seus metabolitos e produtos de reação, como por exemplo, o nitrito, o óxido nítrico e as nitrosaminas tornam esta substância de importância regulatória devido às suas implicações potencialmente adversas na saúde, como a metahemoglobinemia e a carcinogénese (1,2). No entanto, alguns autores referem que a conversão de nitrato em nitrito desempenha um importante papel antimicrobiano no estômago (3) e que outros metabolitos do nitrato têm papéis fisiológicos/farmacológicos relevantes na saúde (4,5).

A exposição humana ao nitrato é principalmente exógena e resulta do consumo de produtos hortícolas e frutos (cerca de 60-80%) e, em menor escala, de água e de alimentos processados (1).

Deste modo, considerando os riscos associados à ingestão de nitrato, foi fixada uma dose diária admissível (DDA) de 3,7 mg/kg de peso corporal/dia (expressa em ião nitrato). O Regulamento (CE) nº 1881/2006, de 19 de dezembro, fixa também teores máximos para o nitrato em espinafres, em alface e em produtos à base de cereais bem como em alimentos para bebés, destinados a lactentes e crianças jovens. Como as con-

dições climáticas podem influenciar o teor de nitrato presente em produtos hortícolas como alface e espinafre, foram também fixados limites máximos cujos valores dependem da época de colheita desses produtos e das condições em que foram cultivados (sob cobertura ou ao ar livre) (6).

Apesar de serem uma fonte importante de nitrato, o aumento do consumo de produtos hortícolas e frutos é amplamente recomendado devido aos seus efeitos benéficos para a saúde.

### \_Objetivo

O presente trabalho teve como principal objectivo determinar o teor de nitrato em produtos hortícolas e frutos de modo a avaliar o cumprimento da legislação existente e a influência da sazonalidade.

### \_Material e métodos

Um total de 68 amostras, 10 produtos hortícolas e 7 frutos diferentes, foram recolhidas e preparadas no âmbito do projeto *Total Diet Study Exposure* (TDS-Exposure), tendo sido seleccionadas com base no consumo da população portuguesa. As amostras foram adquiridas em supermercados da Área Metropolitana de Lisboa (municípios a norte do rio Tejo) entre 2014 e 2016 e para cada um dos produtos hortícolas e frutos foram recolhidas 4 amostras em períodos diferentes e representativas das quatro estações do ano. Cada amostra foi composta de 12 subamostras preparadas na forma como usualmente o alimento é consumido.

A determinação do teor de nitrato nas amostras foi realizada por um método de cromatografia líquida de alta resolução de troca iónica com detecção UV o qual se encontra implementado e acreditado no Laboratório de Química do Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. O nitrato foi extraído com água fervente e solução de bórax e os extratos clarificados com soluções Carrez. A identificação foi efetuada por comparação com o tempo de retenção do padrão de nitrato e a quantificação pelo método do padrão externo. A concentração de nitrato foi expressa em mg/kg de amostra, com uma incerteza de 15% (7).

### \_Resultados

Nos **gráficos 1** e **2** são apresentados os resultados obtidos para o teor de nitrato nas amostras de produtos hortícolas.

Para o grupo destes produtos, o teor de nitrato variou entre 11 e 2369 mg/kg não tendo sido possível quantificá-lo na cenoura, na primavera, pelo valor encontrado ser inferior ao limite de quantificação do método (10 mg/kg). Conforme se observa no **gráfico 1**, os teores de nitrato foram muito superiores para o grupo de produtos hortícolas folhosos (alface, nabiças, grelos) em qualquer época do ano, com valores entre 528 e 2369 mg/kg. Para as nabiças destaca-se o valor do teor de nitrato para o verão (2369 mg/kg), o mais alto obtido neste estudo. Para os restantes hortícolas do **gráfico 2** (brócolos, couve-flor, feijão-verde, pimento, tomate, cenoura e batata cozida) o intervalo de variação da concentração em nitrato foi de 11 a 421 mg/kg.

Em relação às alfaces, verificou-se uma variação do teor em nitrato ao longo do ano com valores entre 1353 e 2159 mg/kg os quais foram, assim, sempre inferiores ao estabelecido pela legislação em vigor (2500 a 4500 mg/kg). Os teores mais elevados foram observados nos meses de inverno tal como o estabelecido pela Comissão Europeia que prevê limites máximos de nitrato mais elevados em alfaces cultivadas durante esses meses (6).

Para os frutos (**gráfico 3**), o teor de nitrato variou entre 48 e 169 mg/kg apresentando, como seria de prever, valores inferiores aos encontrados nos produtos hortícolas. Nas amostras de laranja, maçã e pera, nas quatro estações do ano, o nitrato não foi quantificado pelo seu teor se encontrar abaixo do limite de quantificação do método. Em relação ao teor de nitrato determinado nas amostras de melão, os seus valores foram inferiores nas estações do ano que correspondem à época normal de produção deste produto em Portugal (verão e outono). Na meloa, a concentração de nitrato foi superior na primavera e nos figos secos o efeito da sazonalidade não se mostrou significativo.

Em geral, no que diz respeito à sazonalidade, embora tenham sido observadas diferenças nos teores de nitrato em alguns

Gráfico 1: Teor de nitrato nos produtos hortícolas folhosos, nas quatro estações do ano.

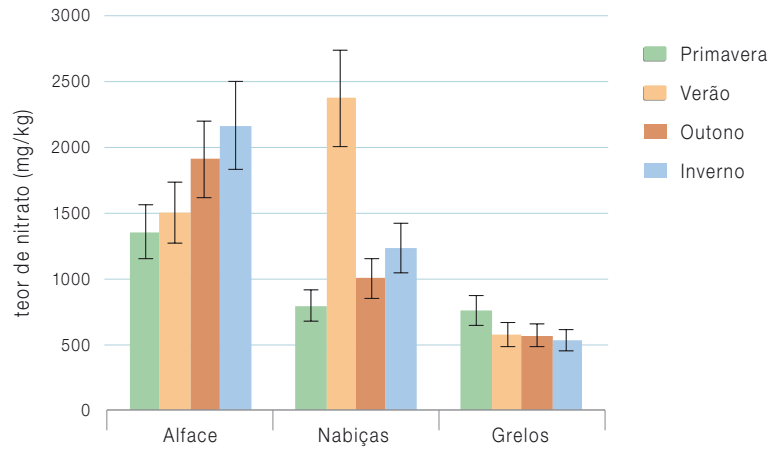


Gráfico 2: Teor de nitrato nos produtos hortícolas, nas quatro estações do ano.

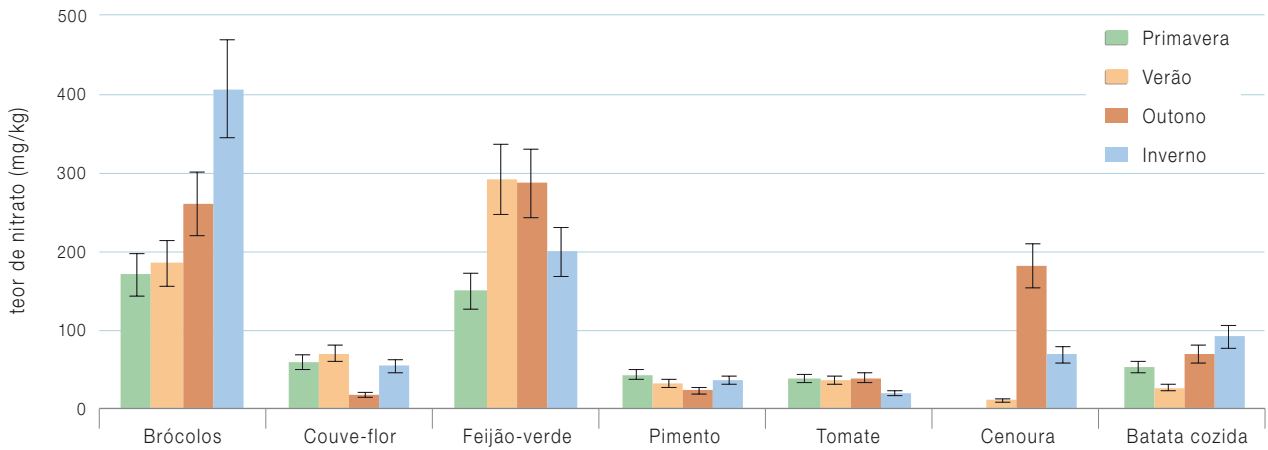
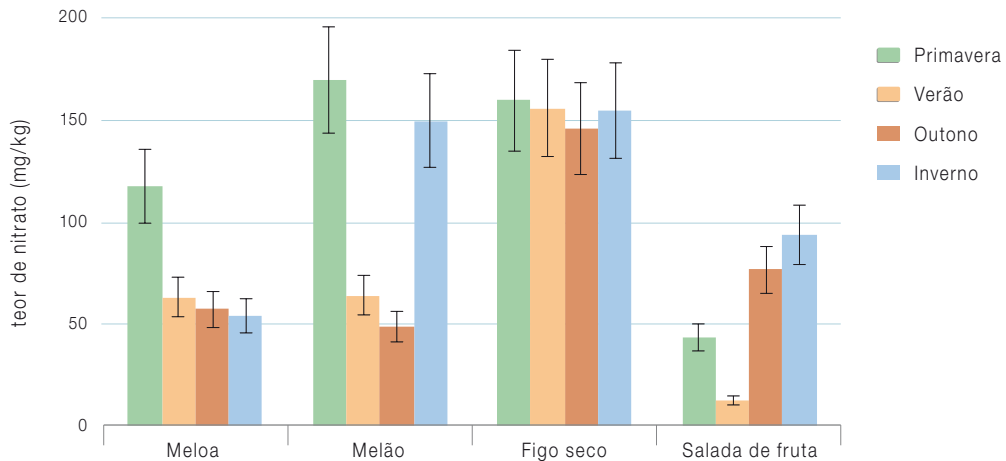


Gráfico 3: Teor de nitrato nos frutos, nas quatro estações do ano.



frutos e produtos hortícolas nas diferentes estações do ano, a maioria não teve significância nem um padrão de variação que fosse conclusivo.

## **\_Conclusões**

De modo a contribuir para a avaliação da exposição da população portuguesa a nitrato, neste estudo foram analisadas amostras de produtos hortícolas e frutos tal como são consumidos pelos portugueses. Nos produtos hortícolas foram encontrados teores de nitrato superiores aos dos frutos, apresentando os folhosos (alfaces, nabiças e grelos) as concentrações mais elevadas, embora com valores dentro dos limites estabelecidos pela legislação em vigor (alface).

Em relação aos estudos de sazonalidade, foi possível concluir que o teor de nitrato variou para algumas amostras com a estação do ano, mas na maioria dos casos sem significado nem padrão de variação que seja evidente. Com estes estudos foram encontrados nas alfaces teores de nitrato mais elevados no inverno tal como está previsto na legislação em vigor.

### **Referências bibliográficas:**

- (1) European Food Safety Authority. Nitrate in vegetables - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain. EFSA Journal. 2008;6(6):689. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2008.689>
- (2) European Food Safety Authority. Statement on possible public health risks for infants and young children from the presence of nitrates in leafy vegetables. EFSA Journal. 2010;8(12):1935. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1935>
- (3) McKnight GM, Duncan CW, Leifert C, et al. Dietary nitrate in man: friend or foe? Br J Nutr. 1999;81(5):349-58.
- (4) Lundberg JO, Weitzberg E, Cole JA, et al. Nitrate, bacteria and human health. Nat Rev Microbiol. 2004;2(7):593-602.
- (5) Katan MB. Nitrate in foods: harmful or healthy? Am J Clin Nutr. 2009;90(1):11-2.
- (6) Comissão Europeia. Regulamento (CE) n. o 1881/2006 da Comissão, de 19 de dezembro, que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. JO. 2006: L364/5-24. <http://data.europa.eu/eli/reg/2006/1881/oj>
- (7) Vasco ER, Alvito PC. Occurrence and infant exposure assessment of nitrates in baby foods marketed in the region of Lisbon, Portugal. Food Addit Contam Part B Surveill. 2011;4(3):218-25.

## Impacto das alterações climáticas na exposição da população portuguesa a aflatoxinas

### Climate change impact on the Portuguese exposure to aflatoxins

Ricardo Assunção<sup>1,2</sup>, Carla Martins<sup>1,3</sup>, Susana Viegas<sup>4,5</sup>, Carla Viegas<sup>4,5</sup>, Lea S. Jakobsen<sup>6</sup>, Sara M. Pires<sup>6</sup>, Paula Alvito<sup>1,2</sup>

ricardo.assunção@insa.min-saude.pt

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

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

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

(4) Grupo de Investigação em Ambiente e Saúde. Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa, Lisboa, Portugal.

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

(6) Division for Diet, Disease Prevention and Toxicology. National Food Institute, Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark.

#### \_Resumo

As alterações climáticas têm sido identificadas como um fator determinante para a segurança dos alimentos consumidos em todo o mundo. As micotoxinas, contaminantes alimentares produzidos por fungos, são habitualmente identificadas como um dos principais perigos neste contexto. As aflatoxinas assumem particular relevo, face à sua toxicidade aguda e crónica. A região do Mediterrâneo, incluindo Portugal, tem sido considerada uma região particularmente vulnerável às consequências das alterações climáticas. O presente estudo pretende estimar o impacto na saúde da exposição a aflatoxinas em Portugal e discutir a potencial influência das alterações climáticas no risco para a saúde associado a esta exposição. Para estimar o número de casos de carcinoma hepatocelular associados à exposição a aflatoxinas, foi determinada a fração atribuível da população. Para estimar o impacto da exposição a aflatoxinas na saúde dos Portugueses, a carga de doença foi determinada aplicando-se o conceito de anos de vida ajustados por incapacidade (DALY). É expectável que no futuro, em consequência das alterações climáticas, o número de DALYs bem como do número de casos de carcinoma hepatocelular aumente. A quantificação do impacto na saúde da exposição a aflatoxinas em cenário de alterações climáticas reveste-se de particular importância, em especial para o desenvolvimento de políticas e medidas preventivas que possam proteger a população.

#### \_Abstract

Climate change has been indicated as a driver for food safety issues worldwide, mainly due to the impact on the occurrence of food safety hazards at various stages of food chain. Mycotoxins, natural contaminants produced by fungi, are among the most important of such hazards. Aflatoxins, which have the highest acute and chronic toxicity of all mycotoxins, assume particular importance. Mediterranean region, including Portugal, was considered a climate change hotspot. The present study aims to estimate the health impact of aflatoxins exposure in Portugal and to discuss the potential influence of climate change on the health risk associated to this exposure. A population attributable fraction was determined to estimate the number of extra cases of hepatocellular carcinoma (HCC) associated to the Portuguese aflatoxin exposure, and the Disability Adjusted Life Years (DALYs) were derived to estimate the associated burden of disease. It is expected that in the future the number of DALYs and the associated cases of HCC due to aflatoxins exposure will increase due to climate change. The quantification of the health impact associated with exposure to aflatoxins in climate change scenarios presents particular importance, especially for the development of politics and preventive measures to protect human population.

#### \_Introdução

As alterações climáticas têm sido reconhecidas a nível mundial como um dos fatores mais importantes que pode afetar a segurança dos alimentos consumidos no mundo, dado o seu potencial impacto na ocorrência de perigos nos géneros alimentícios, desde a produção primária ao seu consumo. De acordo com o quinto relatório do *Intergovernmental Panel on Climate Change* (IPCC), as alterações no clima têm causado diversos efeitos nos sistemas naturais e humano em todos os continentes e oceanos (1). Na *Conference of Parties* (COP21), que decorreu em Paris em dezembro 2015, decisores de 195 países acordaram em desenvolver esforços no sentido de limitar o aumento da temperatura a 1,5°C (média global) acima dos níveis pré-industrial, reconhecendo que esta ação irá reduzir de forma significativa os riscos e o impacto das alterações climáticas (2).

Dos efeitos previstos das alterações climáticas, incluem-se um aumento na temperatura global do ar, variações nos níveis de precipitação, períodos de seca e acumulação de dióxido de carbono na atmosfera. Estes efeitos constituem simultaneamente algumas das maiores preocupações relacionadas com as alterações climáticas e a agricultura e segurança dos alimentos (3).

Apesar do potencial impacto das alterações climáticas no acesso da população a alimentos bem como o suprimento das necessidades nutricionais (*food security*) ter sido um assunto debatido e investigado, o impacto específico na segurança dos alimentos (*food safety*) constitui um assunto menos estudado (4,5). Em consequência das alterações climáticas,

quer os perigos químicos quer os microbiológicos devem ser considerados dado que podem afetar a segurança dos géneros alimentícios e alimentos para animais, nomeadamente e com particular relevância as micotoxinas, as biotoxinas marinhas, os pesticidas, e os metais (4). As micotoxinas, contaminantes naturais produzidos por fungos, assumem particular destaque quando considerados os potenciais efeitos das alterações climáticas (6-8), uma vez que apesar de existirem diversos fatores envolvidos na produção destas toxinas, o clima é considerado o mais importante (9,10). Em geral, um aumento nas temperaturas beneficia a proliferação de algumas espécies de fungos potencialmente toxigenos (4-7), incluindo espécies produtoras de aflatoxinas, consideradas as toxinas com maior potencial de toxicidade aguda e crónica. As aflatoxinas são substâncias genotóxicas, carcinogénicas e imunossupressoras, sendo uma das possíveis consequências da exposição, o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (CHC), e por isso estas toxinas foram classificadas pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) no grupo 1. Tradicionalmente, as aflatoxinas são detetadas em cereais, amendoins e nozes, entre outros produtos usados na alimentação humana e animal (11).

Considerando a sua localização geográfica, Portugal é considerado um país particularmente vulnerável ao impacto das alterações climáticas (12-15), sendo que os seus efeitos se caracterizam pela diminuição da precipitação anual, por eventos climáticos extremos e mais intensos (por exemplo períodos de seca e ondas de calor), sendo que estes eventos se assemelham aos que acontecem noutros países, em particular na região do Mediterrâneo (16).

### \_Objetivos

O presente estudo pretende estimar o impacto na saúde da exposição a aflatoxinas em Portugal e discutir a potencial influência das alterações climáticas no risco para a saúde associado a esta exposição.

### \_Materiais e métodos

Para estimar o número de casos de carcinoma hepatocelular associados à exposição a aflatoxinas, foi utilizado o conceito de fração atribuível da população (*population attributable fraction*) (17), multiplicando um fator de potência associado às aflatoxinas (18) pela exposição estimada da população portuguesa a aflatoxinas.

Para estimar o impacto da exposição a aflatoxinas na saúde dos Portugueses, a carga de doença (*burden of disease*) foi determinada aplicando-se o conceito de anos de vida ajustados por incapacidade (DALY), combinando a quantidade de saúde perdida devido à doença (YLD) ou à morte prematura (YLL), de acordo com a equação seguinte:

$$DALY = (t_f \times dw_f \times p_f) + (t_{nf} \times dw_{nf} \times p_{nf}) + (YLL \times p_f)$$

Sendo  $t_f$  a duração da doença (cancro fatal) em anos,  $dw_f$  o peso da incapacidade de cancro fatal,  $p_f$  a probabilidade de um cancro ser fatal,  $t_{nf}$  a duração da doença de cancro não fatal,  $dw_{nf}$  o peso da incapacidade de cancro não fatal e  $p_{nf}$  a probabilidade de um cancro ser não fatal. Para estes cálculos foram utilizados dados estatísticos nacionais, obtidos a partir das bases de dados do Instituto Nacional de Estatística (<https://www.ine.pt/>), dados relacionados com o carcinoma hepatocelular e valores dos pesos de incapacidade, que se encontram resumidos na [tabela 1](#).

### \_Resultados

A [tabela 2](#) apresenta as estimativas da carga de doença associada a carcinoma hepatocelular (CHC), considerando a exposição estimada da população portuguesa a aflatoxinas. Considerando diferentes níveis de exposição a aflatoxinas (valores europeus (23) e nacionais (24)), o número de casos anuais extra de CHC variaram entre 0,52 e 2,00; os valores estimados de DALY variaram entre 8,0 e 30,9; os valores de DALY/100000 variaram entre 0,08 e 0,30.

É importante referir que, apesar de baseado em cenários possíveis e plausíveis, todas as estimativas devem ser interpretadas com precaução e enquanto previsões baseadas em modelos matemáticos.

Tabela 1: Parâmetros utilizados no cálculo de anos de vida ajustados por incapacidade (DALY).

