

Riscos e Alimentos

Carne e Produtos Cárneos



Novas metodologias para a identificação de adulterações de produtos cárneos com carne de cavalo

Autenticação de produtos cárneos com a designação Halal: Deteção e quantificação de derivados de suíno

Clones de Salmonella não tifóide em produtos cárneos e seu impacto no Homem

ÍNDICE

Editorial - pág. 2

ASAE e a EFSA - Cooperação com a EFSA em 2015 - pág. 3

Novas metodologias para a identificação de adulterações de produtos cárneos com carne de cavalo - **pág. 4**

Deteção de fraudes alimentares em carne - análise de ADN - **pág. 8**

Autenticação de produtos cárneos com a designação Halal: Deteção e quantificação de derivados de suíno (*Sus scrofa*) - **pág. 11**

Avaliação da autenticidade de Alheiras de caça por identificação específica de espécies - **pág. 14**

Riscos e benefícios associados ao consumo de carne de caça - **pág. 17**

Aditivos alimentares em produtos à base de carne - **pág. 21**

Clones de Salmonella não tifóide em produtos cárneos e seu impacto no Homem - **pág. 25**

A segurança alimentar dos produtos cárneos no mercado retalhista, face aos resultados do Plano Nacional de Colheita de Amostras (PNCA) - **pág. 29**

“ASAE vai à Escola”- Um instrumento de apoio à sensibilização e promoção da higiene e segurança alimentar - **pág. 34**

Editorial

Pedro Portugal Gaspar
Inspetor Geral da ASAE



“Riscos e Alimentos” é uma revista de carácter científico, de periodicidade semestral, editada pela área Técnico-Científica da ASAE, que se dedica a publicar artigos sobre os riscos associados a uma determinada categoria de alimentos. Trata-se portanto de um espaço de reflexão independente e científico onde são colocadas questões centrais da segurança alimentar, concretizando deste modo a responsabilidade da ASAE enquanto a entidade nacional com competência para a avaliação, comunicação e gestão do risco na cadeia alimentar. Sendo aliás relevante recordar que tal panóplia de competências, que a ASAE detém nesta matéria, é única no quadro comparado europeu.

Nesta edição a nossa preocupação centra-se nos produtos à base de carne, razão pela qual há diversos artigos de professores da Academia Portuguesa e colaboradores da ASAE, os quais trazem ao conhecimento geral informação sobre os riscos associados ao consumo de produtos à base de carne e ainda as fraudes que podem ocorrer, sendo que na maioria das situações as fraudes não constituem risco para saúde. A importância de dedicar uma publicação a este tipo de alimentos, deve-se ao facto de serem produtos com um elevado padrão de consumo em Portugal, o que não só implica um debate técnico-científico, como igualmente a uma intensificação do controlo oficial.

Naturalmente que todos temos conhecimento da longevidade da produção dos produtos à base de carne, na qual o recurso a métodos tradicionais está a ser substituído por metodologias mais ou menos industrializadas, em que em certos casos são adicionadas substâncias químicas, nomeadamente os designados aditivos alimentares.

Deste modo, recomendo assim que se faça uma leitura atenta desta edição, que servirá certamente para um melhor conhecimento dos desafios que se colocam ao consumidor.

“ASAE e a EFSA”

Cooperação com a EFSA em 2015

Cristina Baptista Rodrigues

Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, Departamento de Riscos Alimentares e Laboratórios

A missão da ASAE encontra-se definida na sua lei orgânica (Dec.-Lei 194/2012) como *“fiscalização e prevenção do cumprimento da legislação reguladora do exercício das atividades económicas nos sectores alimentar não alimentar bem como a avaliação e comunicação dos riscos ,na cadeia alimentar sendo o organismo nacional de ligação com as suas entidades congéneres, a nível europeu e internacional.”*

A avaliação de riscos e o controlo oficial que verifica o cumprimento da legislação nacional e europeia de modo a garantir ao consumidor, segurança dos géneros alimentícios, nomeadamente da carne e produtos cárneos, fazem parte da missão da ASAE. Estudos de autenticidade e identificação das espécies animais, bem como a deteção de aditivos e pesquisa de contaminantes são efetuados segundo métodos acreditados nos laboratórios da ASAE.

Cada vez mais a ASAE tenta melhorar a sua função preventiva, não só divulgando os riscos existentes como analisando os riscos emergentes. A cooperação com o seu Conselho Científico e Painéis Temáticos, a utilização do conhecimento científico dos melhores especialistas nacionais e a participa-

ção nas redes científicas da EFSA permitem aceder aos últimos resultados em termos de avaliação de risco em segurança alimentar.

A cooperação entre a ASAE e a EFSA tem vindo a ser reforçada nos últimos anos, sobretudo pelo aumento do número de especialistas do Conselho Científico e dos Painéis Temáticos da ASAE, que estão integrados nas redes científicas da EFSA.

No âmbito da Comunicação de Riscos, realça-se a recente publicação de um livro infantil sobre segurança alimentar com possibilidade de ser publicada em inglês, bem como a visita prevista do Sr. Diretor Executivo da EFSA, Bernard Url, e a sua participação no seminário comemorativo do décimo aniversário da ASAE a realizar no próximo mês de novembro.