Parâmetro	Valor	Referência
Esperança média de vida à nascença (em anos)*	80,62	(19)
Idade de início de CHC (em anos)*	63,7	(20)
Duração da doença (cancro fatal), $t_f$ (em anos)	0,5	(21)
Peso da incapacidade (cancro fatal), $dw_f$	0,508	(22)
Probabilidade de um cancro ser fatal, $p_f$	0,92	(21)
Duração da doença (cancro não fatal), $t_{nf}$ (em anos)	5	(21)
Peso da incapacidade (cancro não fatal), $dw_{nf}$	0,294	(22)
Probabilidade de um cancro ser não fatal, $p_{nf}$	0,08	(21)

\* dados relativos a Portugal CHC – carcinoma hepatocelular

Tabela 2: Carga de doença por carcinoma hepatocelular (CHC) considerando a estimativa da exposição da população portuguesa a aflatoxinas.

Exposição a aflatoxinas (referência)	Exposição a aflatoxinas – nível estimado (ng kg pv <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> )	Casos anuais extra de CHC	Casos anuais extra de CHC por 100,000	DALY anual	DALY anual por 100,000
Europa – limite inferior <sup>(23)</sup>	0,838	0,87	0,008	13,4	0,13
Europa – limite superior <sup>(23)</sup>	1,934	2,00	0,019	30,9	0,30
Portugal <sup>(24)</sup>	0,501	0,52	0,005	8,0	0,08

CHC – carcinoma hepatocelular

## Discussão e conclusão

Alguns estudos prévios referiram como consequência direta ou indireta das alterações climáticas, na região do Mediterrâneo, incluindo Portugal, modificações no crescimento de fungos bem como na produção de micotoxinas (6,7). As micotoxinas, em particular as aflatoxinas, surgem assim como perigos a considerar num cenário de alterações climáticas em Portugal.

Recentemente, Battilani e colaboradores (8) estimaram a probabilidade de contaminação de culturas de milho e trigo por aflatoxinas, nos próximo 100 anos, considerando dois cenários de alterações climáticas, um aumento +2°C e de +5°C (8). Tendo em conta o cenário mais provável (+2°C), estes autores reportaram que as aflatoxinas podem tornar-se

uma preocupação significativa na Europa, conduzindo a valores acima dos limites legislados, particularmente em culturas de milho, apresentando-se a região do Mediterrâneo e Portugal como de maior risco. Assim sendo, e considerando o impacto que a exposição a aflatoxinas tem atualmente na saúde da população portuguesa (tabela 2), é muito expectável que os valores de DALY e de CHC atribuídos à exposição a aflatoxinas aumentem.

Assim, a quantificação do impacto na saúde da exposição a aflatoxinas em cenário de alterações climáticas reveste-se de particular importância, em especial para o desenvolvimento de políticas e medidas preventivas que possam assim proteger a população.

**Referências bibliográficas:**

- (1) Intergovernmental Panel on Climate Change. Climate change 2014: synthesis report. Geneva: IPCC, 2015. <http://www.ipcc.ch/report/ar5/syr/>
- (2) United Nations Framework Convention on Climate Change. Conference of the Parties: Adoption of the Paris Agreement, 2015. <https://unfccc.int/resource/docs/2015/cop21/eng/l09r01.pdf>
- (3) Van der Fels-Klerx HJ, Liu C, Battilani P. Modelling climate change impacts on mycotoxin contamination. *World Mycotoxin J.* 2016;9(5):717-26. <https://doi.org/10.3920/WMJ2016.2066>
- (4) Miraglia M, Marvin HJ, Kleter GA, et al. Climate change and food safety: an emerging issue with special focus on Europe. *Food Chem Toxicol.* 2009 ;47(5):1009-21.
- (5) Tirado MC, Clarke R, Jaykus LA, et al. Climate change and food safety: a review. *Food Res. Int.* 2010;43(7): 1745-65.
- (6) Paterson RRM, Lima N. How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Res. Int.* 2010;43(7): 1902-14.
- (7) Paterson RRM, Lima N. Further mycotoxin effects from climate change. *Food Res. Int.* 2011;44(9):2555-66.
- (8) Battilani P, Toscano P, Van der Fels-Klerx HJ, et al. Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Sci Rep.* 2016;6:24328. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4828719/>
- (9) Magan N, Medina A, Aldred D. Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre- and postharvest. *Plant Pathol.* 2011; 60(1):150-63.
- (10) Milani, J. Ecological conditions affecting mycotoxin production in cereals : a review. *Vet. Med. (Praha).* 2003;58(8):405-11 (2013). <http://vri.cz/docs/vetmed/58-8-405.pdf>
- (11) CAST. Council for Agricultural Science and Technology - Task force report. Mycotoxins : Risks in Plant, Animal, and Human Systems Council for Agricultural Science and Technology (2003).
- (12) Carvalho A, Schmidt L, Santos FD, et al. Climate change research and policy in Portugal. *WIREs Clim Change.* 2014;5(2): 199-217.
- (13) Campos I, Guerra J, Gomes JF, et al. Understanding climate change policy and action in Portuguese municipalities: a survey. *Land use policy.* 2017;62: 68-78.
- (14) Ramos AM, Trigo RM, Santo FE. Evolution of extreme temperatures over Portugal: recent changes and future scenarios. *Clim Res.* 2011;48:177-92.
- (15) Fonseca D, Carvalho MJ, Marta-Almeida M, et al. Recent trends of extreme temperature indices for the Iberian Peninsula. *Phys. Chem. Earth, Parts A/B/C.* 2016;94: 66-76.
- (16) Giorgi F. Climate change hot-spots. *Geophys Res Lett.* 2006;33(8):L08707.
- (17) Havelaar AH, Kirk MD, Torgerson PR, et al.; World Health Organization Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group. World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. *PLoS Med.* 2015;12(12):e1001923. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001923>
- (18) Liu Y, Wu F. Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. *Environ Health Perspect.* 2010;118(6):818-24. <https://dx.doi.org/10.1289/ehp.0901388>
- (19) Instituto Nacional de Estatística. Portal de Estatísticas Oficiais. [Em linha]. [consult. 28.6/2018]. <https://www.ine.pt/>
- (20) Silva, T. Evaluation of hepatocellular carcinoma in clinical practice. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 2015. [https://sigarra.up.pt/fmup/pt/pub\\_geral.show\\_file?pi\\_gdoc\\_id=527190](https://sigarra.up.pt/fmup/pt/pub_geral.show_file?pi_gdoc_id=527190)
- (21) Mathers C, Vos T, Stevenson C. The burden of disease and injury in Australia. Canberra: Australian Institute of Health and Welfare, 1999. <https://www.aihw.gov.au/getmedia/cd1e33db-410f-4a38-a2df-f1f86af715c3/bdia-c00.pdf.aspx>
- (22) WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. Geneva: World Health Organization, 2015. [http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne\\_disease/fergreport/en/](http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fergreport/en/)
- (23) European Food Safety Authority. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. *EFSA J.* 2007; 446: 1-127. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2007.446>
- (24) Abrunhosa L, Morales H, Soares C, et al. A Review of Mycotoxins in Food and Feed Products in Portugal and Estimation of Probable Daily Intakes. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2016;56(2):249-65. 92.

## Prevalência de excesso de peso e de obesidade em Portugal: resultados do primeiro Inquérito Nacional de Saúde com Exame Físico (INSEF 2015)

*Prevalence of overweight and obesity in Portugal: results from the first Portuguese Health Examination Survey (INSEF 2015)*

Vânia Gaio, Liliana Antunes, Marta Barreto, Ana Gil, Irina Kislaya, Sónia Namorado, Ana Paula Rodrigues, Ana Santos, Baltazar Nunes, Carlos Matias Dias

vania.gaio@insa.min-saude.pt

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

### \_Resumo

Descrever as prevalências de excesso de peso e de obesidade na população adulta residente em Portugal em 2015, obtidas através de medições antropométricas diretas, de acordo com as variáveis sexo, idade, região, nível de escolaridade e situação perante o trabalho. As prevalências de excesso de peso e de obesidade tiveram por base o cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC), considerando os resultados das medições diretas do peso e da altura obtidos no 1º Inquérito Nacional de Saúde com Exame Físico (INSEF 2015). As prevalências foram estratificadas por sexo, grupo etário, região, nível de escolaridade e situação perante o trabalho. A prevalência nacional de excesso de peso estimada foi de 38,9% (IC95%: 36,9-41,1) e a prevalência de obesidade foi de 28,7% (IC95%: 26,8-30,6). Foi observada uma maior prevalência de excesso de peso nos homens, mas a prevalência de obesidade foi superior para as mulheres. Os mais velhos e os indivíduos com menor nível de escolaridade foram os que apresentaram maiores prevalências de obesidade. Estes resultados evidenciam uma elevada prevalência de excesso de peso e obesidade na população adulta residente em Portugal em 2015 e suportam a manutenção de intervenções dirigidas à redução da incidência e prevalência da obesidade e do excesso de peso na população portuguesa.

### \_Abstract

To describe the prevalence of overweight and obesity in the adult population resident in Portugal in 2015, through direct anthropometric measurements according to sex, age, region, education level and work situation. The prevalence of overweight and the prevalence of obesity were based on the Body Mass Index (BMI), calculated considering the results of the direct measurements of weight and height obtained from the First Portuguese Health Examination Survey (INSEF 2015). Prevalences were stratified by sex, age group, region, educational level and work situation. The estimated national prevalence of overweight was 38.9% (95%CI: 36.9-41.1) and the prevalence of obesity was 28.7% (95%CI: 26.8-30.6). There was a higher prevalence of overweight among males, but the prevalence of obesity was higher among females. The elderly and the individuals with the lowest level of education were those with the highest prevalence of obesity. These results suggest a high prevalence of overweight and obesity in the adult population resident in Portugal in 2015 and support the maintenance of interventions targeted at reducing the incidence and prevalence of overweight and obesity in the portuguese population.

### \_Introdução

Apesar dos esforços que têm sido feitos para travar esta epidemia, a obesidade continua a representar um dos maiores desafios de saúde pública do século XXI (1). Ao nível global, nas últimas décadas, a proporção de adultos com obesidade tem vindo a aumentar (2). Na Europa, mais de metade da população apresenta excesso de peso ou obesidade, sendo que destes 30% são obesos (3). Em Portugal, também tem sido reportada a mesma tendência de aumento, embora a maioria das estimativas nacionais se baseie no autorreporte, sendo escassos os inquéritos com medições antropométricas (4).

O primeiro inquérito que incluiu medições antropométricas (1995-1998), realizado em Portugal continental numa amostra representativa da população com idade entre os 18 e os 64 anos (n=4328), estimou que 30,8% das mulheres e 41,1% dos homens tinha excesso de peso e que 15,4% das mulheres e 12,9% dos homens eram obesos (5). Um segundo estudo de âmbito nacional (2003-2005), realizado numa amostra representativa da população com idade entre os 18 e 64 anos (n=8116), reportou uma prevalência de excesso de peso de 34,4% nas mulheres e 45,2% nos homens e uma prevalência de obesidade de 13,4% das mulheres e 15,0% dos homens (6). Em 2009 o estudo transversal "Hábitos alimentares e estilos de vida da população portuguesa" reportou que 27,8% das mulheres e 53,3% dos homens tinha excesso de peso e que 10,4% das mulheres e 11,2% dos homens eram obesos, numa amostra da população com idade entre os 18 e os 93 anos (n=3529) (7). Mais recentemente, o Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física (IAN-AF 2015-2016) reportou uma prevalência de excesso de peso de 31,0% nas

mulheres e 41,8% dos homens e uma prevalência de obesidade de 23,7% nas mulheres e 19,7% nos homens, tendo analisado uma amostra representativa da população com idade entre os 18 e os 64 anos ( $n=3445$ ) (8).

### **\_Objetivo**

O presente estudo tem como objetivo descrever as prevalências de excesso de peso e de obesidade na população portuguesa em 2015, através de medições antropométricas diretas obtidas no âmbito do 1º Inquérito Nacional de Saúde com Exame Físico (INSEF 2015) (9), estratificadas de acordo com as variáveis sexo, idade, região, nível de escolaridade e situação perante o trabalho.

### **\_Material e métodos**

O INSEF foi um estudo transversal de base populacional representativo ao nível regional e nacional, desenvolvido pelo Departamento de Epidemiologia do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) em parceria com o Instituto Norueguês de Saúde Pública e em colaboração com as cinco Administrações Regionais de Saúde do Continente e as duas Secretarias Regionais de Saúde das Regiões Autónomas dos Açores e Madeira. Os dados foram recolhidos entre fevereiro e dezembro de 2015 e a participação incluía um exame físico com medição da tensão arterial, altura, peso, perímetro da cintura e da anca, uma colheita de sangue e uma entrevista pessoal assistida por computador (CAPI). A população-alvo foram indivíduos não institucionalizados com idades entre os 25 e os 74 anos, residentes em Portugal há mais de 12 meses, capazes de acompanhar uma entrevista em português. Foi efetuada uma breve descrição dos objetivos do estudo a todos os participantes, após a qual assinaram o consentimento informado. O INSEF foi aprovado pela Comissão de Ética do INSA, pelas Comissões de Ética Regionais e pela Comissão Nacional de Proteção de Dados.

### **Amostragem**

A seleção dos participantes foi feita por amostragem probabilística, por grupos em duas etapas, estratificada por região e tipologia de área urbana (TIPAU). Na primeira etapa, foram selecionadas aleatoriamente as unidades primárias de amostragem (PSU) em cada região, com probabilidade de seleção proporcional à dimensão da população residente com idade

elegível. Na segunda etapa foram selecionados, em cada PSU, os indivíduos que constituem as unidades secundárias de amostragem (SSU), por amostragem aleatória simples, a partir das listas de utentes do Serviço Nacional de Saúde. O tamanho mínimo da amostra foi estabelecido em 600 indivíduos por cada uma das sete regiões, de forma a poder estimar uma prevalência esperada de 50%, com margem de erro absoluta de  $\pm 5\%$  a um nível de confiança de 95% considerando um efeito de desenho de 1,5. Tendo em conta as diferentes taxas de participação esperadas a nível regional, o tamanho da amostra original foi inflacionado para 12289 indivíduos a nível nacional (9).

### **Medições antropométricas**

As medições antropométricas foram sempre realizadas por um enfermeiro especificamente treinado para este efeito de acordo com os procedimentos do Inquérito Europeu de Saúde com Exame Físico (EHES) (10). A altura foi medida usando um estadiómetro portátil com um máximo de 2 metros (Seca®213) e o peso foi medido com uma balança digital portátil com capacidade de medição até 200 Kg (Seca®877). Os participantes incapazes de se manter numa posição estável em ambas as medições foram excluídos. A garantia de qualidade das medições incluiu, para além da formação dos profissionais de saúde, as visitas de auditoria, a avaliação periódica das medições, a verificação do equipamento e a calibração regular do mesmo.

### **Análise estatística**

A prevalência de excesso de peso foi estimada como a proporção de indivíduos que tinham  $25,0 \text{ Kg/m}^2 \leq \text{IMC} < 30,0 \text{ Kg/m}^2$  e a prevalência de obesidade foi estimada como a proporção de indivíduos com  $\text{IMC} \geq 30 \text{ Kg/m}^2$ .

Todas as estimativas pontuais apresentadas foram ajustadas utilizando pesos amostrais calibrados para a distribuição da população portuguesa, por sexo e grupo etário em cada uma das sete regiões de saúde para a estimativa da população residente em 2014. Para a análise comparativa, as estimativas de prevalência, estratificadas por região, nível de escolaridade e situação perante o trabalho, foram padronizadas pelo método direto para a distribuição da população portuguesa (2014) por sexo e grupo etário (9).

## Resultados

De acordo com a [tabela 1](#), a prevalência nacional de excesso de peso estimada foi de 38,9% (IC95%: 36,9-41,1) e a prevalência de obesidade foi de 28,7% (IC95%: 26,8-30,6). Foi observada uma maior prevalência de excesso de peso nos homens (45,4%), mas a prevalência de obesidade foi superior para as mulheres (32,1%).

No que respeita ao grupo etário, verificou-se que os adultos portugueses com idade compreendida entre os 45 e os 54 anos eram os mais afetados pelo excesso de peso (43,7%) e os indivíduos com idade entre os 65 e os 74 anos eram os mais afetados pela obesidade (41,8%).

A prevalência de excesso de peso oscilou entre 35,1% na região Lisboa e Vale do Tejo e 42,1% na região Norte.

Tabela 1:  Prevalência de excesso de peso e de obesidade na população adulta portuguesa (25-74 anos) em 2015, por sexo, grupo etário, região, nível de escolaridade e situação perante o trabalho.

	Excesso de peso % [IC 95%]	Obesidade % [IC 95%]
<b>Prevalência nacional (n=4888)</b>	38,9 [36,9-41,1]	28,7 [26,8-30,6]
<b>Sexo</b>		
Masculino	45,4 [42,8-48,1]	24,9 [22,3-27,5]
Feminino	33,1 [30,6-35,7]	32,1 [30,0-34,3]
<b>Grupo etário</b>		
25-34	31,0 [28,2-34,0]	12,5 [8,6-18,0]
35-44	36,8 [33,6-40,2]	22,9 [20,1-26,0]
45-54	43,7 [40,0-47,5]	29,5 [26,4-32,7]
55-64	42,9 [39,4-46,6]	38,9 [34,3-43,7]
65-74	39,5 [33,4-45,9]	41,8 [35,5-48,3]
<b>Região*</b>		
Norte	42,1 [37,3-46,8]	28,2 [26,4-30,5]
Centro	40,8 [36,5-44,9]	29,1 [22,8-35,3]
Lisboa e Vale do Tejo	35,1 [33,4-37,3]	29,1 [25,2-33,1]
Alentejo	38,1 [35,2-40,7]	30,3 [25,9-33,8]
Algarve	37,2 [34,3-40,2]	23,2 [20,7-26,4]
Região Autónoma da Madeira	41,2 [37,2-45,2]	29,1 [27,3-33,1]
Região Autónoma da Madeira	37,9 [36,2-41,9]	32,5 [31,9-35,7]
<b>Nível de escolaridade*</b>		
Nenhum/1º ciclo do ensino básico	41,6 [31,7-52,2]	39,4 [24,5-56,7]
2º/3º ciclo do ensino básico	39,2 [34,9-43,8]	28,6 [25,7-31,7]
Ensino secundário	40,2 [35,9-44,7]	25,1 [20,6-30,3]
Ensino superior	42,8 [37,5-48,3]	19,5 [14,7-25,4]
<b>Situação perante o trabalho*</b>		
Com atividade profissional remunerada	27,5 [24,8-30,5]	39,5 [37,3-41,7]
Desempregados	30,6 [26,7-34,6]	37,7 [31,0-45,0]
Sem atividade profissional remunerada <sup>1</sup>	35,5 [27,3-44,6]	36,4 [30,2-43,2]

\* Prevalências padronizadas pelo método direto para a distribuição da população portuguesa (2014), por sexo e grupo etário.

<sup>1</sup> Inclui estudantes, domésticas e reformados.

A prevalência da obesidade oscilou entre 23,2% na região Algarve e 32,5% na Região Autónoma dos Açores.

Verificou-se ainda que os adultos portugueses com menor nível de escolaridade tinham maior prevalência de obesidade (39,4%), mas o grupo de indivíduos com ensino superior era o mais afetado pelo excesso de peso (42,8%). O grupo de indivíduos sem atividade profissional remunerada (estudantes, domésticas e reformados) eram os que tinham prevalência mais elevada de excesso de peso e a prevalência de obesidade era maior para os indivíduos com atividade profissional remunerada, embora não existam diferenças estatisticamente significativas.

### **Discussão e conclusões**

Através dos resultados do presente estudo foi possível verificar que, em 2015, 38,9% da população adulta (25-74 anos) residente em Portugal tinha excesso de peso e 28,7% sofria de obesidade. A prevalência de excesso de peso era maior no sexo masculino, enquanto que a prevalência de obesidade era maior no sexo feminino. O nível educacional, tal como anteriormente reportado por outros estudos (6,7,11,12), parece ser um fator socioeconómico importante para a prevalência de obesidade, sendo os indivíduos com menor escolaridade os mais afetados por esta condição.

Comparativamente aos resultados obtidos em 2003-2005 (6), verifica-se que, num período de 10 anos, a prevalência de excesso de peso manteve-se estável (cerca de 39% em ambos os estudos), enquanto a prevalência de obesidade duplicou (14,2% versus 28,6%). Em 2005 eram os homens os mais afetados pelo excesso de peso e pela obesidade, enquanto que em 2015, as mulheres passaram a ser as mais afetadas pela obesidade. Por outro lado, o aumento da prevalência de obesidade parece ter-se verificado em todos os grupos etários. Apesar de todos os aspetos referidos anteriormente, é necessário ter em consideração que a população-alvo em 2005 (18 a 64 anos e apenas no Continente) não era completamente comparável à população-alvo estudada no INSEF (25 a 74 anos, incluindo as Regiões Autónomas dos Açores e da Madeira).