Outras atividades têm sido desenvolvidas na área preventiva em que se enquadra esta publicação - Riscos e Alimentos- como o ciclo mensal de conferências comemorativas do 10º aniversário da ASAE e os estudos que se encontram atualmente a ser desenvolvidos pelos seis Painéis Temáticos da ASAE.



Novas metodologias para a identificação de adulterações de produtos cárneos com carne de cavalo

Liliana Meira¹, Isabel Mafra^{1,*}, Joana Costa¹, Joana S. Amaral², Fernando Ramos³, M. Beatriz P. P. Oliveira¹

¹REQUIMTE, Departamento de Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Portugal, ²ESTiG, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal, ³Faculdade de Farmácia, Universidade do Coimbra, Portugal (*E-mail: isabel.mafra@ff.up.pt)

Introdução

O consumo de carne de cavalo depende, principalmente, dos hábitos alimentares das populações que habitam em algumas regiões. Regra geral, este animal é mais consumido nos países onde é produzido [1]. Ao longo dos tempos, o seu consumo tem variado amplamente de acordo com as diferenças culturais e económicas da sociedade. Este animal fornece uma fonte, relativamente barata, de proteína animal em países onde os cavalos são extensivamente utilizados como animais de trabalho e transporte humano [2]. A textura da carne de cavalo é relativamente firme, e o seu sabor adocicado é-lhe atribuído pelo seu elevado teor em glicogénio, em comparação com outras espécies [1]. Esta carne contém um elevado teor em água, proteínas, ferro e vitaminas, que são solúveis em água. O seu menor teor em lípidos e elevado em fibras musculares e vitaminas insolúveis em água torna-a diferente, em comparação com a carne bovina e suína [3]. Muitas vezes a ingestão de carne de cavalo esteve associada a épocas de escassez de alimentos. Contudo, o consumo deste animal é relativamente popular nos países nórdicos e asiáticos, bem como na Itália [4]. Nos países membros da UE, o consumo médio por habitante é de apenas 0,4 kg por ano, mas devido a uma produção insuficiente a importação abrange 66,7% das necessidades do mercado [3].

Apesar do consumo deste animal ser uma prática comum em certas regiões, a deteção de carne de cavalo em produtos alimentares gerou um escândalo internacional, uma vez que a sua presença não estava mencionada na rotulagem. A não indicação desta espécie resulta numa fraude alimentar uma vez que o consumidor não pode optar pela ingestão deste tipo de carne. Para além disso, pode pôr em risco a saúde do consumidor quando as carcaças inseridas na cadeia alimentar tenham sido tratadas com a substância fenilbutazona, utilizada num medicamento veterinário. A fenilbutazona é considerada tóxica para a medula óssea e a exposição a esta substância tem sido associada a uma anemia aplásica. Existem também incertezas quanto ao seu potencial de genotoxicidade e carcinogenicidade. Uma vez que é

difícil identificar o que desencadeia a anemia, não é possível definir um nível seguro de resíduos na carne. Assim, sempre que estes animais sejam tratados com este medicamento serão excluídos para o consumo humano, sendo a sua entrada na cadeia alimentar uma prática ilegal [5].

As incidências globais de adulteração dos alimentos são cada vez mais comuns o que leva à perturbação do comércio internacional devido a disputas frequentes sobre os requisitos da qualidade e segurança alimentar. Assim, de forma a garantir a segurança e qualidade dos mesmos, o controlo dos alimentos tem aumentado. No caso particular dos produtos cárneos, o foco da adulteração é a substituição parcial ou total de espécies com menor valor comercial, resultando em ganhos comerciais e podendo afetar a saúde pública e valores morais [6].

A identificação de espécies em alimentos torna-se essencial para verificar autenticidade dos alimentos, especialmente nos produtos cárneos, onde o processamento dificulta a distinção dos diferentes componentes [7]. O consumidor tem o direito de uma escolha informada, que pode ser reflexo do seu estilo de vida, práticas religiosas ou problemas de saúde. Portanto, uma rotulagem correta e verdadeira é fundamental para informar os consumidores sobre a identidade e a qualidade dos produtos alimentares que estão a comprar [8].

Identificação de espécies em produtos cárneos

A identificação de espécies visa impedir fraudes alimentares relacionadas com a substituição total ou parcial por espécies similares mais económicas, protegendo espécies em vias de extinção e garantindo aos consumidores que as suas escolhas correspondam ao seu estilo de vida, religião ou saúde [9]. É um importante meio para verificar a rotulagem dos alimentos, conforme o exigido pela Diretiva 2002/86/CE, onde consta que os produtos cárneos devem conter nos seus rótulos a indicação de cada uma das espécies animais utilizadas e as respetivas quantidades. Deste modo, o desenvolvimento de ferramentas analíticas suficientemente confi-

áveis e sensíveis, a fim de facilitar a identificação de espécies em diferentes alimentos é de elevada importância [11]. A identidade das espécies pode ser conseguida utilizando métodos baseados na análise de proteínas ou na análise de ADN.

Os métodos baseados na análise de proteínas incluem electroforese, cromatografia e técnicas imunológicas [11]. No entanto, estes métodos têm provado ser inadequados e menos sensíveis para a identificação de espécies em produtos que tenham sido expostos a altas temperaturas, pois como anteriormente foi referido, durante o tratamento térmico as proteínas desnaturam. Por outro lado, os métodos de análise de ADN com base na reação em cadeia da polimerase (PCR) permitem a deteção precisa da espécie, mesmo que os produtos tenham sido submetidos a tratamento térmico e a sua composição seja complexa [10].

Os métodos de ADN têm sido considerados ferramentas essenciais para a identificação de espécies em alimentos. A escolha destes métodos tem sido atribuída à sua elevada especificidade e sensibilidade, permitindo a deteção de pequenas quantidades de ADN em alimentos crus e processados. Comparando com os métodos proteicos, a análise de ADN tira partido da ubiquidade dos ácidos nucleicos em todo o tipo de células e da sua elevada estabilidade [12].

Nos últimos anos, vários estudos têm sido descritos para identificação de espécies animais usando a técnica de PCR. A grande maioria dos estudos tem tido como objetivo a identificação de animais domésticos, tais como vaca, ovelha, cabra, porco, peru e galinha. Por outro lado, a carne de caça tem também sido alvo de identificação em produtos cárneos devido ao seu elevado valor comercial e, consequentemente, suscetível de adulterações [13].

Relativamente à espécie *Equus caballus*, têm sido desenvolvidos alguns trabalhos para a sua identificação baseados em espectroscopia [14], cromatografia [15], ensaios ELISA [16] e métodos baseados na análise de ADN com base na PCR qualitativa [17]. A técnica de PCR em tempo real, em contraste com a PCR qualitativa, permite discriminar e quantificar espécies que se encontrem em quantidades vestigiais e em alimentos de composição complexa, tornando-se numa ferramenta promissora para autenticação de produtos cárneos. Esta técnica quantitativa representa uma evolução considerável em relação à técnica anterior, sendo amplamente aceite como um ensaio robusto, devido à sua maior sensibilidade e especificidade, maior gama de deteção, menor risco de contaminação, fácil execução e rapidez. Esta metodologia,

cujas amplificação do gene alvo é monitorizada por um aumento de sinal de fluorescência, permite a avaliação direta dos resultados após aplicação da PCR. Atualmente existem dois formatos para correlacionar a quantidade dos produtos da PCR com o sinal de fluorescência: sondas e corantes fluorescentes [18]. Na Tabela 1 apresenta-se um resumo dos trabalhos publicados com base em métodos de PCR aplicados à deteção de cavalo em alimentos.

Identificação da espécie *Equus caballus* em produtos cárneos

Após o escândalo internacional ocorrido no ano 2013, em que milhares de produtos cárneos foram retirados do mercado pela sua adulteração com esta espécie, tornou-se de especial importância verificar a conformidade da rotulagem. As metodologias utilizadas têm sido baseadas na análise de ADN uma vez que a maior parte dos produtos comerciais tinham sido processados, o que compromete a eficácia dos métodos proteicos.

Recentemente, um método de PCR em tempo real foi proposto para a deteção e quantificação de carne de cavalo em alimentos processados [25]. Para o referido estudo, misturas binárias contendo carne de cavalo em carne de vaca foram usadas com referência, em cru e processadas termicamente. Para especificamente detetar cavalo, desenhou-se um novo par de *primers* de forma a amplificar um fragmento (141 pb) do gene mitocondrial *cytb*, que permitiu o desenvolvimento de dois métodos de deteção baseados em dois tipos de técnicas: PCR qualitativa e PCR em tempo real. A técnica de PCR com *primers* específicos para cavalo demonstrou ter elevada especificidade e sensibilidade, atingindo um limite de deteção (LOD) absoluto de 1 pg e 10 pg para ADN de cavalo de carne crua e processada, respetivamente. Em relação ao LOD relativo, obtiveram-se valores de 10 mg/kg (0,001%) e de 100 mg/kg (0,01%) para misturas binárias cruas e processadas, respetivamente. Em ambos os limites, as misturas autoclavadas atingiram valores superiores, o que seria de esperar, pois o tratamento térmico afeta a integridade do ADN, tornando-o mais difícil de detetar.

O método foi aplicado a um total de 67 amostras comerciais contendo carne de vaca na rotulagem por se considerarem ser as mais propícias de serem adulteradas com adição de carne de cavalo. Das amostras testadas, 33 foram adquiridas em 2012, ou seja, antes do escândalo da carne de cavalo. As restantes 34 foram adquiridas em grandes superfícies, durante 2013/2014, ou seja, posteriores ao escândalo.

Tabela 1. Resumo dos trabalhos reportados na literatura baseados na análise de ADN para a identificação da espécie *Equus caballus* em produtos cárneos