Os resultados obtidos pelo INSEF vão ao encontro dos resultados obtidos recentemente através do Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física (IAN-AF 2015-2016) (8) que reportou uma prevalência de excesso de peso de 36,5% e uma prevalência de obesidade de 21,6% nos adultos portugueses (18-64 anos). As diferenças etárias das populações-alvo consideradas entre os dois estudos poderá explicar as diferenças entre os valores de prevalências reportados.

Comparativamente com os outros países da Europa, a prevalência de obesidade estimada para a população portuguesa era uma das mais elevadas, juntamente com as prevalências recentemente reportadas para a Inglaterra (26%) (13) e para a Escócia (29%) (14). O Observatório da Saúde Global reportou, entre 2010 e 2014, aumentos na prevalência de obesidade para a grande maioria dos países europeus (15). Apesar de diferenças nos métodos utilizados pelos diferentes inquéritos realizados nos vários países, a elevada prevalência de obesidade constitui um motivo de preocupação em toda a Europa.

Várias medidas têm sido tomadas nos diferentes países para combater esta tendência (16). Em Portugal, têm sido delineadas várias estratégias para lidar com este problema nomeadamente através do Programa Nacional de Combate à Obesidade, que integrou o Plano Nacional de Saúde de 2004-2010 (17) e que tinha como principal objetivo travar o crescimento da prevalência de excesso de peso e de obesidade. Este plano foi extinto em 2008, com a integração das suas competências na Plataforma contra a Obesidade, criada em 2007. No Plano Nacional de Saúde de 2012-2016 (18), a problemática da obesidade não surge isolada entre as prioridades de intervenção nacional, embora tenha sido considerada no Plano Nacional de Saúde: Revisão e Extensão para 2020 (19) através do Programa Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável (20) e nos Planos Regionais de Saúde. No entanto, tendo em conta os resultados apresentados, a efetividade das medidas até agora implementadas parece ainda não ser evidente, revelando a complexidade deste problema.

**Referências bibliográficas:**

- (1) Arroyo-Johnson C, Mincey KD. Obesity Epidemiology Worldwide. *Gastroenterol Clin North Am.* 2016; 45:571-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5599163/>
- (2) Ng M, Fleming T, Robinson M, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* 2014; 384(9945): 766-81.
- (3) World Health Organization. The challenge of obesity in the WHO European Region and the strategies for response: summary. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe, 2007. [http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0008/98243/E89858.pdf](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0008/98243/E89858.pdf)
- (4) Marques-Vidal P, Paccaud F, Ravasco P. Ten-year trends in overweight and obesity in the adult Portuguese population, 1995 to 2005. *BMC Public Health.* 2011;11:772. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-11-772>
- (5) Do Carmo I, Carreira M, Almeida MD, et al. Prevalence of obesity in Portuguese population. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000;24:S91. (Posters Track 6: abstracts 288). <https://www.nature.com/articles/0801410.pdf>
- (6) Do Carmo I, Dos Santos O, Camolas J, et al. Overweight and obesity in Portugal: national prevalence in 2003-2005. *Obes Rev.* 2008;9(1):11-19.
- (7) Kowalkowska J, Poinhos R, Franchini B, et al. General and abdominal adiposity in a representative sample of Portuguese adults: dependency of measures and socio-demographic factors' influence. *Br J Nutr.* 2016;115(1):185-92.
- (8) Lopes C, Torres D, Oliveira A. Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física (IAN-AF 2015-2016). Relatório de resultados. Porto: Univeridade do Porto, 2017. <https://ian-af.up.pt/resultados>
- (9) Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. 1º Inquérito Nacional de Saúde com Exame Físico (INSEF 2015): relatório metodológico. Lisboa: INSA, 2016. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/3832>.
- (10) Tolonen H (ed). EHES Manual Part B. Fieldwork Procedures. Helsinki: National Institute of Health and Welfare, 2013. <http://www.julkari.fi/handle/10024/131503>
- (11) Robertson A, Lobstein T, Knai C. Obesity and socioeconomic groups in Europe: evidence review and implications for action. Brussels: European Commission, 2007. [http://ec.europa.eu/health/ph\\_determinants/life\\_style/nutrition/documents/ev20081028\\_rep\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_determinants/life_style/nutrition/documents/ev20081028_rep_en.pdf)
- (12) Devaux M, Sassi F. Social inequalities in obesity and overweight in 11 OECD countries. *Eur J Public Health.* 2013;23(3):464-9.
- (13) Rachel Scantlebury R, Moody A. Adult Obesity and overweight. In: Health Survey for England 2014: health, social care and lifestyles. Chapter 9. <http://content.digital.nhs.uk/catalogue/PUB19295>
- (14) The Scottish Health Survey 2015: Volume 1: Main Report <http://www.gov.scot/Publications/2016/09/2764>
- (15) Global Health Observatory. Obesity: data by country. Geneva: World Health Organization. [www.who.int/gho/ncd/risk\\_factors/overweight/en/](http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight/en/)
- (16) Branca F, Nikogosian H, Lobstein T. The challenge of obesity in the WHO European Region and the strategies for response: summary. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe, 2007. [http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0008/98243/E89858.pdf?ua=1](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0008/98243/E89858.pdf?ua=1)
- (17) Direção-Geral da Saúde. Plano Nacional de Saúde 2004-2010. Lisboa: DGS, 2004. <http://pns.dgs.pt/pns-2004-2010/>
- (18) Direção-Geral da Saúde. Plano Nacional de Saúde 2012-2016. Lisboa: DGS, 2012. <http://pns.dgs.pt/pns-2012-2016/>
- (19) Direção-Geral da Saúde. Plano Nacional de Saúde: revisão e extensão para 2020 Lisboa: DGS, 2015. <http://pns.dgs.pt/pns-revisao-e-extensao-a-2020/>.
- (20) Direção-Geral da Saúde. Programa Nacional para a Promoção da Alimentação saudável. DGS: Lisboa, 2013. <http://www.alimentacaosaudavel.dgs.pt/pnpas/>

## Desenvolvimento de um ensaio de sequenciação de nova geração para acelerar o diagnóstico molecular das doenças lisossomais de sobrecarga

*Development of a next generation sequencing assay for a prompt molecular diagnosis of lysosomal storage disorders*

Marisa Encarnação<sup>1</sup>, Maria Francisca Coutinho<sup>1</sup>, Lisbeth Silva<sup>1</sup>, Liliana Matos<sup>1</sup>, Diogo Ribeiro<sup>1</sup>, Célia Nogueira<sup>2</sup>, Paulo Gaspar<sup>2</sup>, Laura Vilarinho<sup>2</sup>, Sandra Alves<sup>1</sup>

sandra.alves@insa.min-saude.pt

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

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

### \_Resumo

As doenças lisossomais de sobrecarga (DLS) são um grupo de cerca de 70 doenças hereditárias do metabolismo. A sua apresentação clínica é muito heterogénea, variando desde formas pré-natais, até apresentações infantis ou na idade adulta, sendo frequente a presença de atraso psicomotor e neurodegeneração progressiva. Nas DLS, um diagnóstico molecular preciso é muito importante dado que novas terapias têm sido desenvolvidas e se encontram disponíveis. Para a maioria destas doenças o diagnóstico é difícil devido à considerável heterogeneidade clínica e à sobreposição de sintomas com outras doenças, podendo os doentes permanecer sem diagnóstico durante décadas. A sequenciação de nova geração (NGS), sendo a tecnologia de sequenciação mais avançada no momento, torna-se uma metodologia essencial num laboratório dedicado ao diagnóstico de doenças metabólicas, incluindo as DLS. Desde o início de 2017, foram incluídos neste projeto 18 doentes com suspeita clínica de DLS, tendo sido esclarecida a etiologia molecular em 39% (7/18). Este estudo contribuiu assim para alargar o espectro mutacional das DLS, permitindo o aconselhamento genético aos familiares, oferecer diagnóstico pré-natal molecular e selecionar a abordagem terapêutica mais adequada.

### \_Abstract

*Lysosomal storage disorders (LSD) are a group of approximately 70 inherited metabolic disorders, characterized by a broad clinical spectrum with respect to severity of symptoms, progression and age of onset. The molecular diagnosis is very important once new therapeutic solutions are emerging but using traditional approaches the diagnosis can be time consuming, since the patients present overlapping symptoms and several genes have to be tested. Next generation sequencing (NGS) is an essential methodology for the diagnosis of metabolic diseases, namely LSD. Since 2017, we have studied 18 patients with a clinical suspicion of LSD and we were able to find the disease-causing mutation in 39% (7/18). This project contributed to expand the mutational spectrum in the etiology of these disorders and, most important to provide a molecular diagnosis and prenatal counseling to the affected families. In some cases it has allowed health professionals/physicians to provide the access to therapy.*

### \_Introdução

As doenças lisossomais de sobrecarga (DLS) formam um grupo de cerca de 70 doenças metabólicas (1) com uma prevalência aproximada a nível mundial que pode atingir 1:5000 nados-vivos quando todas as DLS são consideradas (2). Na população portuguesa a prevalência das DLS no seu conjunto é cerca de 1:4000 recém-nascidos (3). Estas patologias caracterizam-se, a nível primário, pela acumulação no lisossoma de substratos não degradados ou parcialmente degradados, e, posteriormente, pela lesão de outros organelos (1), culminando em disfunção tecidual e orgânica generalizada. Os defeitos ocorrem em genes que codificam para proteínas lisossomais membranares e solúveis, para proteínas ativadoras e também para proteínas não lisossomais (residentes no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi) (4).

As DLS têm uma apresentação clínica muito heterogénea tanto no que diz respeito à complexidade e variedade dos sintomas como à idade de aparecimento dos primeiros sintomas, situação que depende da atividade residual da enzima afetada, das propriedades bioquímicas do material armazenado e ainda do tipo de células onde maioritariamente ocorre a sobrecarga (1,5). Os sinais clínicos mais frequentes são alterações neurológicas, oculares, ósseas, cardiovasculares, cutâneas, hematológicas, organomegalia e dismorfia facial (6).

O número de terapias disponíveis nos últimos anos tem aumentado consideravelmente, estando de momento disponíveis abordagens terapêuticas para dez doenças (7). A maioria destas abordagens é de terapia de substituição enzimática, mas também existem terapias de redução de substrato e tera-

plas de *chaperone*. Em alguns casos o transplante de células estaminais hematopoiéticas é também possível. Atualmente, estão em desenvolvimento abordagens de terapias génica e outras abordagens moleculares inovadoras (7). No entanto, a eficácia de muitas terapias é limitada porque os tratamentos são geralmente iniciados quando o doente apresenta sintomas, o que significa que as alterações nos órgãos-alvo já ocorreram. Para contornar esta situação, é essencial que o diagnóstico molecular seja efetuado o mais precocemente possível (8). É também muito importante conhecer o defeito molecular para saber se outros familiares têm a mutação ou mutações causais e, se aplicável, poderem iniciar um tratamento.

### \_Objetivo

Desenvolver um fluxo de trabalho de sequenciação de nova geração (NGS) (painel de genes) para a identificação das mutações causais em doentes com quadro clínico de DLS, permitindo num único teste a análise simultânea de 96 genes envolvidos em vias metabólicas relacionadas com o lisossoma e o peroxissoma com uma rapidez e um custo por análise que as metodologias clássicas não permitem.

### \_Doentes e métodos

Entre 2017 e 2018 foram estudados 23 doentes, provenientes de vários Centros Hospitalares do país e ainda do Hospital Farhat Hached – Sousse da Tunísia e do Hospital Amrita na Índia. Estes doentes foram assinalados com suspeita clínica e/ou parâmetros bioquímicos sugestivos de DLS. Para a preparação das amostras foi utilizado DNA genómico extraído a partir de sangue periférico e foram seguidas as instruções do fabricante para painéis customizados (SureSelect QXT da Agilent). A análise foi realizada num sequenciador MiSeq (Illumina), adquirido através do projeto de investigação do NORTE 2020 (NORTE-01-0246-FEDER-000014 DESVENDAR “DESCobrir, VENcer as Doenças rARas”). Os resultados foram analisados com programas já otimizados para esta tecnologia de NGS (9).

As variantes previamente classificadas na literatura como mutações patogénicas ou variantes novas com previsões *in-silico* sugestivas de patogenicidade, foram confirmadas por sequenciação de Sanger. Quando disponíveis amostras de outros membros da família realizaram-se estudos de co-segregação. Para 3 doentes estão a ser efetuados estudos funcionais, de forma a clarificar o impacto das mutações novas encontradas.

### \_Resultados

Após a avaliação dos parâmetros de qualidade da corrida, procedeu-se à análise dos resultados, tendo-se obtido uma profundidade de leitura média de 261x por amostra. Foram analisados 23 doentes, dos quais 5 foram incluídos como controlos positivos para validar o painel de genes (a mutação causal já era conhecida). Dos 18 doentes sem diagnóstico foram identificadas as mutações causadoras de doença em 7 casos (figura 1), das quais 4 não estavam descritas nas principais bases de dados. A patogenicidade das mutações não descritas foi estudada numa primeira fase por *pipelines* bioinformáticas e os resultados foram consistentes.

Relativamente aos diagnósticos moleculares que nos foi possível efetuar, o primeiro doente apresentava uma suspeita de lipofuscinose ceróide neuronal (NCL), tendo sido encontrada uma mutação patogénica no gene *MFSD8*, o que corresponde a uma variante infantil tardia da doença – CLN7. O segundo tinha uma suspeita de doença de Krabbe e o terceiro apresentava um quadro neurológico mas sem nenhuma suspeita do tipo em particular, tendo-se identificado a mutação causal em ambos os casos, nos genes *GALC* e *GM2A*, respetivamente. Os restantes 4 doentes diagnosticados tinham uma suspeita clínica de Niemann-Pick (NP), de Beta-mansidose, de Mucopolissacaridose tipo III (MPS III) e doença de Gaucher. A análise molecular permitiu-nos a identificação de mutações causais nos genes *NPC1*, *MAN2B1*, *NAGLU* e *GBA* e a reclassificação de 3 doentes para NP tipo C, Alfa-mansidase e MPS IIIB (tabela 1).



Figura 1: Representação esquemática do fluxo de trabalho de análise das variantes obtidas no painel de NGS.

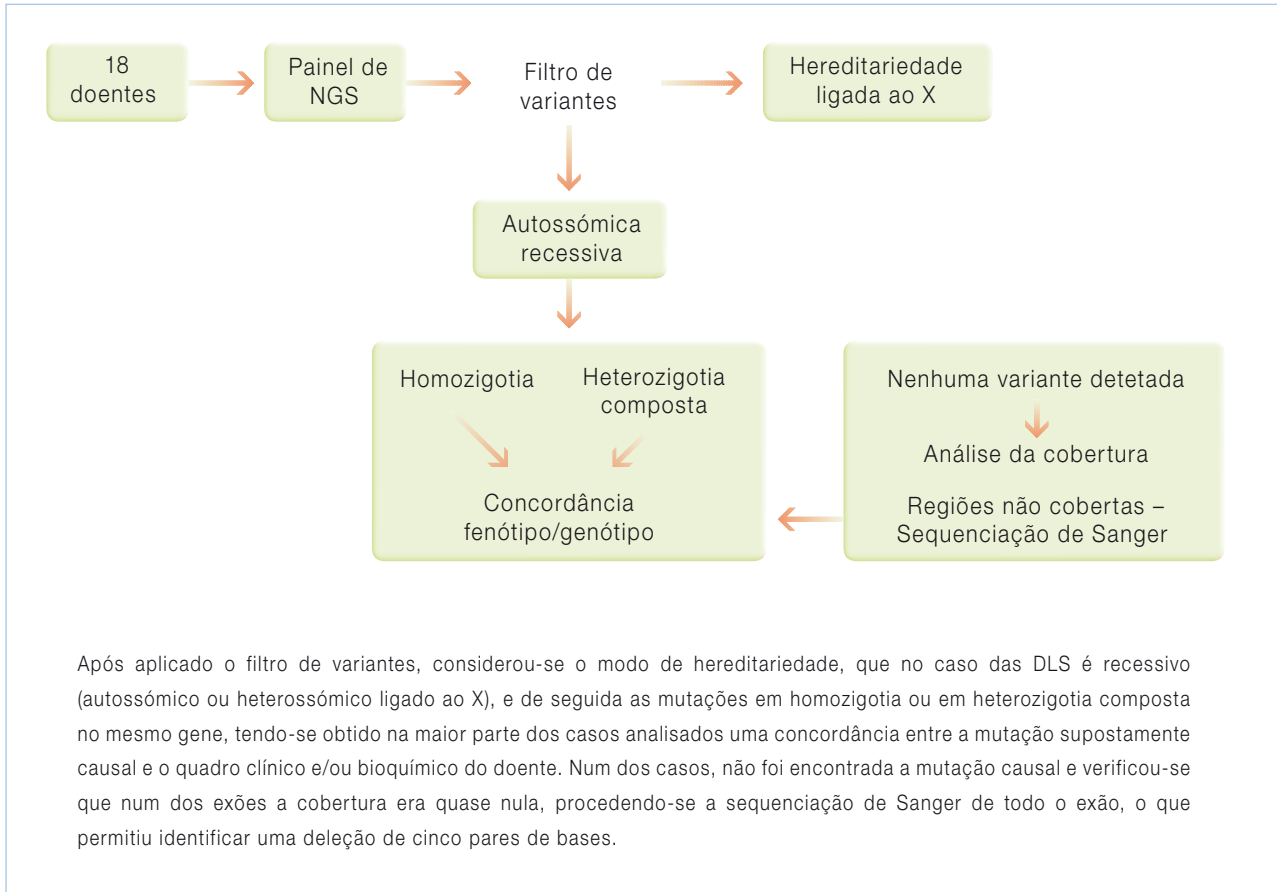


Tabela 1: Apresentação dos casos de DLS diagnosticados por NGS: identificação da mutação causal para classificação mais precisa da doença.

Diagnóstico clínico	Gene	Diagnóstico molecular
Lipofuscinose Ceróide Neuronal	<i>MFSD8</i>	CLN7 Variante infantil tardia de NCL
Doença de Krabbe	<i>GALC</i>	Doença de Krabbe
Sem suspeita específica (quadro neurológico indicativo de DLS)	<i>GM2A</i>	Gangliosidose GM2 variante AB
Niemann-Pick	<i>NPC1</i>	Niemann-Pick tipo C
Beta-mansidose	<i>MAN2B1</i>	Alfa-mansidose
Mucopolissacaridose	<i>NAGLU</i>	Mucopolissacaridose tipo IIIB
Doença de Gaucher	<i>GBA</i>	Doença de Gaucher

## \_Discussão

A sequenciação de larga escala é muito importante no diagnóstico das DLS devido ao seu largo espectro fenotípico e sobreposição de sintomas. Em especial, para os casos em que o diagnóstico bioquímico não está disponível ou quando existe um grupo de doenças em que a clínica é muito semelhante mas o gene afetado é diferente, como é o caso das NCL, um subgrupo das DLS. Também no caso da Gangliosidose GM2, as três variantes da doença são muito semelhantes clinicamente e o diagnóstico bioquímico não está disponível na maior parte dos laboratórios. No entanto, esta plataforma de NGS possibilitou o diagnóstico molecular da Gangliosidose GM2A variante AB, que é uma variante com poucos casos descritos a nível mundial.

Em resumo, o presente estudo permitiu esclarecer a etiologia molecular de 39% dos doentes estudados, valor que se aproxima do obtido noutros estudos (10,11).

Relativamente aos 11 doentes que permanecem sem diagnóstico molecular, não se pode excluir a presença de mutações nas regiões intrónicas (o painel só cobre as regiões intrónicas flanqueadoras), grandes deleções ou inserções uma vez que estas não são detetadas por esta técnica de NGS. De forma a fazer o acompanhamento destes doentes, o plano a médio prazo é incluir estes doentes num painel de genes mais alargado (cerca de 200), bem como em estudos de sequenciação do genoma *Whole Exome Sequencing* (WES), na tentativa de identificar mutações exónicas em novos genes.

## \_Conclusão

Na última década, o diagnóstico molecular por NGS tem-se revelado muito importante pois permite sequenciar um elevado número de genes de um modo mais rápido e económico. A transferência desta tecnologia da investigação para o diagnóstico de rotina, na Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética do Departamento de Genética Humana do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, vai melhorar o diagnóstico das DLS, permitindo oferecer um aconselhamento genético e diagnóstico pré-natal às famílias afetadas. Em determinados casos, pode também decidir se um doente pode iniciar a terapia disponível para o seu caso.

## Agradecimentos:

Estudo financiado pelo Programa NORTE 2020 (NORTE-01-0246-FEDER-000014, DESVENDAR “DESCobrir, VENcer as Doenças rARas”) - aquisição de equipamentos para a realização da sequenciação de nova geração.