Espécies	Amostras	Técnica Utilizada	Gene Alvo	Limite de detecção	Referência
Cavalo, Burro	Produtos comerciais com cavalo	PCR em tempo real	<i>cytb</i>	25 pg de ADN	[19]
Suíno, Cavalo, Burro	Salsichas cozinhadas	PCR com primers específicos	ATPase 8/ATPASE6, ND5	0,1 %	[20]
Suíno, galinha, peru, bovino, cavalo e ovino	Misturas de carne	PCR em tempo real	<i>cytb</i> Satelite IV	125 pg de ADN 0,1%	[21]
Cavalo, burro, suíno	Produtos cárneos crus e processados	PCR em tempo real	ATPase 8/ATPASE6, ND2, ND5	0,1 pg de ADN 0,0001%	[10]
Suíno, galinha, peru, bovino, cavalo, ovino e caprino	Salsichas cruas e processadas	PCR em multiplex	<i>cytb</i> <i>β-actin</i>	2% para peru, ovino e caprino e 1% para os restantes	[22]
Bovino, suíno, cavalo e caprino	Salsichas cruas e processadas	PCR em multiplex	<i>β-actin</i>	320 pg de ADN	[23]
Suíno, caprino, galinha, avestruz, cavalo, bovino	Carnes comerciais e produtos cárneos	Deteção direta em multiplex	<i>cytb</i> , 12s rARN, <i>t-Glu-cytb</i> , COI	12,500 cópias de mtADN em suíno, caprino, galinha e bovino; 25,000 e 50,000 cópias de mtADN em cavalo e avestruz, respetivamente	[24]
Cavalo	Produtos cárneos crus e processados	PCR com primers específicos e PCR em tempo real	<i>cytb</i>	1 pg e 10 pg para extractos de ADN crus e processados, respetivamente; 0,001% e 0,01% para misturas binárias cruas e processadas, respetivamente; 0,1 pg e 0,0001% para ambas as amostras	[25]

Todas as amostras analisadas não estavam rotuladas com a presença de carne de vaca. Após aplicação, o método mostrou-se efetivo nas amostras comerciais, revelando a presença de cavalo em duas amostras, hambúrguer e uma salsicha (anteriores ao “escândalo de cavalo”).

Para obter resultados quantitativos passou-se à análise pelo método de PCR em tempo real. Nesta etapa utilizou-se o mesmo conjunto de *primers* e o corante EvaGreen com posterior análise de *melting*. Através desta técnica quantitativa foi possível diminuir o LOD relativo e absoluto até 1 mg/kg (0,0001%) e 0,1 pg, respetivamente, não sendo a sensibilidade afetada pelo tratamento térmico.

Posteriormente, para quantificação das amostras, anteriormente positivas, foi necessário desenvolver um modelo quantitativo para normalizar a técnica de PCR em tempo real, uma vez que elimina diferenças entre os extratos. Assim, procedeu-se à construção de um modelo de calibra-

ção baseado no método ΔCt utilizando um gene eucariota como controlo endógeno. O uso de um controlo endógeno é muito importante quando se trata de uma análise quantitativa, especialmente quando produtos processados têm uma composição complexa. O modelo desenvolvido revelou elevada performance uma vez que os resultados obtidos estavam de acordo com os critérios de aceitação para as técnicas de PCR em tempo real.

Posteriormente, utilizando amostra cegas, procedeu-se à validação do modelo de calibração. A quantificação das amostras cegas revelou que o modelo era exato, uma vez que os valores estimados foram próximos dos valores reais, e preciso, devido aos coeficientes de variação entre os ensaios.

Construído e validada a técnica quantitativa foi então possível passar à quantificação das amostras positivas na técnica qualitativa. Os resultados para estas duas amostras positivas

revelaram que ambas continham quantidades vestigiais de ADN de cavalo (0,19% - salsicha, <LOD – hambúrguer), o que nos leva a concluir que a presença desta espécie poderá ter resultado de uma contaminação cruzada na linha de produção e não como resultado de uma adição fraudulenta.

Considerações finais

Recentemente, emergiu um escândalo a nível internacional associado à adição não declarada de carne de cavalo em alimentos processados. A presença desta espécie não coloca problemas para a saúde dos consumidores, exceto se a carne adicionada contiver fenilbutazona, uma vez que não é permitido usar este fármaco para consumo humano pois pode causar patologias, tais como anemia aplásica. Da mesma forma, não estando estabelecido um limite máximo para este contaminante, animais tratados com este anti-inflamatório não podem ser destinados ao consumo humano. Contudo, a presença da espécie cavalo não declarada é considerada uma fraude alimentar e, como tal, importante de ser detetada. Para este efeito, os métodos baseados na análise de ADN mostraram ser ferramentas úteis e adequadas.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) através do projeto PEst-C/EQB/LA0006/2013.