## Referências bibliográficas:

- (1) Cox TM, Cachon-Gonzalez MB. The cellular pathology of lysosomal diseases. *J Pathol.* 2012;226(2):241-54.
- (2) Fuller M, Meikle PJ, Hopwood JJ. Chapter 2 - Epidemiology of lysosomal storage diseases: an overview. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G (eds). *Fabry disease: perspectives from 5 years of FOS.* Oxford: Oxford PharmaGenesis, 2006.
- (3) Pinto R, Caseiro C, Lemos M, et al. Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur J Hum Genet.* 2004;12(2):87-92. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201044>
- (4) Ballabio A, Gieselmann V. Lysosomal disorders: from storage to cellular damage. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1793(4):684-96. Epub 2008 Dec 8. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.12.001>
- (5) Platt FM, Boland B, van der Spoel AC. The cell biology of disease: lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction. *J Cell Biol.* 2012;199(5):723-34. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3514785/>
- (6) Coutinho MF, Alves S. From rare to common and back again: 60 years of lysosomal dysfunction. *Mol Genet Metab.* 2016; 117(2):53-65. Epub 2015 Aug 18.
- (7) Beck M. Treatment strategies for lysosomal storage disorders. *Dev Med Child Neurol.* 2018;60(1):13-18. Epub 2017 Nov 1.
- (8) Meikle PJ, Hopwood JJ. Lysosomal storage disorders: emerging therapeutic options require early diagnosis. *Eur J Pediatr.* 2003;162(Suppl 1):S34-7.
- (9) Nogueira C, Pereira C, Silva L, et al. Avanços no diagnóstico das doenças mitocondriais através da sequenciação de nova geração. *Boletim Epidemiológico Observações.* 2018;7(21):5-8. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/5546>
- (10) Wong LJ. Next generation molecular diagnosis of mitochondrial disorders. *Mitochondrion.* 2013;13(4):379-87.
- (11) Legati A, Reyes A, Nasca A, et al. New genes and pathomechanisms in mitochondrial disorders unraveled by NGS technologies. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1857(8):1326-35. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.02.022>

## Associação entre variantes genéticas e perfil clínico multidimensional de doentes com perturbação do espectro do autismo: uma abordagem integrativa

Complex associations between genetic variants and clinical profiles in autism spectrum disorder patients: an integrative systems biology approach

Muhammad Asif<sup>1</sup>, Hugo Martiniano<sup>1</sup>, Francisco Couto<sup>2</sup>, Astrid M. Vicente<sup>1</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) Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.

### \_Resumo

A complexidade genética e clínica que caracterizam a perturbação do espectro do autismo (PEA) têm limitado o desenvolvimento de biomarcadores que permitam um diagnóstico precoce e um prognóstico fiável, assim como uma abordagem personalizada para a intervenção terapêutica. Neste estudo pretendeu-se desenvolver uma abordagem integrativa para predição da apresentação clínica baseada em informação de variantes genéticas (*Copy Number Variants*, CNVs), com aplicação clínica no diagnóstico e prognóstico na PEA. Para tal, técnicas de aprendizagem automática (*machine learning*) foram aplicadas a dados clínicos e genéticos de 2446 doentes com PEA, recrutados no âmbito do consórcio *Autism Genome Project*. Análise de *clustering* de dados clínicos multidimensionais definiu, nesta população, dois subgrupos de pacientes com perfis clínicos diferindo significativamente em termos de capacidade verbal, nível cognitivo, gravidade da doença e comportamento adaptativo. A análise dos CNVs que afetam especificamente genes do cérebro, nos mesmos indivíduos, identificou 15 processos biológicos enriquecidos em genes alterados. A aplicação de um algoritmo de *machine learning* para classificação dos doentes com apresentação clínica mais disfuncional, com base nos processos biológicos alterados, mostrou que correlações entre fenótipo clínico e biologia subjacente são possíveis na PEA e que, para grupos populacionais com dados informativos, existe um poder preditivo razoável. Para implementação deste conceito na prática clínica serão necessários estudos mais alargados com dados clínicos e genómicos mais completos.

### \_Abstract

The genetic and clinical complexity that characterize Autism Spectrum Disorder (ASD) has hindered the development of biomarkers for early diagnosis and reliable prognosis, as well as a personalized to therapeutic intervention. This study aimed to develop an integrative approach for clinical presentation prediction based on Copy Number Variants (CNVs), with clinical application for diagnosis and prognosis of ASD. For this purpose, machine learning techniques were applied to a dataset of 2446 patients with ASD, recruited by the Autism Genome Project. Clustering analysis of multidimensional clinical data allowed the definition of two patient subgroups in this population, with clinical profiles differing significantly in verbal ability, cognitive level, disease severity and adaptive behavior. In the same subjects, analysis of CNVs specifically affecting brain-expressed genes identified 15 biological processes enriched for the disrupted genes. A machine learning algorithm was trained and tested to classify patients with more dysfunctional clinical presentation based on altered biological processes. The results showed that correlations between clinical phenotype and underlying biology can be established in ASD and that, for datasets with sufficiently informative data, there is a reasonable predictive power. Further studies with more complete clinical and genomic data are needed to implement this concept in clinical practice.

### \_Introdução

A perturbação do espectro do autismo (PEA) é uma patologia do neurodesenvolvimento com apresentação clínica muito heterogénea, variando a gravidade, o nível cognitivo, as alterações de linguagem, o comportamento adaptativo e a presença de co-morbilidades como a epilepsia ou o défice intelectual (1). A PEA tem subjacente uma arquitetura genética complexa e pouco esclarecida, que envolve mais de uma centena de genes diferentes (2). Em cerca de 20% dos casos é possível um diagnóstico etiológico, consistindo na sua grande maioria de deleções ou duplicações de segmentos do genoma designadas como *Copy Number Variants* (CNVs). Cada CNV associado à PEA é individualmente raro mas, dada a grande diversidade encontrada em pessoas com esta patologia, no seu conjunto os CNVs explicam uma fração substancial do risco genético. Um CNV pode abranger um ou mais genes implicados na PEA, perturbando processos biológicos específicos e resultando em apresentações clínicas variáveis (2).

### \_Objetivo

Dada a ausência de biomarcadores, o diagnóstico da PEA é inteiramente comportamental, dificultando um diagnóstico precoce e um prognóstico preciso.

O objetivo do presente estudo foi o desenvolvimento de um método preditivo para a apresentação clínica da PEA, a partir da identificação de variantes genéticas, e consequentes alterações em processos biológicos, como biomarcadores para diagnóstico e prognóstico.

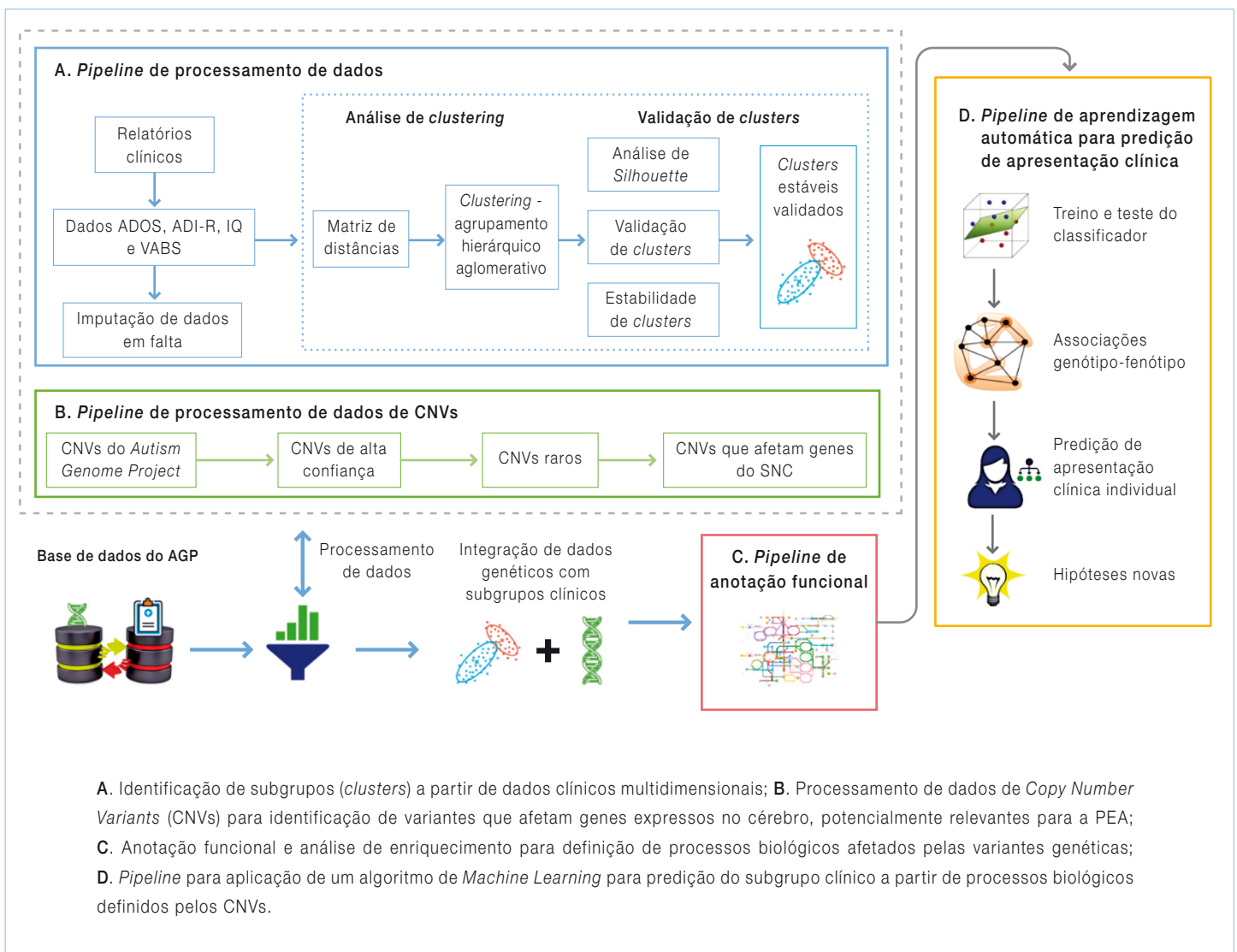
## \_Método

Foi definida uma abordagem integrativa, baseada em técnicas sofisticadas de aprendizagem automática (*machine learning*) supervisionadas e não supervisionadas (3-5), para predição da apresentação clínica associada a alterações em processos biológicos devidas a deleções ou duplicações de genes expressos no sistema nervoso central (SNC). Esta abordagem está esquematicamente representada na [figura 1](#).

## \_Resultados

Numa primeira fase pretendeu-se agregar doentes com apresentações clínicas variáveis em subgrupos mais homogêneos. Com este fim, foram analisados os relatórios clínicos, anonimizados, de 2446 casos de PEA recrutados no âmbito do consórcio internacional *Autism Genome Project* (AGP) (6). Os relatórios clínicos disponibilizam múltiplas medidas clinicamente relevantes, e neste estudo foram focadas essencialmente a gravidade da PEA (definida através de um instrumento estruturado de diagnóstico, o *Autism Diagnostic Observation Schedule*, ADOS), a função adaptati-

Figura 1: Representação esquemática da abordagem integrativa para identificação de associações entre variantes genéticas, processos biológicos correspondentes e apresentação clínica.



va (avaliada utilizando a *Vineland Adaptive Behavior Scale*, VABS), a competência cognitiva (avaliada utilizando várias metodologias) e a verbalidade (a partir da *Autism Diagnostic Interview*, ADI). Partindo destes dados clínicos multidimensionais, uma análise empregando agrupamento hierárquico aglomerativo (análise de *clusters*) (3) identificou dois subgrupos de doentes clinicamente mais homogêneos (figura 2). Ambos os subgrupos (*clusters*) identificados são coesos (métrica de *Silhouette value* (7) médio para os dois *clusters* de 0,571) e estáveis (estabilidade de 0,998 e 0,996 para os *Clusters* 1 e 2, respetivamente). Em termos clínicos, os dois subgrupos diferem significativamente nos múltiplos parâmetros avaliados (tabela 1), sendo o *Cluster* 1 constituído por uma proporção maior de indivíduos com uma apresentação clínica mais ligeira e nível cognitivo normal, enquanto o *Cluster* 2 apresenta uma elevada proporção de casos de maior gravidade, não-verbais, com baixo nível cognitivo e comportamento adaptativo disfuncional.

Para os casos de PEA recrutados pelo AGP são conhecidas também as variantes genéticas raras, nomeadamente os CNVs. Neste estudo foram avaliados especificamente CNVs que deletam ou duplicam genes expressos no SNC e, como tal, de potencial relevância para o autismo (8).

Figura 2: ↓ *Clusters* de pacientes com perturbação do espectro do autismo.

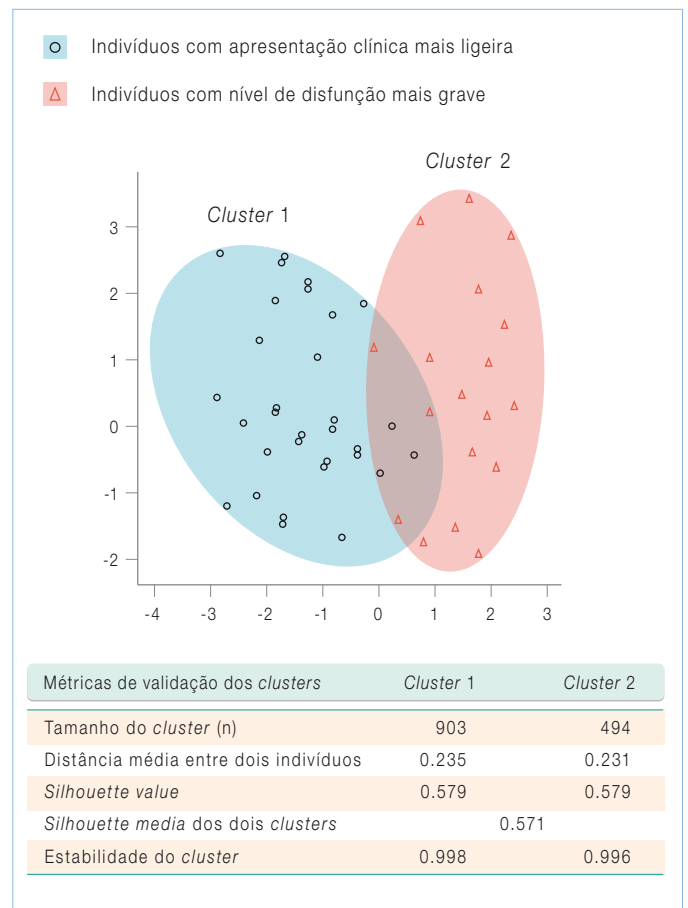


Tabela 1: ↓ Caracterização clínica dos *clusters*.

Parâmetro clínico	Categorias clínicas	Cluster 1 n (%)	Cluster 2 n (%)	P-value
ADIR estatuto verbal	ADI-R-não-verbal	0 (0)	494 (100)	<0.00001 <sup>a</sup>
	ADI-R-verbal	903 (100)	0 (0)	
ADOS nível de gravidade	ADOS Nível de gravidade Autismo (cotação 6-10)	714 (79,07)	392 (79,35)	<0.00001 <sup>b</sup>
	ADOS Nível de gravidade PEA (cotação 4-5)	64 (7,09)	102 (20,65)	
	ADOS Nível de gravidade <i>Non-spectrum</i> (cotação 1-3)	125 (13,84)	0 (0)	
VABS comunicação	VABS comunicação disfuncional (cotação ≤ 70)	307 (34)	493 (99,8)	<0.00001 <sup>a</sup>
	VABS comunicação normal (cotação > 70)	596 (66)	1 (0,2)	
VABS autonomia	VABS autonomia disfuncional (cotação ≤ 70)	478 (52,94)	484 (97,98)	<0.00001 <sup>b</sup>
	VABS autonomia normal (cotação > 70)	425 (47,07)	10 (2,02)	
VABS socialização	VABS socialização disfuncional (cotação ≤ 70)	497 (55,04)	490 (99,19)	<0.00001 <sup>a</sup>
	VABS socialização normal (cotação > 70)	406 (44,96)	4 (0,81)	
QI de realização	Incapacidade grave (cotação < 50)	2 (0,22)	218 (44,13)	<0.00001 <sup>b</sup>
	Incapacidade moderada (cotação ≥ 50 and ≤ 70)	31 (3,43)	125 (25,3)	
	Capacidade normal (cotação > 70)	870 (96,35)	151 (30,57)	
Género	Masculino	830 (91,92)	417 (84,41)	0.000015 <sup>b</sup>
	Feminino	73 (8,08)	77 (15,59)	

<sup>a</sup> Fisher Exact Test <sup>b</sup> Chi-Square Test

Para identificação dos processos biológicos potencialmente afetados por estes CNVs, efetuou-se uma análise de enriquecimento funcional de genes (9). Esta análise, baseada em anotações funcionais disponíveis em bases de dados e literatura, avalia conjuntos de genes que partilham a mesma função biológica, e permite identificar os processos biológicos “enriquecidos” em genes do SNC afetados pelos CNVs. Entre os 15 processos biológicos identificados nesta análise como significativamente enriquecidos incluem-se “desenvolvimento do sistema nervoso”, “cognição” e “poli-ubiquitinação de proteínas”, reforçando múltiplos estudos prévios sobre a biologia subjacente à PEA (tabela 2). Os 15 processos biológicos identificados contribuem todos positivamente para a classificação dos doentes nos *clusters* definidos.

Para atingir o objetivo final, nomeadamente a predição da apresentação clínica a partir dos processos biológicos definidos pelas alterações genéticas identificadas nos pacientes, utilizou-se o método de aprendizagem automática supervisio-

nada de Naive-Bayes (5). Este método usa um algoritmo de classificação baseado no Teorema de Bayes para treino e teste de modelos preditivos. O classificador foi treinado assumindo que indivíduos com uma apresentação clínica mais disfuncional, agrupados no *Cluster 2*, apresentariam um padrão de processos biológicos alterados diferente dos doentes associados ao *Cluster 1*, caracterizados por uma disfunção mais ligeira. Num total de 1300 doentes com dados clínicos de *clustering* e informação sobre processos biológicos alterados, o classificador não teve um bom desempenho preditivo, apresentando baixos níveis de exatidão. Para compreender melhor os resultados obtidos, foi calculado um índice de Conteúdo de Informação (CI) para os processos biológicos identificados em cada participante. Para os 325 indivíduos com maior índice de CI, correspondentes ao 4º quartil, o desempenho do classificador de Naive-Bayes melhorou significativamente, apresentando valores de precisão de 0,82 e especificidade de 0,70, embora uma sensibilidade de 0,39 (tabela 3).

Tabela 2: ⬇️ Processos biológicos enriquecidos em genes expressos no SNC afetados por CNVs.

Parâmetro clínico	Genes (n)	FDR <i>p</i> -value
<i>Homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules</i>	53	6.30E-09
<i>Cell-cell adhesion via plasma-membrane adhesion molecules</i>	66	1.70E-07
<i>Cellular component organization or biogenesis</i>	944	5.70E-05
<i>Cellular component organization</i>	915	7.00E-05
<i>Cellular component biogenesis</i>	475	0.00066
<i>Cellular component assembly</i>	434	0.00177
<i>Nervous system development</i>	363	0.00215
<i>Organelle organization</i>	562	0.00475
<i>Protein polyubiquitination</i>	64	0.00592
<i>Cell projection organization</i>	231	0.00836
<i>Cellular localization</i>	418	0.0091
<i>Single-organism behavior</i>	83	0.0196
<i>Regulation of cellular component organization</i>	364	0.0257
<i>Plasma membrane bounded cell projection organization</i>	223	0.0282
<i>Cognition</i>	56	0.0364
<i>Single-organism organelle organization</i>	263	0.044

FDR – False Discovery Rate

**Tabela 3:** Desempenho do algoritmo de Naive-Bayes na predição da apresentação clínica, de acordo com o conteúdo informativo dos processos biológicos.

Dados usados para a classificação	n	Precisão	Sensibilidade	Especificidade	FDR $p$ -value
Todos os casos de PEA	1300	0.221	0.379	0.655	0.279
Casos de PEA nos últimos 3 quantis de CI	974	0.29	0.389	0.672	0.329
Casos de PEA no 3º e 4º quantil de CI	649	0.23	0.384	0.65	0.284
Casos de PEA no 4º quantil, com CI mais elevado	325	0.816	0.389	0.699	0.526

PEA – perturbação do espetro do autismo CI – Conteúdo de Informação

## Conclusões

O estudo presente indica que, para a PEA, é possível estabelecer correlações entre a apresentação clínica e uma arquitetura genética/base biológica complexas na PEA. A heterogeneidade fenotípica típica do autismo pode ser racionalizada identificando subgrupos de pacientes clinicamente mais homogêneos a partir de dados clínicos multidimensionais. Por outro lado, verificou-se que processos biológicos específicos, alterados por CNVs contendo genes do SNC, estão associados a apresentações clínicas distintas em termos de gravidade, tipo e nível de disfunção. Esta observação sugere que subgrupos com perfil clínico semelhante terão subjacentes os mesmos mecanismos biológicos. De facto, na presença de dados altamente informativos sobre processos biológicos, foi possível obter um nível razoável de confiança na predição da apresentação clínica, embora com baixa sensibilidade. Para se obter um poder preditivo razoável para a generalidade dos pacientes é, no entanto, necessário melhorar o conteúdo informativo dos processos biológicos do sistema nervoso central, nomeadamente sobre as vias fisiológicas do cérebro e sobre as consequências funcionais de variantes genéticas.

No seu global, esta abordagem serve como prova de conceito de que correlações entre variantes genéticas e perfis clínicos multidimensionais podem ser estabelecidas para a PEA, e de que o conhecimento dos processos biológicos afetados por CNVs pode prever a apresentação clínica. A identificação destas correlações será importante para a descoberta de

alvos fisiológicos para terapêutica farmacológica que sejam mais eficientes em subgrupos de doentes. Estas observações têm ainda um potencial para aplicação clínica, no diagnóstico precoce e no prognóstico do doente mediante a identificação de variantes genéticas, apoiando assim uma abordagem personalizada para intervenção terapêutica precoce. Estudos adicionais em amostras populacionais de maior dimensão, com dados clínicos e genómicos mais completos, são agora necessários para explorar este conceito e permitir a sua implementação na prática clínica.

## Referências bibliográficas:

- (1) American Psychiatric Association. Cautionary Statement for Forensic Use of DSM-5. IN: Diagnostic And Statistical Manual Of Mental Disorders, 5th ed. Washington, DC: American Psychiatric Association Publishing, 2013.
- (2) Geschwind DH, State MW. Gene hunting in autism spectrum disorder: on the path to precision medicine. *Lancet Neurol.* 2015;14(11):1109-20. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4694565/>
- (3) Murtagh F, Legendre P. Ward's hierarchical agglomerative clustering method: which algorithms implement ward's criterion? *J Classif.* 2014;31(3):274-95.
- (4) Breiman L. Random forests. *Mach Learn.* 2001;45(1):5-32.
- (5) Kuncheva LI. On the optimality of Naive Bayes with dependent binary features. *Pattern Recognit Lett.* 2006;27(7):830-7.
- (6) Pinto D, Pagnamenta AT, Klei L, et al. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorder. *Nature.* 2010;466(7304):368-72. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3021798/>
- (7) Rousseeuw PJ. Silhouettes: a graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis. *J Comput Appl Math.* 1987;20(C):53-65.
- (8) Parikshak NN, Luo R, Zhang A, et al. Integrative functional genomic analyses implicate specific molecular pathways and circuits in autism. *Cell.* 2013;155(5):1008-21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3934107/>
- (9) Reimand J, Arak T, Adler P, et al. g:Profiler-a web server for functional interpretation of gene lists (2016 update). *Nucleic Acids Res.* 2016;44(W1):W83-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4987867/>

## Avaliação preliminar da contaminação da água por pireno, formação de derivados clorados durante o processo de cloração e toxicidade em células HepG2

*Preliminary evaluation of water contamination by pyrene, formation of chlorinate derivatives during water disinfection and toxicity in HepG2 cells*

Silvia José, Patricia I. Morgado, Luísa Jordão

maria.jordao@insa.min-saude.pt

Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Saúde Ambiental, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

### Resumo

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são um grupo de contaminantes ambientais, classificados como potencialmente tóxicos, mutagénicos e carcinogénicos, constituindo um problema de saúde pública. No presente estudo, a presença de pireno (Pyr) e 1-cloro-pireno (1-CIPyr) e, diferentes amostras de água (água superficial, subterrânea e água da rede) foi pesquisada por cromatografia gasosa - espectrometria de massa (GC-MS) após concentração da amostra por micro extração em fase sólida. Usando água com diferentes concentrações de Pyr, mostramos que uma concentração mínima deste composto é necessária para que o 1-CIPyr se forme durante o processo de cloração. Finalmente, avaliamos a toxicidade induzida por 1-CIPyr em células HepG2. Os resultados mostraram que este composto é tóxico e afeta a polarização da membrana mitocondrial.

### Abstract

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are a group of environmental contaminants, classified as potentially toxic, mutagenic and carcinogenic, being an important public health concern. In the present study, we assayed different samples of water (superficial water, groundwater and tap water) for pyrene (Pyr) and 1-chloro-pyrene (1-CIPyr) by gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS) after sample concentration by solid phase microextraction. Using water with different Pyr concentrations, we showed that a minimal concentration of pyrene in water undergoing chlorination is required for 1-CIPyr formation. Finally, we evaluated the toxicity induced by 1-CIPyr in human hepatocarcinoma cells (HepG2). The results showed that this compound is toxic and affects mitochondrial membrane polarization.

### Introdução

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) são um grupo de poluentes orgânicos persistentes, formados por dois ou mais anéis de benzeno fundidos. Estes compostos estão amplamente distribuídos no ambiente, representando uma preocupação ecológica e de saúde pública. Os PAHs são formados por processos naturais (incêndios florestais, erupções vulcânicas, etc.) e antropogénicos (queima de combustíveis fósseis e madeira, produção de carvão vegetal, indústria petrolífera, derrames de petróleo, etc.) (1-6) e podem mover-se entre compartimentos ambientais (7,8). O desaparecimento das calotes geladas resultante do aquecimento global, a recirculação da água (chuvas, águas superficiais e subterrâneas), transporte atmosférico, migração de animais, vento e chuva são responsáveis pelo transporte de HPAs como demonstrado pela deteção destes compostos em áreas remotas (9-13).

Nos países do sul da Europa, vários fatores demográficos, como o declínio da população ativa nas regiões do interior e o abandono das atividades agrícolas levou à expansão da área ocupada por arbustos e florestas. Por outro lado, as mudanças climáticas com redução da precipitação e aumento da temperatura atmosférica potenciam o risco de ignição, resultando numa maior incidência de incêndios florestais. Em Portugal, a incidência de incêndios florestais tem aumentado ao longo do tempo afetando a qualidade do ar (14-15) e da água (16-17). As características físico-químicas dos HPAs favorecem a sua acumulação no solo e nos sedimentos donde podem ser posteriormente libertados para a água ou outros organismos vivos (17-19).

## **\_Objetivo**

No presente trabalho é avaliada a presença de HPAs em amostras de água de diferentes origens. Como o pireno foi detetado em várias amostras de água, usamos água contaminada com pireno para demonstrar a formação de derivados clorados durante a desinfecção da água com hipoclorito de sódio. A avaliação da toxicidade pelo teste do MTT em células foi utilizada como primeira abordagem do risco de exposição a estes compostos.

## **\_Materiais e métodos**

### **Amostras de água**

Durante 2015, foram recolhidas 20 amostras de água: 18 águas superficiais (9 de água salgada e 9 de água doce), 1 de água subterrânea e 1 de um bebedor público (tabela 1). Em todos os casos foram colhidos 500 mL de água e as amostras foram transportadas no escuro e armazenadas a 5°C até serem processadas. O período de armazenamento nunca excedeu as 24 horas.

### **Pesquisa de pireno e 1-cloro-pireno por GC-MS**

Pyr (Dr. Ehrenstorfer-Schäfers, Alemanha) e 1-Cl-Pyr sintetizado como descrito anteriormente (20) foram analisados por cromatografia gasosa- espectrometria de massa (4000 GC-MS, Varian, EUA). Os compostos foram recuperados de 15mL da amostra por micro extração em fase sólida (SPME) utilizando fibra de poldimetilsiloxano (PDMS, Supelco, EUA) durante 50 minutos a 70°C. Foi utilizada uma coluna capilar não-polar VF-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, fator 4, Varian, EUA) e hélio (1 mL/min) como gás de arrasto. A temperatura do forno do cromatografo gasoso foi programada do seguinte modo: de 80°C a 220°C (20°C min<sup>-1</sup>, 2 min) e até 300°C (5°C min<sup>-1</sup>, 4 min) sendo o tempo total de corrida igual a 30 minutos. A temperatura do injetor foi ajustada para 280°C e as amostras foram injetadas durante 7 minutos no modo dividido (10: 100). As condições de espectrometria de massa foram as seguintes: modo de ionização elétrica a 70e<sup>-V</sup>; tempo de varrimento: 0,84s / scan, corrente de emissão: 20 µA, temperatura da fonte: 240°C faixa de massa armazenada: 35-350 mZ. A análise foi realizada em duplicado. O

intervalo de linearidade para os compostos variou de 0,025 a 0,22 µg / L, tendo como limite de deteção (LoD) 0,008 µgL<sup>-1</sup> e limite de quantificação (LoQ) 0,025 µgL<sup>-1</sup>.

### **Contaminação da água com pireno por transferência ar-água em um sistema fechado**

Num sistema fechado foi introduzido um copo com 100 ml de água ultrapura e materiais conhecidos por libertarem HPAs por combustão, nomeadamente 2 cigarros (~1,5 g), 10 fósforos (~1,3 g) e aproximadamente 1 g de aparas de madeira e carvão. Os materiais foram queimados e o sistema foi mantido fechado por 48 horas. Após este tempo, alíquotas de 15 mL de água foram analisadas para a presença de Pyr e 1-ClPyr como descrito acima.

### **Formação de HPAs clorados durante a desinfecção da água por cloração**

A primeira cloração foi realizada em água ultrapura com concentrações de pireno compreendidas entre 0,1 a 10 µgL<sup>-1</sup>. Resumidamente, 5,7 µL de NaOCl a 14% (VWR, EUA) foram adicionados a 300 mL de água e após acidificação a pH 3 a mistura foi agitada durante 3h à temperatura ambiente. Após neutralização da mistura (pH 7-8) com uma solução de amônia a 24% (Merck, Alemanha), foi pesquisada a presença de Pyr e 1-ClPyr por GC-MS como descrito acima. Em seguida, a cloração das amostras de água resultantes da seção experimental anterior (mimetizando a contaminação da água de pireno por transferência de ar-água) foi submetida ao processo de cloração após adição de 15 µgL<sup>-1</sup> de PAHs ou não.

### **Cultura celular e tratamento com poluentes**

Células de hepatocarcinoma humano (HepG2- ATTC-HB-8065) foram mantidas como descrito anteriormente (20). Foi preparada uma nova solução de 1-ClPyr diluindo uma solução 20 mM em dimetilsulfóxido (DMSO; Merck, Alemanha), num volume adequado de meio de tratamento (20) antes de cada experiência.

### **Viabilidade celular e citotoxicidade de poluentes**

As células HepG2 foram cultivadas a uma densidade de 1x10<sup>4</sup> cels/poço numa placa de 96 poços e incubadas a 37°C/5% de CO<sub>2</sub>, durante 24h. Foram então expostas a 2µM de 1-ClPyr por

períodos de tempo distintos até 72h. Células não expostas aos compostos foram usadas como controle negativo. O ensaio de brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT) (atividade mitocondrial) foi usado para avaliar os efeitos citotóxicos do 1-CIPyr. Após exposição ao 1-CIPyr, as células foram lavadas com PBS e posteriormente incubadas com 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de MTT em meio de tratamento por 4h a 37°C/5% de  $\text{CO}_2$  em atmosfera húmida. Posteriormente, a solução de MTT foi removida e 100  $\mu\text{l}$  de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados a cada poço para dissolver os cristais de formazan, por 30 minutos à temperatura ambiente no escuro. A absorvância a 570 nm foi medida usando um espectrofotómetro Multiscan Ascent (Thermo Labsystems). A viabilidade celular (%) avaliada pela atividade mitocondrial (MTT) das células tratadas foi calculada como a razão entre a absorvância média das células tratadas e controlo. Os resultados foram expressos como a média ( $\pm$  DP) de pelo menos três experiências independentes por condição de tratamento realizadas em triplicado.

#### Despolarização da membrana mitocondrial

Mitotracker Red CMXRos (ThermoFischer Scientific, EUA) é uma sonda que se difunde livremente através da membrana celular e se acumula dentro de mitocôndrias ativas metabólicas (21). Esta sonda foi utilizada para avaliar qualitativamente a despolarização da membrana mitocondrial de acordo com as instruções do fornecedor. Células não tratadas e células expostas a 50 mM de cianeto de carbonil metilo m-clorofenil-hidrazona (CCCP) por 24 h foram usadas como controlo negativo e positivo, respetivamente. As células tratadas com 2  $\mu\text{M}$  1-CIPyr, foram incubadas com 50  $\mu\text{M}$  MitoTracker Red por 30 minutos antes de se atingirem as 24, 48 ou 72h de exposição ao poluente. As células foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído a 4% durante 15 minutos à temperatura ambiente protegidas da luz. O núcleo das células foi corado com Hoechst (10  $\mu\text{L}$  / mL) durante 2 minutos. As lâminas foram então montadas por inversão numa gota de meio de montagem de fluorescência previamente colocado numa lâmina de vidro. As amostras analisadas por microscopia confocal (Leica, SP2) sob uma objetiva de imersão de 40x e uma ocular de 10x. Pelo menos duas experiências independentes em duplicado foram realizadas.

#### Análise estatística

Os resultados da viabilidade celular e da citotoxicidade dos poluentes foi realizada pelo teste ANOVA de uma via com teste de comparação múltipla de Tukey. Os resultados são considerados estatisticamente significativos para valores de  $p < 0,05$ . Os resultados foram expressos como a média ( $\pm$  desvio padrão -DP) de pelo menos três experiências independentes.

#### \_Resultados e discussão

Inicialmente a presença de Pyr e 1-CIPyr foi pesquisada em 20 amostras de água de naturezas (águas superficiais salgadas ou doces, subterrânea e água da rede) e origens diversas (tabela 1). O Pyr, foi detetado em três amostras colhidas no distrito de Setúbal: água doce superficial de uma fonte decorativa (38° 22'54.6"N 8° 28 '15.9"W), águas subterrâneas (38° 22'54.6"N 8° 28 '15,9"W), água superficial salgada (38° 30'04,3"N 8° 55'24,8"W; 38° 28'54,8"N 8° 49'16,9"W); e a amostra de água da rede recolhida no distrito de Beja (38° 08'38.1"N 7° 26'58.9"W). A concentração de Pyr nestas amostras estava acima do limite de deteção (8  $\text{ng L}^{-1}$ ), mas abaixo do limite de quantificação (25  $\text{ng L}^{-1}$ ) do método. O derivado clorato (1-CIPyr) estava ausente ou abaixo do limite de deteção do método em todas as amostras (tabela 1). Este resultado está de acordo com estudos anteriores que consideram o Pyr como um dos HPAs mais abundantes em amostras de água (13,22,23).

Para avaliar o potencial risco para a saúde humana é importante ter em conta não só os poluentes, e as suas concentrações, mas também as vias de exposição. No caso da água, a ingestão é a primeira a considerar. No presente estudo, todas as amostras de água doce superficial recolhidas em barragens com pontos de captação de água para consumo humano foram negativas para HPA. Em termos de saúde pública, este é um resultado tranquilizador, uma vez que a exposição a HPA pode causar diversos problemas de saúde agudos e crónicos (8). Os resultados obtidos para as amostras de água da rede e subterrânea foram mais preocupantes. Apesar dos baixos níveis de Pyr, a capacidade deste se concentrar em compartimentos lipofílicos repre-

Tabela 1: ↓ Determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em amostras de água.

Coordenadas GPS	Distrito	Amostra	Pyr	1-ClPyr
41° 22'42.2"N 6° 21'05.2"W	Bragança	Água superficial (doce)	-	-
41° 05'10.1"N 8° 07'53.2"W	Porto		-	-
40° 20'16.7"N 8° 11'36.9"W	Coimbra		-	-
41° 39'10.3"N 8° 13'50.6"W	Braga		-	-
41° 35'24.5"N 8° 07'56.6"W	Braga		-	-
40° 02'53.6"N 7° 00'55.4"W	Castelo Branco		-	-
38° 22'54.6"N 8° 28'15.9"W	Setúbal		+	-
38° 24'15.1"N 7° 22'36.6"W	Évora		-	-
38° 11'51.0"N 7° 29'45.2"W	Beja		-	-
38° 41'59.6"N 9° 10'35.6"W	Lisboa	Água superficial (salgada)	-	-
38° 41'31.0"N 9° 25'08.7"W	Lisboa		-	-
38° 30'04.3"N 8° 55'24.8"W; 38° 28'54.8"N 8° 49'16.9"W	Setúbal*		+	-
38° 22'54.7"N 8° 28'15.0"W	Setúbal	Água subterrânea	+	-
38° 08'38.1"N 7° 26'58.9"W	Beja	Água da rede	+	-

\* 7 amostras foram recolhidas entre estes dois pontos. As concentrações de Pyr ou 1-ClPyr são inferiores (-) ou superiores (+) ao limite de deteção ( $0,008 \mu\text{gL}^{-1}$ ).

senta uma ameaça para a saúde dos seres humanos a longo prazo. Esta preocupação foi expressa pela Organização Mundial de Saúde (OMS), tendo em conta a toxicidade de cada um dos HPAs na água e a absorção total estimada em um consumo de água de 2 L por dia (24). Além disso, as águas subterrâneas nas zonas rurais são frequentemente utilizadas em atividades agrícolas e isso pode levar à acumulação de HPAs em, por exemplo, vegetais ou animais para consumo humano. Portanto, a ingestão de alimentos contaminados é outra rota de exposição a estes poluentes. Tal também deve ser considerado para a água salgada, já que os moluscos, crustáceos e peixes são capazes de acumular HPAs devido à sua elevada lipofilia (18,19,25,26). A exposição por via dérmica (27) pode ser preocupante no caso de amostras de águas superficiais recolhidas em áreas balneares, como a do presente estudo (Setúbal: 38° 30'04,3"N

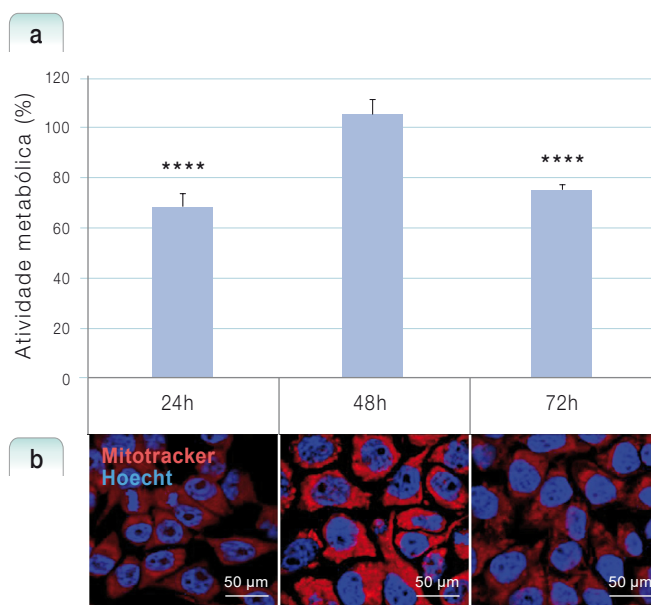
8° 55'24,8"W; "38° 28'54,8"N 8° 49'16,9"W). A baía de Setúbal, localizada no Parque Natural da Arrábida, alberga algumas das praias mais frequentadas pelos habitantes de Lisboa estando também perto de rotas marítimas para portos de pesca (Setúbal e Sesimbra) e outros portos comerciais localizados em Lisboa e Sines. Esta situação potencia o risco de contaminação da água devido ao tráfego marítimo e conseqüente exposição humana por via dérmica.

A contaminação da água por Pyr resultante da combustão de diversos materiais foi previamente demonstrada (1,2,28,29). Aqui pretendemos demonstrar que quando tal ocorre num sistema fechado pode levar à acumulação deste poluente na água, que durante o tratamento de desinfecção com hipoclorito (cloração) pode originar derivados clorados (30,31). Nas condições do nosso ensaio, a concentração de Pyr na água

foi de  $0,17 \pm 0,014 \mu\text{gL}^{-1}$  após 48h, enquanto que 1-CIPyr não foi detetado ( $<8 \text{ ngL}^{-1}$ ) mesmo após cloração da água. Estes resultados sugerem que ou é necessária uma concentração mínima de Pyr para que se forme 1-CIPyr ou que o rendimento da reação é muito baixo. Para testar a hipótese, primeiro submetemos à cloração soluções com diferentes concentrações de Pyr em água ultrapura. Nestas condições, só foi possível detetar 1-CIPyr ( $0,551 \pm 0,0014 \mu\text{gL}^{-1}$ ) quando uma concentração inicial de  $10 \mu\text{gL}^{-1}$  de Pyr estava presente. No entanto, quando em vez de água ultrapura enriquecida em Pyr, foi usada a água contaminada experimentalmente (contendo  $0,17 \pm 0,014 \mu\text{gL}^{-1}$  Pyr) foi obtido um resultado diferente. Neste caso, após a adição de Pyr para atingir uma concentração de  $15 \mu\text{gL}^{-1}$ , antes da cloração foram detetadas  $0,185 \pm 0,027 \mu\text{gL}^{-1}$  de 1-CIPyr na amostra clorada. O menor rendimento da reação em comparação com a água ultrapura sugere que a cloração de outros HPAs pode ocorrer em paralelo.