Referências

- [1] Litwinczuk, A., Florek, M., Skalecki, P., & Litwińczuk, Z. (2008) Chemical composition and physicochemical properties of horse meat from the longissimus lumborum and semitendinosus muscle. *Journal of Muscle Foods*, 19: 223-236.
- [2] Gill, C.O. (2005) Safety and storage stability of horse meat for human consumption. *Meat Science*, 71:506-513.
- [3] Dobranic', V., Njari, B., Miokovic', B., Fleck, Z.C., & Kadivc, M. (2009). Chemical composition of horse meat. *Meso* 11:62-97.
- [4] Mateus, E. (2009). Animais à Mesa. Zoonoses e Estratégias no Consumo de Carne. Mestrado em Antropologia Social e Cultural Lisboa, Universidade de Lisboa.
- [5] EFSA/EMA (2013). Joint Statement of EFSA and EMA on the presence of residues of phenylbutazone in horse meat. *EFSA Journal*.
- [6] Premanandh, J. (2013). Horse meat scandal – A wake-up call for regulatory authorities. *Food Control*, 34:568-569.
- [7] Amaral, J.S., Santos, C.G., Melo, V.S., Estevinho, L., Oliveira, M.B.P.P., & Mafra, I. (2015). Identification of duck, partridge, pheasant, quail, chicken and turkey meats by species-specific PCR assays to assess the authenticity of traditional game meat Alheira sausages. *Food Control*, 47: 190-195.
- [8] Ballin, N.Z. (2010). Authentication of meat and meat products. *Meat Science*, 86:577-587.
- [9] Bottero, M.T., & Dalmaso, A. (2011). Animal species identification in food products: Evolution of biomolecular methods. *The Veterinary Journal*, 190:34-38.
- [10] Kesmen, Z., Gulluce, A., Sahin, F., & Yetim, H. (2009). Identification of meat species by TaqMan-based real-time PCR assay. *Meat Science*, 82:444-449.
- [11] Cammà, C., Di Domenico, M., & Monaco, F. (2012). Development and validation of fast real-time PCR assays for species identification in raw and cooked meat mixtures. *Food Control*, 23:400-404.
- [12] Mafra, I., Ferreira, I.M.P.L.V.O., & Oliveira, M.B.P.P. (2008). Food authentication by PCR-based methods. *European Food Research and Technology*, 227:649-665.
- [13] Amaral, J.S., Santos, C.G., Melo, V.S., Oliveira, M.B.P.P., & Mafra, I. (2014). Authentication of a traditional game meat sausage (Alheira) by species-specific PCR assays to detect hare, rabbit, red deer, pork and cow meats. *Food Research International*, 60: 140-145.
- [14] Boyaci, İ.H., Temiz, H.T., Uysal, R.S., Velioglu, H.M., Yadegari, R.J., & Rishkan, M.M. (2014). A novel method for discrimination of beef and horse-meat using Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, 148:37-41.
- [15] Barga, C., Brockmeyer, J., & Humpf, H.-U. (2014). Meat Authentication: A New HPLC-MS/MS Based Method for the Fast and Sensitive Detection of Horse and Pork in Highly Processed Food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62:9428-9435.
- [16] Hsieh, Y.-H.P., & Ofori, J.A. (2014). Detection of Horse Meat Contamination in Raw and Heat-Processed Meat Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62:12536-12544.
- [17] Safdar, M., Junejo, Y., Arman, K., & Abasiyanik, M.F. (2014). A highly sensitive and specific tetraplex PCR assay for soybean, poultry, horse and pork species identification in sausages: Development and validation. *Meat Science*, 98:296-300.
- [18] Fajardo, V., González, I., Martín, I., Rojas, M., Hernández, P.E., García, T., & Martín, R. (2008). Real-time PCR for detection and quantification of red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) in meat mixtures. *Meat Science*, 79:289-298.
- [19] Chisholm, J., Conyers, C., Booth, C., Lawley, W., & Hird, H. (2005). The detection of horse and donkey using real-time PCR. *Meat Science*, 70:727-732.
- [20] Kesmen, Z., Sahin, F., & Yetim, H. (2007). PCR assay for the identification of animal species in cooked sausages. *Meat Science*, 77:649-53.
- [21] Jonker, K.M., Tilburg, J.J., Hagele, G.H., & De Boer, E. (2007). Species identification in meat products using real-time PCR. *Food Additives and Contaminant Part A*, 25:527-33.
- [22] Köppel, R., Zimmerli, F., & Breitenmoser, A. (2009). Heptaplex real-time PCR for the identification and quantification of DNA from beef, pork, chicken, turkey, horse meat, sheep (mutton) and goat. *European Food Research and Technology*, 230:125-133.
- [23] Köppel, R., Ruf, J., & Rentsch, J. (2011). Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, horse and sheep. *European Food Research and Technology*, 232:151-155.
- [24] Kitpipit, T., Sittichan, K., & Thanakiatkrai, P. (2014). Direct-multiplex PCR assay for meat species identification in food products. *Food Chemistry*, 163:77-82.
- [25] Meira, L. (2014). Desenvolvimento de metodologias de biologia molecular para a deteção de carne de cavalo (*Equus caballus*) em produtos cárneos. MSc Thesis, Pharmacy Faculty, Coimbra, Portugal.

"Detecção de fraudes alimentares em carne - análise de ADN"

Manuela Sol; Ana Rita Alberty; Isabel Mâncio; Tiago Machado

Laboratório de Microbiologia da ASAE

Resumo

A informação incorreta com intuítos fraudulentos de alimentos é um problema antigo e generalizado, em particular, em produtos com elevado valor económico como a carne e os produtos cárneos.

Nos últimos anos, na sequência de "escândalos" como o das vacas loucas e, mais recentemente, o da carne de cavalo, o interesse dos consumidores com a autenticidade dos produtos cárneos tem aumentado. Muitos consumidores estão preocupados com a carne que consomem, e uma rotulagem correta é um importante meio para permitir que o consumidor possa fazer uma escolha bem informada.

Embora estas práticas configurem fraude ao consumidor não se pode descartar completamente a possibilidade de constituírem também perigos alimentares e infringirem questões de fé religiosa.

De modo a assegurar o rigoroso cumprimento das regras de rotulagem as autoridades de controlo alimentar deverão recorrer a laboratórios que tenham implementadas metodologias de análise robustas e fiáveis para avaliar a autenticidade dos produtos alimentares.