Finalmente, usamos a linha celular HepG2 derivada de fígado humano, considerada um dos melhores modelos celulares para prever a toxicidade humana (32), para avaliar a toxicidade do 1-CIPyr pelo ensaio de MTT. Este composto foi selecionado para o ensaio de toxicidade, uma vez que os HPA halogenados são considerados potencialmente mais tóxicos do que os respetivos compostos parentais (33-35). A citotoxicidade induzida pela exposição a  $2 \mu\text{M}$  1-CIPyr (concentração máxima solúvel do composto, determinada por GC-MS) após 24, 48 e 72h foi avaliada pela atividade mitocondrial através de MTT (figura 1a). Após 24 e 72h, a diminuição da atividade mitocondrial foi estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ) quando comparada com o controlo (células não expostas ao poluente), mas não após 48h. Este resultado está de acordo com a flutuação da despolarização da membrana mitocondrial refletida pela diminuição de acumulação de MitoTracker Red após 24 e 72h, mas não após 48h de exposição a  $2 \mu\text{M}$  1-CIPyr (figura 1b). O efeito tóxico inicial às 24h demonstrado pelos dois ensaios pode resultar duma capacidade limitada de desintoxicação da linhagem celular via citocromo P450 (36). No entanto, a recuperação após 48h mostra que a linhagem celular poderia responder ao efeito tóxico por um tempo limitado, já que após 72h a despolarização e a viabilidade da membrana

Figura 1: Avaliação da toxicidade de 1-CIPyr em células HepG2.



A atividade metabólica das células foi avaliada pelo ensaio do MTT após exposição a  $2 \mu\text{M}$  de 1-CIPyr durante 24, 48 e 72h (a). Uma diferença significativa em relação ao controlo (células não expostas a 1-CIPyr) foi encontrada após 24 e 72h de exposição ( $p < 0,0001$ ). Nas mesmas condições, a despolarização da membrana mitocondrial foi avaliada por microscopia confocal após tratamento com *Mitotracker Red* (vermelho) que se acumula no interior da mitocôndria (a). Os núcleos foram corados com Hoescht (azul).

mitocondrial diminuem, sugerindo a necessidade de adaptação ao estímulo tóxico desencadeado pelos HPAs (37,38). Mais estudos com diferentes abordagens experimentais são necessários para desvendar os mecanismos moleculares subjacentes a este composto HPAs.

### Conclusão

Foi possível detetar Pyr em diferentes amostras de água (superficial salgada e doce, subterrânea e água da rede). Além disso, o 1-CIPyr pode ser gerado, em concentrações detetáveis, durante o processo de cloração se uma concentração mínima de Pyr estiver presente na água não tratada. Uma vez que o derivado clorado se revelou tóxico, é aconselhável monitorizar regularmente a concentração de Pyr (e outros HPAs) em água, especialmente água destinada a consumo humano.

## Agradecimentos:

Agradece-se à Fundação para a Ciência e Tecnologia (RECI/QEQMED/0330/2012) e ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) (BRJ-DSA/2012 atribuída a Sílvia José) pelo financiamento; à Alexandra MM Antunes, ao Ricardo Wanke (Instituto Superior Técnico) e à Ana S Cardoso (INSA) pela sua contribuição na síntese/caracterização de 1-CIPyr; ao grupo de A. Bettencourt (i-Med ULisboa) pelas células HepG2.

## Referências bibliográficas:

- (1) Larsen RK 3rd, Baker JE. Source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons in the urban atmosphere: a comparison of three methods. *Environ Sci Technol.* 2003;37(9):1873-81.
- (2) Ravindra R, Sokhi R, Van Grieken R. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: source attribution, emission factors and regulation. *Atmos Environ.* 2008;42(13):2895-2921.
- (3) Billiard SM, Meyer JN, Wassenberg DM, et al. Nonadditive effects of PAHs on Early Vertebrate Development: mechanisms and implications for risk assessment. *Toxicol Sci.* 2008;105(1):5-23. Epub 2007 Dec 20. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2734299/>
- (4) Ravindra K, Bencs L, Wauters E, et al. Seasonal and site-specific variation in vapour and aerosol phase PAHs over Flanders (Belgium) and their relation with anthropogenic activities. *Atmospheric Environment.* 2006;40(4):771-85.
- (5) Liu G, Tong Y, Luong JH, et al. A source study of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in Shenzhen, South China. *Environ Monit Assess.* 2010;163(1-4):599-606. Epub 2009 Apr 8.
- (6) Aatmeeyata, Sharma M. Polycyclic aromatic hydrocarbons, elemental and organic carbon emissions from tire-wear. *Sci Total Environ.* 2010;408(20):4563-8.
- (7) Yue TX, Liu JL, Jørgensen SE, et al. Landscape change detection of the newly created wetland in Yellow River Delta. *Ecol Mod.* 2003;164(1): 21-31.
- (8) Tidwell LG, Blair Paulik L, Anderson KA. Air-water exchange of PAHs and OPAHs at a superfund mega-site. *Sci Total Environ.* 2017;603-604:676-86.
- (9) Abdel-Shafy HI, Mansour, MSM. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egypt. J. Petrol.* 2016;25(1):107-23.
- (10) Daly GL, Wania F. Organic contaminants in mountains. *Environ Sci Technol.* 2005;39(2):385-98.
- (11) Azhari A, Dalimin MN, Wee ST. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) pollution from vehicle emission in the environment of highway roadside in Johor, Malaysia. *IPCBE.* 2011;18:58-62. <http://www.ipcbee.com/vol18/12-ICBEM2011M10007.pdf>
- (12) Guzzella L, Salerno F, Freppaz M, et al. POP and PAH contamination in the southern slopes of Mt. Everest (Himalaya, Nepal): long-range atmospheric transport, glacier shrinkage, or local impact of tourism? *Sci Total Environ.* 2016;544:382-90. Epub 2015 Dec 3. <https://iris.unito.it/handle/2318/1535480>
- (13) Li J, Li F, Liu Q. PAHs behavior in surface water and groundwater of the Yellow River estuary: Evidence from isotopes and hydrochemistry. *Chemosphere.* 2017;178:143-53.
- (14) Vicente A, Alves C, Calvo AI, et al. Emission factors and detailed chemical composition of smoke particles from the 2010 wildfire season. *Atmos. Environ.* 2013;71:295-303.
- (15) Vicente A, Calvo A, Fernandes AP, et al. Hydrocarbons in particulate samples from wildfire events in central Portugal in summer 2010. *J Environ Sci (China).* 2017;53:122-31. Epub 2016 Jun 11.
- (16) Mansilha C, Carvalho A, Guimarães P, et al. Water quality concerns due to forest fires: polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) contamination of groundwater from mountain areas. *J Toxicol Environ Health A.* 2014;77(14-16):806-15.
- (17) Mansilha C, Duarte CG, Melo A, et al. Impact of wildfire on water quality in Caramulo Mountain ridge (Central Portugal). *Sustain. Water Resour. Manag.* 2017: 1-13.
- (18) Ribeiro C, Ribeiro AR, Tiritan ME. Occurrence of persistent organic pollutants in sediments and biota from Portugal versus European incidence: a critical overview. *J Environ Sci Health B.* 2016;51(3):143-53. Epub 2015 Dec 15.
- (19) Loh A, Yim UH, Ha SY, et al. Contamination and Human Health Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Oysters After the Wu Yi San Oil Spill in Korea. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2017;73(1):103-17. Epub 2017 Jul 10.
- (20) Morgado PI, Jose S, Wanke R, et al. Integration of cellular and molecular endpoints to assess the toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in HepG2 cell line. *Environ Toxicol Chem.* 2017;36(12):3404-3414.
- (21) Poot M, Zhang YZ, Krämer JA, et al. Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. *J Histochem Cytochem.* 1996;44(12):1363-72.
- (22) WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease WHO (1998). Guidelines for drinking-water quality, 2nd ed. Addendum to Vol. 2. Health criteria and other supporting information. Geneva, Switzerland; World Health Organization. [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwg/chemicals/polyaromahydrocarbons.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwg/chemicals/polyaromahydrocarbons.pdf)
- (23) Zhang A, Zhao S, Wang L, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in seawater and sediments from the northern Liaodong Bay, China. *Mar Pollut Bull.* 2016;113(1-2):592-99.
- (24) WHO guidelines for indoor air quality: selected pollutants. Copenhagen: Regional Office for Europe of the World Health Organization, 2010. [http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0009/128169/e94535.pdf](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0009/128169/e94535.pdf)
- (25) European Union. Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of Council on environmental quality standard in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council. *JO24.12.2008:L 348/85-97.* <http://data.europa.eu/eli/dir/2008/105/oj>
- (26) European Union. Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. *JO 24.8.2013:L 226/1-17.* <http://data.europa.eu/eli/dir/2013/39/oj>
- (27) Menzie CA, Potocki BB, Santodonato J. Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environ Sci Technol.* 1992;26(7):1278-84.
- (28) Zha Q, Qian NX, Moldoveanu SC. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in the particulate phase of cigarette smoke using a gas chromatographic-high-resolution mass spectrometric technique. *J Chromatogr Sci.* 2002;40(7):403-8.
- (29) Vu AT, Taylor KM, Holman MR, et al. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Mainstream Smoke of Popular U.S. Cigarettes. *Chem Res Toxicol.* 2015;28(8):1616-26. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4540633/>
- (30) Farré MJ, Day S, Neale PA, et al. Bioanalytical and chemical assessment of the disinfection by-product formation potential: role of organic matter. *Water Res.* 2013;47(14):5409-21.
- (31) Sun JL, Zeng H, Ni HG. Halogenated polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment. *Chemosphere.* 2013;90(6):1751-9. Epub 2012 Nov 22.
- (32) O'Brien PJ. High-content analysis in toxicology: screening substances for human toxicity potential, elucidating subcellular mechanisms and in vivo use as translational safety biomarkers. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2014;115(1):4-17. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12227>
- (33) Colmsjö A, Rannug A, Rannug U. Some chloro derivatives of polynuclear aromatic hydrocarbons are potent mutagens in *Salmonella typhimurium*. *Mutat Res.* 1984;135(1):21-9.
- (34) Kitazawa A, Amagai T, Ohura T. Temporal trends and relationships of particulate chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons and their parent compounds in urban air. *Environ Sci Technol.* 2006;40(15):4592-8.
- (35) Ding C, Ni HG, Zeng H. Parent and halogenated polycyclic aromatic hydrocarbons in rice and implications for human health in China. *Environ Pollut.* 2012;168:80-6.
- (36) Fazili IS, Jiang W, Wang L, et al. Persistent induction of cytochrome P4501A1 in human hepatoma cells by 3-methylcholanthrene: evidence for sustained transcriptional activation of the CYP1A1 promoter. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010;333(1):99-109. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.162222>
- (37) Sevastyanova O, Binkova B, Topinka J, et al. In vitro genotoxicity of PAH mixtures and organic extract from urban air particles part II: human cell lines. *Mutat Res.* 2007;620(1-2):123-34.
- (38) Kang Y, Cheung KC, Wong MH. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in different indoor dusts and their potential cytotoxicity based on two human cell lines. *Environ Int.* 2010;36(6):542-7.

## Caracterização fenotípica de isolados de *Salmonella enterica* recebidos no INSA entre 2014 e 2017

*Phenotypic characterization of Salmonella enterica isolates received in INSA between 2014 and 2017*

Leonor Silveira, Ângela Pista, Jorge Machado

leonor.silveira@insa.min-saude.pt

Laboratório Nacional de Referência de Infecções Gastrointestinais. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

### \_Resumo

As infeções por *Salmonella enterica* são uma das causas mais frequentes de gastroenterite aguda em todo o mundo. Entre 2014 e 2017 foram recebidas no Laboratório Nacional de Referência de Infecções Gastrointestinais do Departamento de Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) 1124 estirpes de *Salmonella* isoladas de doentes portugueses provenientes de várias zonas do país. Foram identificados 68 serotipos diferentes, sendo os mais frequentes *S. 4,5:i:-* (n=372; 33,1%), *S. Enteritidis* (n=335; 29,8%), *S. Typhimurium* (n=208; 18,5%), *S. Rissen* (n=28; 2,5%), *S. Typhi* (n=25; 2,2%) e *S. Stanley* (n=12; 1,1%). Os serotipos de *Salmonella* identificados no período entre 2014 e 2017 acompanham a tendência europeia, nomeadamente no que se refere à diminuição de *S. 4,5:i:-* e aumento de *S. Enteritidis*. A serotipagem e a utilização de metodologias moleculares são fundamentais para a monitorização das salmoneloses humanas, particularmente na deteção de surtos e identificação de estirpes resistentes. Neste contexto, é fundamental manter e promover a colaboração entre os diversos serviços de saúde nacionais e internacionais, de forma a garantir a vigilância e controlo das infeções gastrointestinais em geral e por *Salmonella* spp em particular.

### \_Abstract

*Salmonella enterica* infections are one of the most frequent causes of gastrointestinal disease around the world. Between 2014 and 2017, 1124 *Salmonella* strains isolated from Portuguese patients, from several areas of the country, were sent to the National Reference Laboratory for Gastrointestinal Infections of the Institute of Health Dr Ricardo Jorge of Portugal for serotyping. Sixty eight different serotypes were identified, and *S. 4,5:i:-* (n=372; 33,1%), *S. Enteritidis* (n=335; 29,8%), *S. Typhimurium* (n=208; 18,5%), *S. Rissen* (n=28; 2,5%), *S. Typhi* (n=25; 2,2%) and *S. Stanley* (n=12; 1,1%) were the most frequently detected. *Salmonella* serotypes identified in Portugal between 2014 and 2017 are in line with the European trend, namely with regard to the decrease of *S. 4,5:i:-* and increase of *S. Enteritidis*. Serotyping and molecular typing are fundamental for salmonellosis monitoring, particularly outbreak and resistance detection. In this context, it is extremely important to maintain and promote the collaboration of several national and international health services, in order to ensure gastrointestinal infections control and vigilance, particularly *Salmonella* spp. infections.

### \_Introdução

As infeções por *Salmonella enterica* são uma das causas mais frequentes de gastroenterite aguda em todo o mundo. A transmissão ocorre principalmente através da ingestão de água ou alimentos contaminados, mas também pode ocorrer por contacto direto com animais e com o próprio Homem. Os sintomas são na maioria ligeiros, embora algumas formas invasivas de salmonelose possam conduzir a situações clínicas mais graves. Os serotipos de *Salmonella enterica* mais frequentemente identificados nos humanos são *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. 4,5:i:-* (1,2).

### \_Objetivo

Com este estudo pretendeu-se descrever os serotipos de *Salmonella enterica* identificados no Laboratório Nacional de Referência de Infecções Gastrointestinais do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) entre 1 de janeiro de 2014 e 31 de dezembro de 2017.

### \_Material e métodos

Realizou-se uma análise retrospectiva dos serotipos de *Salmonella enterica* identificados no INSA entre 2014 e 2017. Os serotipos foram determinados de acordo com o esquema de classificação Kauffmann-White-de Minor.

### \_Resultados

No período em análise, foram recebidas no INSA 1124 estirpes de *Salmonella enterica*, isoladas de doentes provenientes de várias zonas do país.

Das estirpes recebidas, 75,4% (848/1124) foram isoladas a partir de fezes, 10,1% (113/1124) de sangue, 1,1% de fezes e

sangue (12/1124), 3,6% (41/1124) noutros produtos biológicos. Em 9,8% dos isolados (110/1124) não foi possível conhecer o tipo de amostra que lhes deu origem.

Foram identificados 68 serotipos diferentes, sendo os mais frequentes *S. 4,5:i:-* (n=372; 33,1%), *S. Enteritidis* (n=335; 29,8%), *S. Typhimurium* (n=208; 18,5%), *S. Rissen* (n=28; 2,5%), *S. Typhi* (n=25; 2,2%) e *S. Stanley* (n=12; 1,1%) (gráfico 1). Nos restantes 144 (12,8%) isolados de *Salmonella enterica* foram identificados serotipos considerados menos frequentes, dos quais 3 estirpes eram *S. enterica* subespécie *salamae* e 7 estirpes *S. enterica* subespécie *diarizonae*. (gráfico 1).

Apesar do serotipo de *S. Typhimurium* monofásica (*S. 4,5:i:-*) ter sido o mais frequente nos quatro anos em estudo, verificou-se uma tendência decrescente ao longo do tempo, representando 38,6% dos serotipos em 2014 e 26,6% em 2017. Em contrapartida, houve um aumento do serotipo de *S. Enteritidis* de 15,7% em 2014 para 37,6% em 2017 (gráfico 2).

Gráfico 1: Distribuição dos serotipos de *Salmonella enterica* identificados no INSA entre 2014 e 2017 (n=1124 isolados).

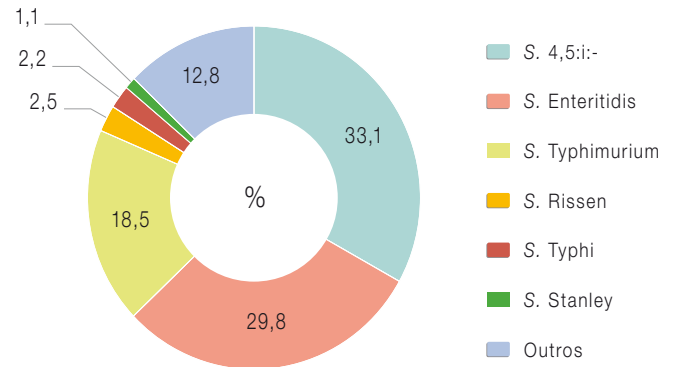
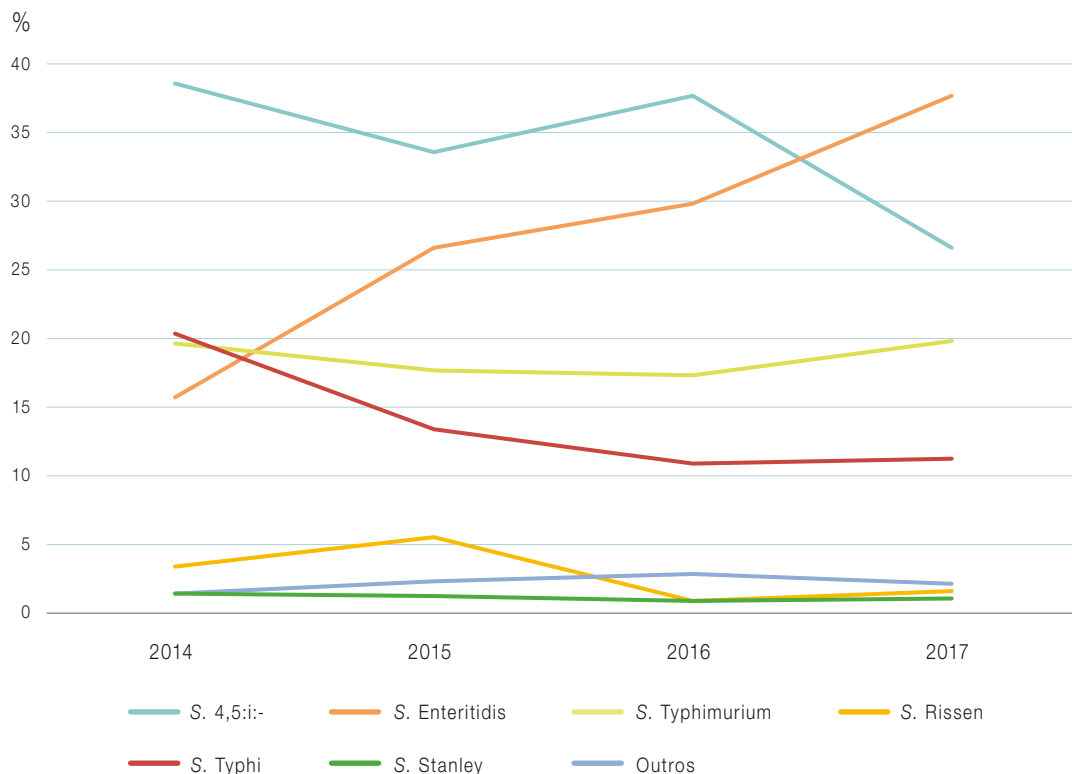


Gráfico 2: Distribuição temporal dos serotipos de *Salmonella enterica* identificados no INSA entre 2014 e 2017.



## **Discussão e conclusão**

Os serotipos de *Salmonella enterica* identificados no INSA no período entre 2014 e 2017 acompanham a tendência europeia, nomeadamente no que se refere à diminuição do serotipo S. 4,5:i:- e ao aumento de S. Enteritidis. Este aumento do serotipo de S. Enteritidis tem sido relacionado com o aumento de surtos causados por este serotipo (1). Acresce que neste e noutros estudos têm sido identificados serotipos pouco frequentes, igualmente responsáveis por salmoneloses humanas, e, só por isso, importantes em saúde pública (1,3,4).

Em conclusão, a serotipagem e a utilização mais alargada das metodologias moleculares disponíveis (MLST, MLVA, NGS) são fundamentais para a monitorização das salmoneloses humanas, nomeadamente na identificação de serotipos pouco frequentes ou nunca antes detetados, de estirpes resistentes e na deteção de surtos. Neste contexto, é fundamental manter e promover a colaboração entre os diversos serviços de saúde nacionais e internacionais por forma a garantir a vigilância e controlo das infeções gastrointestinais em geral, e por *Salmonella* spp em particular.

### **Agradecimentos:**

Os autores agradecem a colaboração dos Serviços de Patologia Clínica que enviaram estirpes de *Salmonella* spp. À Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

### **Referências bibliográficas:**

- (1) Silveira L, Marques A, Machado J. Infeções por *Salmonella enterica* no período entre 2000-2012. Boletim Epidemiológico Observações. 2013;2(Supl 1):14-16. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/1680>
- (2) European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. EFSA Journal. 2017;15(12):5077. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017>
- (3) Silveira L, Marques A, Santos J, et al. *Salmonella enterica*: serotipos menos frequentes com importância em patologia humana, caracterizados no INSA entre 2002-2013. Boletim Epidemiológico Observações. 2014;3(Supl 3):44-47. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/2297>
- (4) Silveira L, Marques A, Conde, P, et al. Serotipos de *Salmonella enterica* em amostras ambientais, 2002-2013. Boletim Epidemiológico Observações. 2014;3(Supl 4):9-11. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/2552>

## **Malária: confirmação laboratorial de casos clínicos suspeitos de infeção por *Plasmodium sp.* entre 2010-2017**

*Malaria: laboratory confirmation of clinical suspected cases of Plasmodium sp. between 2010-2017*

Tânia Reis, Susana Martins, Idalina Ferreira, Anabela Vilares, Maria João Gargate

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

Laboratório Nacional de Referência de Infeções Parasitárias e Fúngicas, Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

### **\_Resumo**

A malária é uma infeção parasitária causada por um protozoário intracelular obrigatório (género *Plasmodium*), cuja transmissão é assegurada quando uma fêmea de mosquito género *Anopheles* infetada efetua a sua refeição de sangue num indivíduo. Estão descritas mais de 150 espécies mas apenas 5 infetam o Homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e mais recentemente, *P. knowlesi*, uma espécie que causa malária em macacos no sudeste asiático. É a doença parasitária mais frequente para o Homem, encontrando-se infetada cerca de 5% da população mundial, sendo o *P. falciparum* o agente mais disseminado, responsável por mais de 80% dos casos mundiais e o que apresenta uma patogenia mais agressiva. O objetivo deste estudo foi descrever as características demográficas dos casos de malária, em doentes com quadro clínico compatível e cujo diagnóstico laboratorial foi confirmado. As metodologias de diagnóstico utilizadas foram, serológicas (IFI), moleculares (PCR em tempo real, adaptada de Swan *et al.*) e a pesquisa direta em gota espessa e esfregaço. Foram analisadas 700 amostras, 15 das quais provenientes do surto de ébola (África Ocidental, 2014/2015). Detetaram-se 103 (14,7%) casos positivos. Todos os casos positivos de malária são importados. A maioria dos casos ocorreu em viajantes, indivíduos adultos. Pelo facto da transmissão local continuar a ser possível na Europa e pela quantidade de viagens efetuadas entre a Europa e os países endémicos, salienta-se a necessidade de vigilância e prevenção desta parasitose.

### **\_Abstract**

*Malaria is a human disease caused by a protozoan infection of red blood cells transmitted by the bite of a female anopheline mosquito. There are described more than 150 species of Plasmodium but only five infected humans, P. falciparum, P. vivax, P. malariae, P. ovale and more recently P. knowlesi, a specie that causes malaria in monkeys in Southeast Asia. Malaria is the most important parasitic disease of man; approximately 5% of the world's population is infected. P. falciparum is the most widespread specie responsible for over 80% of cases worldwide and which has a more aggressive pathogenesis. The aim of the study was to describe the demographic characteristics of malaria cases, in patients with clinical symptoms compatible with malaria and whose laboratory diagnosis was confirmed. The methods of diagnosis used were: serological (IIF), molecular (real-time PCR, adapted Swan et al.) and direct visualization of thick and thin blood smears. We analyzed 700 specimens, 15 of which belonging to Ebola outbreak (West Africa, 2014/2015). One hundred and three (14.7%) were positive cases. All positive cases of malaria are imported. Most cases occurred in adults travellers. Since local transmission contin-*

*ues to be possible in Europe and the big number of trips between Europe and endemic countries are a reality underlines the need of surveillance and prevention of this disease.*

### **\_Introdução**

A malária ou paludismo é uma infeção parasitária, não contagiosa, de evolução crónica, com manifestações episódicas de carácter agudo, causada por um protozoário intracelular obrigatório do género *Plasmodium*, cuja transmissão é assegurada quando uma fêmea de mosquito pertencente ao género *Anopheles* infetada efetua a sua refeição de sangue num indivíduo. Em situações excecionais, a doença pode ser transmitida por transfusão sanguínea ou via congénita, contudo estas duas formas de transmissão não têm qualquer expressão epidemiológica <sup>(1)</sup>. Existem aproximadamente 156 espécies de *Plasmodium* que infetam várias espécies de vertebrados, mas apenas cinco infetam o Homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*, uma espécie que causa malária em macacos do sudeste asiático e que se encontra circunscrita à Malásia <sup>(1)</sup>. O *P. falciparum* e *P. vivax* são as espécies mais prevalentes nos humanos sendo o *P. falciparum* a que apresenta uma patogenia mais agressiva, com mais complicações clínicas e elevada letalidade <sup>(2)</sup>.

O ciclo de vida do parasita da malária envolve dois hospedeiros: o homem e o mosquito e divide-se em três fases: a fase sexuada que ocorre no hospedeiro invertebrado (mosquito), designado ciclo esporogónico e duas fases assexuadas que ocorrem no Homem, o ciclo exoeritrocítico (fígado) e o ciclo eritrocítico (glóbulos vermelhos) <sup>(3)</sup>.

Os primeiros sintomas surgem geralmente 8-25 dias após a infeção, com um quadro clínico semelhante ao de um síndro-

ma gripal, podendo ocorrer tremores seguidos da rápida subida da temperatura corporal acompanhados por náuseas, vômitos, cefaleias, dores musculares e abdominais, anemia, falta de apetite e distúrbios gastrointestinais. Durante o período de febre alta pode surgir um quadro de esplenomegalia. Quando a temperatura começa a baixar o doente apresenta intensa sudorese que se pode prolongar por vários minutos ou horas – sintomas característicos de malária não grave. A malária grave ocorre quando há falência dos órgãos vitais e alterações metabólicas, bioquímicas e clínicas com elevada parasitemia, tais como: anemia grave, hemoglobinúria, alteração na coagulação, acidose metabólica, hipoglicémia, dificuldade respiratória, perda de consciência, convulsão, coma ou outras alterações neurológicas (1).

A malária é considerada a doença parasitária com maior impacto mundial, sendo a grande causadora de doença em países tropicais e subtropicais, afetando principalmente crianças com menos de cinco anos e grávidas. As espécies de *Plasmodium* distribuem-se de modo diferente entre as regiões onde a doença é endémica. *P. falciparum* predomina em África, Nova Guiné e Haiti, enquanto o *P. vivax* é mais frequente na América Central. A prevalência destas duas espécies é semelhante à encontrada na América do Sul, no Subcontinente Indiano, na Ásia oriental e na Oceânia. Apesar de *P. malariae* coexistir na maioria das áreas endémicas, especialmente na África subsariana, a sua prevalência é muito menos comum. Em relação ao *P. ovale* é pouco frequente fora do Continente africano, estimando-se prevalências globais inferiores a 1% (4).

Desde os tempos mais antigos que a malária é identificada como episódios febris caracterizados por recorrências de febre “terça benigna” (*P. vivax*) e febre “quartã” (*P. malariae*), por não estarem associados a formas severas e fatais da doença. A febre “terça maligna” ou “subterça maligna” era atribuída ao *P. falciparum*, associado a formas severas e fatais (1).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que em 2016 tenham sido identificados 216 milhões de casos de malária a nível mundial com cerca de 445.000 mortes, principalmente crianças <5 anos de idade na África subsariana (4).

Na Europa, e de acordo com o Relatório Epidemiológico Anual de 2015 publicado pelo *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), a incidência da malária permanece estável, com aproximadamente 1 caso por 100 000 habitantes. Dos 7271 casos notificados em 2015 pelos 26 estados-membros da União Europeia 6199 tiveram confirmação laboratorial. A maioria dos casos foram importados, à exceção de sete casos referenciados como autóctones em países da União Europeia (cinco casos declarados pela Grécia, que tem vindo a notificar casos autóctones de infeção por *P. vivax* desde 2009, e um caso pela Bélgica e outro pela Holanda) (5).

Em Portugal, os últimos casos de malária autóctone foram diagnosticados em 1959, desde então só têm sido identificados casos importados provenientes de países tropicais onde a doença é endémica. De acordo com o último Relatório das Doenças de Declaração Obrigatória da Direção Geral da Saúde (DGS) referente ao período 2011-2014, Portugal notificou 373 casos importados: 64 casos em 2011, 58 casos em 2012, 123 casos em 2013 e 128 casos em 2014 (6).

A malária é uma doença evitável através da utilização de drogas profiláticas. O controlo da malária é uma das metas da “*WHO Global Technical Strategy for Malaria 2016-2030*” que tem como objetivos estratégicos até 2030: reduzir os casos de incidência de malária até 90%; reduzir as taxas de mortalidade de malária até 90%; eliminar a doença em pelo menos 35 países e prevenir o reaparecimento da parasitose em todos os países que são considerados “livres de malária” (4).

A utilização de terapia combinada com derivados da artemisinina tem sido recomendada para a doença aguda, principalmente em crianças, bem como no tratamento intermitente preventivo em mulheres grávidas. A utilização de redes mosquiteiras impregnadas em inseticidas de ação prolongada, a pulverização intra domiciliária com inseticidas de efeito residual, que tem efeito no controlo do vetor, têm assumido uma importância significativa na diminuição da morbidade, ao reduzir o contacto vetor-hospedeiro vertebrado. A drenagem de águas paradas onde os mosquitos depositam os seus ovos constitui também um dos fatores que tem contribuído positivamente para o controlo da malária (7).

## \_Objetivo

Com este trabalho pretendeu-se efetuar uma análise descritiva das características demográficas dos casos com quadro clínico e epidemiológico suspeito de infeção por *Plasmodium* sp., que foram confirmados no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) entre janeiro de 2010 e dezembro de 2017.

## \_Métodos

Foi efetuado o diagnóstico laboratorial a todos os doentes com quadro clínico compatível com infeção por *Plasmodium* sp., cujos produtos biológicos foram enviados ao Laboratório Nacional de Referência de Infeções Parasitárias e Fúngicas do INSA para confirmação ou exclusão do diagnóstico entre 2010 e 2017.

As metodologias de diagnóstico laboratorial utilizadas foram: serológicas (determinação de anticorpos IgG para *Plasmodium falciparum* – IFI (Euroimmun)); moleculares (PCR em tempo real que permite a deteção e amplificação de 4 espécies de *Plasmodium* sp. através de um conjunto de primers e sondas para o gene 18S, adaptada de Swan *et al.*) e a pesquisa direta em gota espessa e esfregaço. Para a análise descritiva dos dados demográficos dos casos suspeitos e confirmados, recorreu-se ao cálculo de frequências absolutas e relativas.

## \_Resultados

O diagnóstico laboratorial da infeção por *Plasmodium* sp. foi realizado em amostras clínicas de 700 doentes suspeitos de malária entre 2010 e 2017, dos quais 15 indivíduos integravam o surto de ébola que ocorreu na África Ocidental em 2014/2015.

Durante o período sob observação foram confirmados 103 (14,7%; 103/700) casos de infeção por *Plasmodium* sp.; 68 (66,0%) diagnosticados por métodos serológicos; 31 (30,1%) por PCR e 4 (3,9%) por pesquisa direta em gota espessa e esfregaço após coloração de Giemsa. A **tabela 1** mostra a distribuição temporal do número total de casos clínicos suspeitos de malária analisados no INSA entre 2010 e 2017 e o número de casos com diagnóstico laboratorial positivo.

**Tabela 1:** Distribuição do número de casos positivos de infeção por *Plasmodium* sp. analisados no INSA entre 2010 e 2017, por ano de diagnóstico.

Ano	Casos positivos		Casos negativos		Total	
	n	%	n	%	n	%
2010	3	2,9	4	0,7	7	1,0
2011	2	1,9	14	2,3	16	2,3
2012	0	0	9	1,5	9	1,3
2013	11	10,6	131	21,9	142	20,2
2014	39	37,8	258	43,2	297	42,4
2015	23	22,3	125	20,9	148	21,1
2016	13	12,6	26	4,3	39	5,6
2017	12	11,6	30	5,0	42	6,0
Total	103	100	597	100	700	100

### Distribuição de casos positivos de infeção por *Plasmodium* sp. entre 2010 e 2017, por género e grupo etário

Dos 103 doentes com infeção por *Plasmodium* sp. confirmada, 50 (48,5%) pertenciam ao género masculino e 53 casos (51,5%) ao género feminino. Durante os 8 anos em estudo observou-se que 80,6% (83/103) dos casos ocorreram em adultos com idade igual ou superior a 31 anos, sendo o grupo etário entre 31 e 50 anos o que revelou um maior número de infeções por *Plasmodium* sp. - 65,0% (67/103). No **gráfico 1** apresenta-se a distribuição etária dos casos positivos de infeção por *Plasmodium* sp.

### Distribuição de casos positivos de infeção por *Plasmodium* sp. entre 2010 e 2017, por mês

De acordo com os resultados obtidos no que respeita à sazonalidade, foi nos meses de novembro (20,4%) e dezembro (12,6%) que se verificou um maior aumento do número de casos de infeção por *Plasmodium* sp., em relação ao restante período do ano, como se pode verificar no **gráfico 2**.

Gráfico 1: Distribuição do número de casos positivos de infeção por *Plasmodium* sp. analisados no INSA entre 2010-2017, por grupo etário.

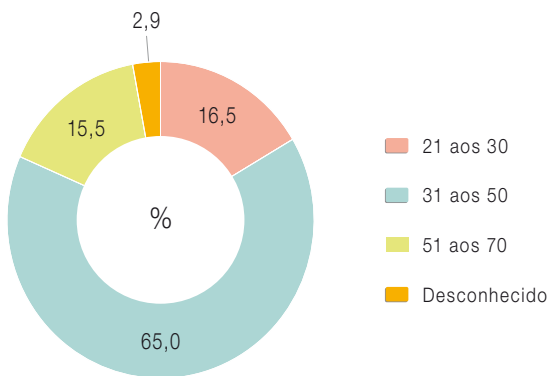
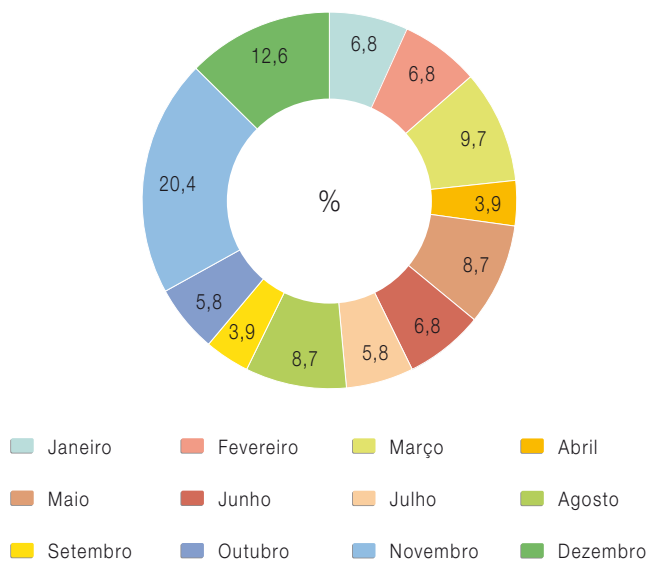


Gráfico 2: Distribuição do número de casos positivos de infeção por *Plasmodium* sp. entre 2010-2017, por mês.



#### Distribuição de casos positivos de infeção por *Plasmodium* sp. entre 2010 e 2017, por método de diagnóstico e espécie identificada

Dos 103 doentes com infeção por *Plasmodium* sp. confirmada, 68 (66,0%) foram diagnosticados por métodos serológicos; 31 (30,1%) por PCR e 4 (3,9%) por pesquisa direta em gota espes-

sa e esfregaço após coloração de Giemsa. Relativamente aos 68 casos com serologia positiva, 41 foram amostras enviadas de parturientes nascidas ou que tenham viajado nos últimos 3 anos para regiões endémicas de malária e que efetuaram o rastreio para colheita de células do cordão umbilical; a média de idade destas mulheres é de 30 anos. Os restantes 27 casos (22 do sexo masculino e 5 do sexo feminino) são viajantes, residentes maioritariamente na zona centro de Portugal (distrito de Coimbra), com uma média de idade de 46 anos. Com respeito aos 31 casos positivos por PCR incluem 6 casos (cinco *Plasmodium falciparum* e um *Plasmodium vivax*) suspeitos de infeção pelo vírus Ébola (surto 2014/2015), cujo diagnóstico diferencial incluía a pesquisa de *Plasmodium* sp., todos em indivíduos adultos do sexo masculino provenientes da Nigéria, Guiné Conacri e Guiné Bissau com diagnóstico compatível com malária (febre, mialgias cefaleias, diarreias); 4 casos provenientes da Madeira, todos importados, de doentes do sexo masculino emigrantes em Moçambique, Angola e Guiné Equatorial com quadro clínico suspeito de paludismo, tendo sido detetado em dois casos DNA referente à espécie *P. ovale*; uma coinfeção de *P. falciparum* com *P. malariae* e um caso de *P. falciparum*. Os restantes casos são indivíduos residentes no norte e centro do país e as espécies identificadas foram *P. falciparum* e *P. ovale* em doentes que também referem ter efetuado viagens recentes para zonas endémicas de malária.

#### \_Discussão e conclusões

A sintomatologia inespecífica da malária, que se apresenta como uma síndrome febril, não é clinicamente distinguível de um vasto leque de outras doenças, pelo que é absolutamente necessário a realização do diagnóstico laboratorial.

Ao longo dos oito anos em análise verificou-se que entre 2013 e 2015 houve um aumento do número de diagnósticos laboratoriais de casos suspeitos de infeção por *Plasmodium* sp. solicitados ao INSA. Este facto, pode dever-se a um aumento do número de viagens para regiões endémicas nestes anos, como também ao alerta mediático resultante do surto de Ébola ocorrido na Guiné Conacri Serra Leoa em 2014/2015.

Todos os casos de malária foram importados e estavam relacionados com viagens a países onde a doença é endémica.

Na Europa a maioria dos casos registados referem-se a indivíduos do sexo masculino nos grupos etários dos 15-24 anos e dos 25-44 anos (5). De acordo com os resultados obtidos no INSA, observou-se que os mesmos são consistentes com os dados europeus no que respeita à distribuição por grupo etário, tendo ocorrido uma maior frequência de casos em adultos entre os 31 e 50 anos de idade durante o período em análise.

No que se refere à distribuição por sexo, os nossos resultados revelaram uma distribuição equitativa pois, se por um lado, o sexo masculino reflete o padrão de viajantes portugueses que desenvolvem a sua atividade profissional entre a Europa e África, por outro, Portugal recebe com muita frequência parturientes, de nacionalidade portuguesa ou estrangeira, residentes nos países de língua oficial portuguesa.