Introdução

A fraude com alimentos acontece desde a antiguidade, existindo registos do período do império romano onde se referem casos de falsificação de vinho. Noutros casos, espécies de elevado valor comercial são substituídas, parcial ou totalmente, por outras de menor valor. Assim, enquanto as ações de fraude são muitas vezes semelhantes às que ocorrem atualmente, a escala em que ocorrem e o impacto que têm nas populações são incomparavelmente maiores ocorrendo muitas vezes à escala continental.

A motivação para a fraude alimentar é econômica, mas o seu resultado ou impacto pode ter graves impactos na saúde pública constituindo-se assim um problema de segurança alimentar.

A visão tradicional de segurança alimentar concentra-se no controlo da presença de um conjunto de organismos e/ou substâncias químicas reconhecidos como perigosos para a saúde. O caso de adulteração fraudulenta com a adição de melamina a alimentos é paradigmático desta situação. Um outro caso envolvendo rotulagem enganadora, com implicações negativas na saúde dos consumidores, é a presença de alérgenos não declarados ou a substituição de espécies com menor potencial alergénico por outras de maior potencial, como são os casos de substituição de carne de vaca por carne de porco ou, em produtos lácteos, a substituição de leite de cabra por leite de vaca. As alergias alimentares são consideradas um problema emergente de saúde pública, especialmente nos países desenvolvidos.

No caso de presença acidental, uma proposta semelhante à adotada para OGM foi apresentada e tem sido utilizada. Resultados analíticos inferiores a 1% podem ser considerados como contaminação acidental.

Assim, quando se ponderam todas estas preocupações é crucial para os consumidores que a indústria alimentar e as autoridades de controlo alimentar, verifiquem a veracidade da rotulagem.

Os métodos de análise de autenticidade alimentar, utilizados para a identificação de espécies incluem técnicas histológicas, detecção de metabolitos e estudo de compostos específicos, (sobretudo de proteínas), e incluem técnicas de electroforese, cromatografia e imunoensaios.

Mais recentemente, as moléculas de ADN têm sido os compostos alvo das metodologias de identificação espécies devido à sua estabilidade, especificidade e presença na maior parte dos tecidos biológicos. Atualmente a maioria dos métodos que utilizam ADN para detecção e identificação de espécies, tem por base a amplificação de fragmentos de ADN, característicos da espécie a identificar pela reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* - PCR).

O método da PCR é utilizado para amplificar uma sequência específica de ADN. Esta sequência é normalmente amplificada numa reação contendo uma polimerase termoestável, nucleótidos e *primers* complementares da sequência alvo. Os produtos resultantes da reação de PCR podem ser visualizados em gel de agarose (*end point* PCR). Atualmente, o método da PCR convencional (*end point* PCR) tem vindo a ser substituído pelo método da PCR em tempo real. Este método tem o mesmo princípio da PCR convencional mas a amplificação do ADN é detetado à medida que a reação decorre "em tempo real". Na PCR em tempo real são utilizadas sondas fluorescentes específicas para detetar o ADN amplificado por hibridização com a porção amplificada. Numa das extremidades, destas sondas, está ligado um fluoróforo e na outra um *quencher* que suprime a produção de fluorescência. Se a sequência alvo está presente durante a PCR, a amplificação ocorre, resultando no aumento de fluorescência. A deteção de fluorescência permite concluir a presença do organismo alvo.

O método da PCR (convencional ou em tempo real) apresenta um elevado poder discriminativo porque a identificação é feita ao nível da sequência dos fragmentos de ADN específicos e únicos da espécie, permitindo obter resultados inequívocos. Apresenta ainda, como vantagem importante o elevado grau de sensibilidade, permitindo detetar 0,1%, ou mesmo níveis inferiores, de uma espécie, numa matriz alimentar complexa.

O Laboratório de Microbiologia (LM) da ASAE em 2011 deu início à instalação de uma área de Biologia Molecular e à implementação de métodos da PCR. A opção feita foi por métodos de PCR em tempo real uma vez que esta metodologia é mais expedita quando comparada com a PCR convencional.

Em 2013 deu-se início à parceria com a empresa Biopremier visando consolidar e desenvolver as competências do LM nas metodologias de Biologia Molecular, nomeadamente na área da autenticidade alimentar. Em 2014, com a assinatura do protocolo com a empresa Biopremier, o laboratório alargou a sua atividade a um âmbito distinto do até aí em prática - a autenticidade alimentar. Foram assim implementadas a deteção e quantificação do ADN das espécies cavalo, vaca, porco, galinha, peru, pato, ovelha e cabra por PCR em tempo real. Em outubro o LM deu início às análises de autenticidade alimentar no âmbito o Plano Nacional de Colheita de Amostras (PNCA).