A sazonalidade observada não reflete os padrões europeus de viagens para países onde a malária é endémica (países tropicais e subtropicais), sendo que não obtivemos informação sobre os motivos das viagens (férias, trabalho ou visita a amigos/familiares) dos casos em estudo. Os outros países europeus registaram um aumento claro de casos diagnosticados durante os meses das férias de verão (julho, agosto e setembro), enquanto que a distribuição de casos positivos de infeção por *Plasmodium* sp diagnosticados no INSA foi mais elevada nos meses de novembro e dezembro. A forte ligação histórica do nosso país aos países africanos de língua oficial portuguesa, pode explicar esta distribuição da sazonalidade, que possivelmente está relacionada com a vinda a Portugal dos trabalhadores emigrantes portugueses no período natalício.

Face às alterações climáticas que estão a ocorrer à escala planetária e à presença do vetor na Europa, estudos com modelos preditivos sobre a hipótese de reintrodução da malária neste continente têm mostrado a possibilidade de esta parasitose poder vir a tornar-se endémica no final deste século (8). Quanto em Portugal, um estudo com base num modelo potencial de

risco de transmissão da malária, concluiu que a possibilidade de reemergência de malária endémica em Portugal Continental é atualmente relativamente baixa, embora não se possa descurar a possibilidade da sua reemergência sob a forma de focos autóctones esporádicos. Esta realidade foi recentemente verificada em alguns países do Sul da Europa, onde foram notificados como adquiridos localmente sete casos autóctones, cinco dos quais na Grécia confirmados como *Plasmodium vivax*, em áreas rurais onde a presença do vetor em combinação com indivíduos que viajam de países endémicos é uma realidade (9).

Visto continuar a ser possível na Europa a transmissão local e o elevado número de viajantes entre o continente europeu e os países onde esta parasitose é endémica, importa, pois, manter a vigilância epidemiológica e medidas preventivas sobre a afluência de indivíduos infetados com paludismo, quer se trate de portugueses, quer de imigrantes que habitam ou transitam por Portugal, sem esquecer, obviamente, o número crescente de turistas, nacionais e estrangeiros. O INSA participa na vigilância epidemiológica da malária através da Rede de Vigilância de Vetores nos portos e aeroportos (REVIVE), tanto no controlo do vetor como na posterior identificação da presença do parasita nos insetos. Assim sendo, e correlacionando o aumento das referidas viagens com as alterações climáticas, nomeadamente o aquecimento global, fatores que contribuem para disseminação da malária para a Europa, torna-se absolutamente necessária a vigilância epidemiológica do parasita de modo a controlar/impedir este acontecimento (10).

#### Agradecimento:

À Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

**Referências bibliográficas:**

- (1) White NJ. Malaria. IN: Alimuddin I, Zumla AI (eds). Manson's Tropical Diseases. 22nd ed. Philadelphia: Saunders, 2009, pp. 1201-1300.
- (2) WHO Global Malaria Programme. Malaria - Information for travellers [Em linha]. (consult. 13/7/2018). <http://www.who.int/malaria/travellers/en/>
- (3) Gargaté, MJ. Doenças associadas a mosquitos: malária. IN: Núncio MS, Alves MJ (eds). Doenças associadas a artrópodes vetores e roedores. Lisboa: INSA, 2014, pp.53-8. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/2232>
- (4) World Health Organization. World Malaria Report 2014. Geneva: WHO, 2014. [www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2014/report/en/](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/report/en/)
- (5) European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2015: emerging and vector-borne diseases. Stockholm: ECDC, 2015. [http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/emerging-vector-borne-diseases\\_annual-epidemiological-report-2015.pdf](http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/emerging-vector-borne-diseases_annual-epidemiological-report-2015.pdf)
- (6) Direção-Geral da Saúde. Doenças de Declaração Obrigatória, 2011-2014 - Volume I. Lisboa: DGS, 2014. <https://www.dgs.pt/estatisticas-de-saude/estatisticas-de-saude/publicacoes/doencas-de-declaracao-obrigatoria-2011-2014-volume-i-pdf.aspx>
- (7) Roll Back Malaria Partnership. Economic costs of malaria. Geneva: World Health Organization, [2003]. <https://www.malariaconsortium.org/userfiles/file/Malaria%20resources/RBM%20Economic%20costs%20of%20malaria.pdf>
- (8) David de Moraes J. Malária em Portugal: passado, presente e perspectivas futuras - II parte. RPDl. 2014;10(3):113-21. [http://spdimc.org/wp/wp-content/uploads/2014/11/RPDI\\_10-3\\_Internet.pdf](http://spdimc.org/wp/wp-content/uploads/2014/11/RPDI_10-3_Internet.pdf)
- (9) Gomes EJC. Risco potencial de transmissão de malária em Portugal Continental. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Sociais e humanas da Universidade Nova de Lisboa, 2010. <https://run.unl.pt/handle/10362/4156>
- (10) Reis T, Ferreira I, Martisn S, et al. Malária: estudo retrospectivo de casos clínicos suspeitos de infeção por Plasmodium sp. entre 2010 e 2014. Boletim Epidemiológico Observações. 2016;5(15):19-22. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/3697>

## **Rede Médicos-Sentinela Local Almada-Seixal: relato de um ano de experiência** *Local Medical-Sentinel Network Almada-Seixal: report of one year of experience*

Ana Paula Rodrigues<sup>1</sup>, Joana Oliveira<sup>1</sup>, Ana Cristina Garcia<sup>1</sup>, Célia Santos<sup>2</sup>, Sandra Lopes<sup>2</sup>

ana.rodrigues@insa.min-saude.pt

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

(2) Agrupamento de Centros de Saúde Almada-Seixal.

### **\_Resumo**

A Rede Médicos-Sentinela Local Almada-Seixal foi a primeira rede criada para dar resposta a questões locais de investigação em saúde e, simultaneamente, reforçar a cobertura a nível nacional. Com este artigo pretende-se acompanhar a sua implementação e desenvolvimento após o primeiro ano de experiência. A adesão de um número progressivamente maior de médicos à rede permitiu aumentar a população sob observação efetiva na Rede Médicos-Sentinela. Foram ponderadas estratégias para garantir a regular participação destes médicos na notificação de eventos. O primeiro desafio desta rede de investigação será a implementação de um estudo sobre os fatores de risco e prognóstico da doença isquémica cardíaca na área de abrangência do ACES Almada-Seixal, considerado prioritário no Plano Local de Saúde.

### **\_Abstract**

*The Local GP Sentinel Network in Almada-Seixal was the first network created to answer some local health investigation issues and, simultaneously, to strengthen the national surveillance. We here present its implementation and development after the first experimental year. The adherence of more doctors to the network made possible having at national level a larger population under observation. We bring forward some strategies to ensure the regular notification from these doctors. The first project of this network will be the implementation of a study about the risk factors and prognostic of ischemic disease in Almada-Seixal, one of the one of the research priorities in the Local Health Plan.*

### **\_Introdução**

A Rede Médicos-Sentinela Local Almada-Seixal surgiu como uma experiência-piloto em 2016 na área de abrangência do Agrupamento de Centros de Saúde Almada-Seixal (ACES Almada-Seixal), um dos agrupamentos da Administração Regional de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo. Tinha como objetivos contribuir para: i) o reforço da Rede Médicos-Sentinela, numa área de grande densidade populacional mas com baixa cobertura pela rede; e ii) a criação de uma rede de investigação em saúde que permitisse responder às necessidades de investigação identificadas no Plano Local de Saúde (PLS) de Almada-Seixal 2013-2016 (1), ao mesmo tempo que contribuiria para a investigação clínica e vigilância epidemiológica a nível nacional.

De acordo com o PLS, a taxa de mortalidade prematura por doença isquémica cardíaca nos últimos anos, era mais elevada na área de abrangência do ACES Almada-Seixal quando comparada com a Região de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo ou com Portugal. O aprofundamento do estudo permitiu concluir que esse facto se devia a um maior risco de morte prematura por doença isquémica cardíaca no sexo masculino, mas apenas no concelho de Almada quando comparado com o concelho do Seixal (1). Contudo, a evidência disponível à data, não permitia identificar os determinantes dessa desigualdade. A resposta a esta necessidade de investigação, priorizada no PLS, implicava o desenvolvimento e implementação de um estudo epidemiológico de difícil concretização, dada a inexistência de uma estrutura local de investigação. Assim, considerou-se que aumentar o número de médicos-sentinela em exercício no ACES Almada-Seixal poderia ser o primeiro passo na criação de uma estrutura de recolha e análise de dados de saúde de âmbito local em parceria com o Instituto Nacional de Saúde – Rede Médicos-Sentinela Local (RSL).

Em articulação com o Conselho Clínico e de Saúde do ACES Almada-Seixal foi decidido desenvolver várias ações de divulgação da Rede Médicos-Sentinela junto dos profissionais de saúde do referido ACES e nomear um responsável local pela RSL de forma a aumentar a sua cobertura.

Definiu-se como primeiro objetivo alcançar um total de 30 médicos-sentinela (cerca de 50.000 utentes em observação), uniformemente distribuídos por todas as unidades funcionais de medicina geral e familiar do ACES, e manter a sua notificação regular ao longo do tempo. Ficou ainda definido que após estabilização da RSL, seria desenvolvido e implementado um estudo de investigação sobre os fatores de risco e prognóstico da doença isquémica cardíaca na área de abrangência do ACES Almada-Seixal, problema de saúde considerado como prioritário no PLS (1). A participação na RSL foi ainda considerada como uma das atividades de investigação a valorizar no âmbito da avaliação de desempenho das unidades de saúde.

O trabalho desenvolvido durante o ano de 2017 incidiu no recrutamento de novos médicos-sentinela e na monitorização da sua participação.

### **\_Objetivo**

Este trabalho pretende relatar a experiência de um ano da RSL e apresentar a estimativa da taxa de incidência para a população da área de abrangência do ACES Almada-Seixal de alguns dos eventos em estudo na Rede Médicos-Sentinela em 2017.

### **\_Material e métodos**

A Rede Médicos-Sentinela Local integra a Rede Médicos-Sentinela, uma vez que todos os médicos que participam na rede local pertencem também à rede nacional. A participação é voluntária e está aberta a todos os médicos de família e médicos internos de Medicina Geral e Familiar (MGF) do ACES Almada-Seixal. A metodologia de notificação é a usada na Rede Médicos-Sentinela (2,3). Deste modo, nas situações em que os eventos em estudo são os mesmos daqueles estudados a nível nacional, os casos notificados pelos médicos da rede local contribuem também para as estimativas nacionais.

Durante o ano de 2017, cada médico-sentinela notificou os novos casos de síndrome gripal, depressão, enfarte agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral, hipertensão arterial, diabetes *mellitus*, gravidez e também as prescrições de novo de hipocoagulantes orais ocorridos após a sua entrada na Rede Médicos-Sentinela. Para este trabalho não foram analisados os dados da síndrome gripal, prescrição dos hipocoagulantes orais e da gravidez, uma vez que no estudo destes casos não seria adequado o cálculo da taxa de incidência anual.

A notificação foi feita através de uma plataforma *online* de acesso restrito ao médico-sentinela, sendo que a cada caso notificado foi automaticamente atribuído um código de identificação para anonimização dos dados.

Em fevereiro de 2018, foi feita a validação dos dados incongruentes junto dos médicos notificadores (por exemplo, data de nascimento mais recente do que a data de notificação) e eliminados os casos duplicados.

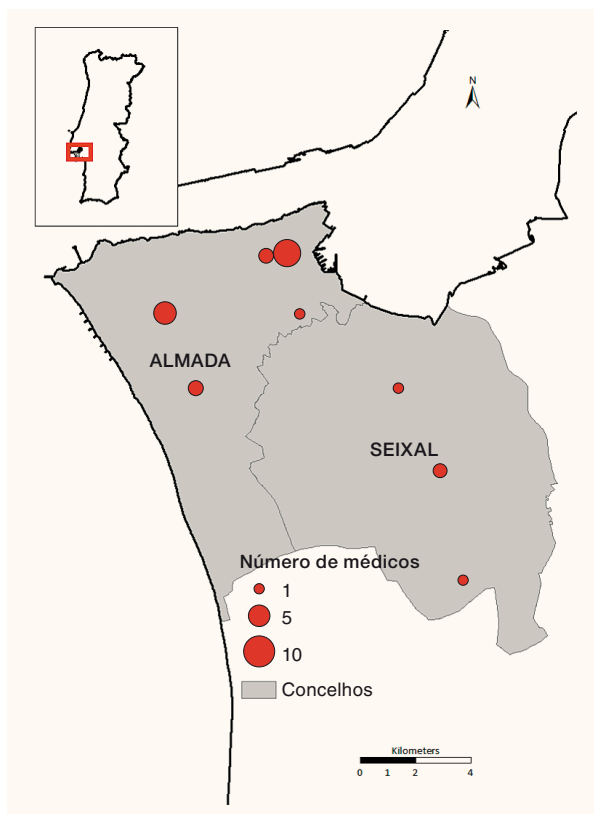
A taxa de incidência anual dos eventos em estudo foi estimada a partir do número de casos notificados para cada evento ao longo de 2017 e a população sob observação efetiva (PSOE) no mesmo período. Em cada semana, a PSOE resulta do somatório da lista de utentes dos médicos que enviaram pelo menos uma notificação nessa semana. Assim, para o ano de 2017, a PSOE resultou da média das PSOE semanais (2).

### **\_Resultados**

Durante o ano de 2017, entraram 11 médicos na RSL, o que correspondeu a 9 listas de utentes, pois 2 dos novos médicos-sentinela eram médicos internos que notificaram em equipa com o seu orientador de formação. Deste modo, durante o ano de 2017, o número total de médicos inscritos na rede local foi de 22, correspondendo a 16 listas de utentes em seguimento, encontrando-se distribuídos por 9 unidades de saúde. A maioria (81,8%) dos médicos-sentinela inscritos em 2017 exercia funções em unidades funcionais do concelho de Almada (figura 1).

A população máxima sob observação foi de 24.134 utentes (cerca de 2,4% da população residente) e a PSOE foi de 7.981

Figura 1: Distribuição geográfica dos médicos da Rede Sentinela Local em 2017, no ACES Almada-Seixal.



Mapa elaborado por Rita Roquette.

Tabela 1: Taxa de incidência (/10<sup>5</sup>) de alguns eventos em notificação na Rede Médicos-Sentinela no ano de 2017, no ACES Almada-Seixal.

Evento em notificação	Número de casos	Taxa de incidência (/10 <sup>5</sup> ) (IC 95%)
Depressão	54	676,6 (519,0 - 881,7)
Diabetes mellitus tipo 2	25	313,2 (212,3 - 462,0)
Hipertensão arterial	34	426,0 (299,8 - 588,6)
Enfarte agudo do miocárdio	4	50,1 (19,5 - 128,8)
Acidente vascular cerebral	12	150,4 (86,0 - 262,6)

utentes, tendo atingido o valor máximo de 14.564 utentes na semana 36/2017 (de 4 a 10 de setembro).

Dos problemas de saúde estudados, a depressão foi aquele que apresentou uma taxa de incidência mais elevada (676,6/10<sup>5</sup> indivíduos) e o enfarte agudo do miocárdio foi o que apresentou uma menor taxa de incidência (50,1/10<sup>5</sup> indivíduos) (tabela 1).

### \_Resultados

À exceção do acidente vascular cerebral, todos os outros problemas de saúde apresentaram estimativas pontuais de incidência inferiores às taxas de incidência anuais estimadas para Portugal em 2016 ou 2015 (2,4). Tal pode indicar um menor risco desses problemas de saúde, mas dada a menor regularidade de participação observada durante o primeiro semestre de 2017, e a reduzida dimensão amostral, consideramos que o número de casos identificados possa estar subnotificado. Como forma de avaliar a existência de eventual viés de subnotificação, propomos vir a comparar o número de casos notificados com o número de casos registados na lista de utentes dos médicos participantes na RSL durante o ano de 2017. Por outro lado, não conseguimos excluir que os médicos participantes na RSL tenham características distintas do universo de médicos de família do ACES Almada-Seixal ou que trabalhem em áreas geográficas com características específicas, o que poderá condicionar a existência de um viés de seleção. Erro que de futuro poderá vir a ser avaliado comparando a frequência de alguns eventos na RSL com o total de novos casos conhecidos para a área de abrangência do ACES.

Apesar da população máxima sob observação corresponder a cerca de 2,4% da população residente, valor próximo da cobertura da maioria das Redes Médicos-Sentinela europeias (5), a necessidade de garantir a representatividade de subgrupos populacionais específicos dentro da área geográfica do ACES Almada-Seixal, reforça a necessidade de aumentar o número de médicos participantes de acordo como os objetivos iniciais do projeto. Por outro lado, a menor regularidade de notificação observada no primeiro semestre de 2017 influenciou a redução da PSOE face à população

máxima sob observação (PSMO), indicando-nos a necessidade de investir em mecanismos de retro-informação e envio de lembretes periódicos, tal como foi feito no segundo semestre de 2017, para manter a regularidade da participação dos médicos na rede.

Salienta-se que durante o ano de 2017, a criação da RSL permitiu aumentar a população sob observação efetiva na Rede Médicos-Sentinela em cerca de 7.900 utentes, indo ao encontro dos objetivos nacionais de alargamento da rede. Já anteriormente tinham sido feitas experiências locais, por exemplo no Alentejo, que contribuíram para alargar a Rede Médicos-Sentinela, mas que não chegaram a implementar-se como projetos ou redes de carácter local.

## Conclusão

É reconhecido que em redes de participação voluntária, a motivação dos participantes é pedra angular para aumentar a adesão de novos médicos, mas também para manter a regularidade da sua participação (6). Neste sentido, os participantes da RSL consideram como pontos de motivação: i) a manutenção de mecanismos de retro-informação; e ii) o seu envolvimento no desenho e implementação de um estudo de investigação clínica ou epidemiológica que responda às necessidades locais de investigação em saúde. Assim, durante o ano de 2018, como estratégias de alargamento da RSL, considera-se avançar com o desenvolvimento do protocolo, e eventual implementação, do estudo sobre fatores de risco e prognóstico da doença isquémica cardíaca; discutir com a Direção de Internato de MGF a possibilidade de valorizar as atividades de participação na RSL no âmbito das atividades de investigação desenvolvidas durante o internato médico; e manter a valorização da participação na RSL em sede de contratualização das unidades de saúde.

## Agradecimentos:

A todos os médicos que integram a Rede Médicos-Sentinela Local pela recolha contínua de dados, à Inês Batista pelo apoio logístico prestado à Rede Médicos-Sentinela e à Rita Roquette pela elaboração do mapa do artigo.

## Referências bibliográficas:

- (1) Garcia AC, Pereira T, Freire AC, et al. Plano Local de Saúde de Almada-Seixal 2013-2016. Almada: ACES Almada-Seixal, 2013.
- (2) Rodrigues AP, Batista I, Silva S, et al. Médicos-Sentinela: o que se fez em 2016. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde, 2017. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/5006>
- (3) Rodrigues AP, Fonseca R, Matias-Dias C. Rede Médicos-Sentinela como instrumento de vigilância em saúde pública. *Acta Med Port* 2016;29(1):5-9. <https://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/viewFile/5938/4580>
- (4) Rodrigues AP, Batista I, Sousa-Uva Mafalda, Silva S. Médicos-Sentinela: o que se fez em 2015. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde, 2017. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/4066>
- (5) Deckers JGM, Paget JW, Schellevis FG, et al. European primary care surveillance networks: their structure and operation. *Family Practice* 2006; 23(1):151-8.
- (6) Alonso AT, Llorens OZ, Truyols AG, et al. Redes centinela sanitarias en España: consenso para una guía de principios y métodos. *Gac Sanit* 2006;20(6):496-502. <http://scielo.isciii.es/pdf/gsv/v20n6/especial.pdf>

## ficha técnica

**\_ Título:** Boletim Epidemiológico Observações

**\_ Periodicidade:** Quadrimestral

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

**\_ Numeração:** 2ª série

Volume 7, número 22

maio - agosto 2018

**\_ Diretor**

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

**\_ Editores**

Carlos **Matias Dias**, Departamento de Epidemiologia

Elvira **Silvestre**, Biblioteca da Saúde

**\_ Conselho Editorial Científico**

Carlos **Matias Dias**, Departamento de Epidemiologia

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

Jorge **Machado**, Departamento de Doenças Infeciosas

Manuela **Cano**, Departamento de Saúde Ambiental

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

Silvia **Viegas**, Departamento de Alimentação e Nutrição

Peter **Jordan**, Conselho Científico do INSA

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

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

© Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP 2018.

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

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

**Instituto Nacional de Saúde** Doutor Ricardo Jorge

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

Tel.: (+351) 217 519 200

Fax: (+351) 217 529 400

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

[www.insa.pt](http://www.insa.pt)