Material, Métodos e Resultados

Material

Foram analisadas 153 amostras de géneros alimentícios colhidas no âmbito do Plano Nacional de Colheita de Amostras (PNCA) no período entre Outubro de 2014 e Maio de 2015

Métodos

Extração de ADN:

NucleoSpin® Food by MACHEREY-NAGEL

Deteção e Quantificação de espécies animais:

Food Safe Goat DNA Detection Kit da BIOPREMIER

Food Safe Horse DNA Detection Kit da BIOPREMIER

Food Safe Chicken DNA Detection Kit da BIOPREMIER

Food Safe Lamb DNA Detection Kit da BIOPREMIER

Food Safe Duck DNA Detection Kit da BIOPREMIER

Food Safe Turkey DNA Detection Kit da BIOPREMIER

Food Safe Swine DNA Detection Kit da BIOPREMIER

Food Safe Cow DNA Detection Kit da BIOPREMIER

PCR em tempo real

Termociclador: CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System

Condições de PCR: A reação de PCR é constituída por 18 µL de *mix* e 2 µL de ADN extraído. A concentração do ADN extraído é de cerca de 25 ng/µL.

O protocolo de amplificação utilizado é:

Espécies de cavalo, porco, peru e galinha

Desnaturação inicial - *holding* a 50 °C durante 2 min., desnaturação a 95 °C durante 5 min. Amplificação (30 ciclos) - desnaturação a 95 °C durante 30 s, *annealing* a 60 °C durante 30 s, extensão a 72 °C durante 30 s.

Espécies de vaca, ovelha e cabra

Desnaturação inicial - *holding* a 50 °C durante 2 min., desnaturação a 95 °C durante 5 min. Amplificação (30 ciclos) - desnaturação a 95 °C durante 30 s, *annealing* a 52 °C durante 30 s, extensão a 72 °C durante 30 s.

Espécie de pato

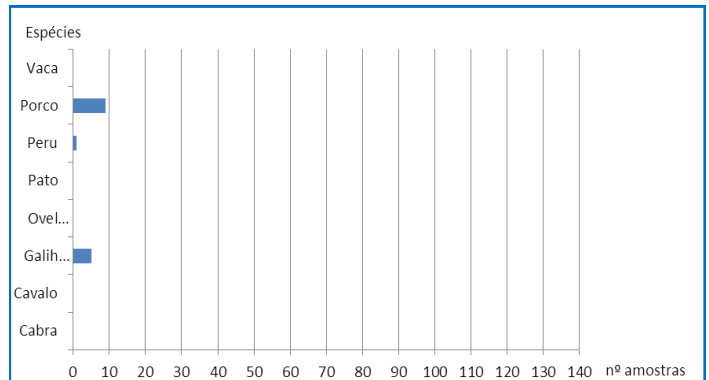
Desnaturação inicial - *holding* a 50 °C durante 2 min., desnaturação a 95 °C durante 5 min. Amplificação (30 ciclos) - desnaturação a 95 °C durante 30 s, *annealing* a 56 °C durante 30 s, extensão a 72 °C durante 30 s.

Limite de detecção:

Espécies de cavalo, porco, galinha, peru, pato, ovelha e cabra - 0,1%

Espécie de vaca - 0,5%

Gráfico 2 - Quantificação do ADN de espécies



Resultados

Foram analisadas 153 amostras de géneros alimentícios.

As determinações realizadas em cada amostra são selecionadas de modo a verificar a conformidade com o referido na rotulagem.

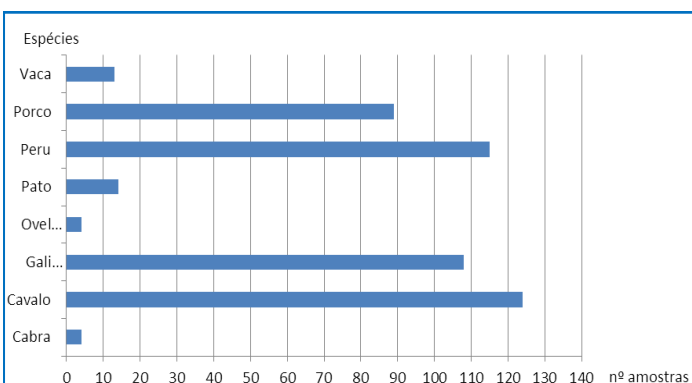
Sempre que é detetada uma espécie não referida na rotulagem é realizado a quantificação do ADN presente.

Se o valor da quantificação for inferior a 1 % considera-se a contaminação adventícia e a amostra é considerada conforme.

Foram realizadas 486 determinações das quais 471 ensaios de deteção de espécies animais e 15 ensaios de quantificação.

Nos gráficos 1 e 2 estão sumarizados os resultados das determinações realizadas.

Gráfico 1 - Deteção do ADN de espécies



Conclusões

Neste curto período em que se realizaram os ensaios das 153 amostras 5 não estavam de acordo com o descrito rótulo.

A importância das autoridades de controlo alimentar realizarem e manterem uma vigilância rigorosa do mercado é uma ferramenta essencial para o controlo deste tipo de fraudes.

Nesta prestativa é relevante a realização destes métodos pelo Laboratório Microbiologia da ASAE e a manutenção desta capacidade analítica e a implementação de novos métodos permitirá reforçar a capacidade de intervenção da ASAE nesta área.

Referências

Ballin, N. Z. (2010). Authentication of meat and meat products - A review. *Meat Science*, 86, 577-587.

Johnson, H. (1989). *Vintage: The Story of Wine*. Simon and Schuster. pg 64-67.

Nakyinsige, K., Che Man, Y. B., Sazili, A. Q. (2012). Halal authenticity issues in meat and meat products - A review. *Meat Science*, 91, 207-214.

Premanandh, J. (2013). Horse meat scandal - A wake-up call for regulatory authorities. *Food Control*, 34, 568-569.

Primrose, S., Woolfe, M., Rollinson, S. (2010). Food forensics: methods for determining the authenticity of foodstuffs. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 582-590.

Autenticação de produtos cárneos com a designação *Halal*: Detecção e quantificação de derivados de suíno (*Sus scrofa*)

Joana S. Amaral^{1,2}, Joana Costa¹, Isabel Mafra^{1,*}, M. Beatriz P. P. Oliveira¹

¹REQUIMTE, Departamento de Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Portugal. ²ESTiG, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal. (*E-mail: isabel.mafra@ff.up.pt)

Introdução

Devido aos recentes escândalos alimentares relacionados com adulterações em produtos cárneos, tem-se assistido a uma maior atenção por parte dos consumidores e autoridades sobre a ocorrência de fraudes neste setor, especialmente no que respeita a substituição de carne de espécies animais de valor elevado por proteínas musculares de mais baixo custo. Em particular, devido ao seu baixo preço e elevada disponibilidade, a carne de porco e/ou derivados de suíno (gordura, plasma, colagénio, entre outros) podem ser fraudulentamente adicionados em produtos cárneos, tendo por objetivo o aumento de lucros de fabricantes pouco escrupulosos [1,2]. Para além destas práticas representarem uma fraude económica, a presença de espécies animais não declaradas na rotulagem é algo que causa elevada preocupação em certos grupos religiosos para os quais o consumo de determinadas espécies é proibido. Em particular, de acordo com a lei Islâmica, os muçulmanos podem apenas consumir carne *Halal*, sendo o consumo de porco e seus derivados estritamente proibidos (entre outras espécies). Desta forma, mesmo que na produção de produtos cárneos sejam utilizados apenas colagénio ou gordura de porco, esses alimentos passam a ser considerados como *Haram* (inaceitáveis para consumo muçulmano). Segundo os consumidores muçulmanos, os principais problemas de autenticidade relacionados com produtos *Halal* prendem-se com a substituição de carnes *Halal* por carne de porco, a utilização de ingredientes proibidos, tais como plasma e tripa de porco, e a utilização de métodos de abate não-*Halal* [2].

Considerando que a população muçulmana mundial atingiu 1,8 bilhões em 2011, sendo expectável que continue a aumentar, existe uma grande procura global para este tipo de produtos [3]. Recentemente, foi estimado pelo *World Halal Forum Secretariat* que o comércio mundial de alimentos e bebidas *Halal* corresponde anualmente a aproximadamente 1,4 trilhões de dólares [3]. Adicionalmente, refira-se que de uma forma geral, os produtos *Halal* apesentam um preço superior comparativamente a produtos convencionais/não-

Halal similares [4]. Pelos motivos apresentados, os produtos cárneos *Halal* são muito propensos a sofrerem adulterações pela substituição e/ou mistura de espécies de não-*Halal* de menor custo económico. Assim, para salvaguardar o direito de escolha de cada consumidor, torna-se necessário desenvolver metodologias que permitam detetar especificamente espécies consideradas *Haram* (proibidas), tal como o porco, em carne e produtos cárneos processados.

Identificação da espécie porco (*Sus scrofa*)

Até à presente data, são várias as metodologias descritas na literatura para a determinação específica da espécie porco em carnes e produtos cárneos, incluindo técnicas espectroscópicas (espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR)) e técnicas baseadas na deteção de proteínas ou de ADN [5]. Os métodos baseados em proteínas, tais como eletroforese, cromatografia e técnicas imunológicas, apesar de serem adequados e de elevada sensibilidade na análise de carnes cruas, podem levar a resultados falsos negativos quando aplicados a produtos cárneos muito processados devido à desnaturação proteica inerente ao processamento [6]. Recentemente, os métodos baseados na análise de ADN, moléculas que existem em todos os tipos de células, têm sido considerados como os mais apropriados para a identificação de espécies em carnes processadas dada a maior resistência das moléculas de ADN, comparativamente às proteínas, quando submetidas a processos térmicos e/ou elevada pressão. Adicionalmente, a utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR) para análise de ADN é considerada uma técnica rápida, sensível e altamente específica para a identificação inequívoca de espécies em matrizes complexas. Entre as diferentes técnicas de PCR descritas na literatura para a identificação da espécie porco em produtos cárneos processados contendo diversos ingredientes, a utilização de PCR específica de espécies tem sido considerada como a metodologia melhor e mais robusta, uma vez que

não requer a utilização de enzimas de restrição, a interpretação de padrões complexos obtidos por electroforese em gel de agarose e/ou sequenciação dos produtos de PCR [2]. A técnica de PCR específica de espécies requer a utilização de *primers* desenhados cuidadosamente por forma a emparelharem especificamente com um fragmento de ADN da espécie alvo. A utilização de PCR em tempo real utilizando *primers* específicos de espécies e, adicionalmente, uma sonda fluorescente de ADN, apresenta diversas vantagens tais como uma maior sensibilidade e seletividade, permitindo ainda a realização de análises quantitativas. Não obstante, as sondas serem geralmente caras e aumentarem consideravelmente o custo da análise, a utilização de PCR em tempo real com corantes fluorescentes foi proposta em trabalhos anteriores como alternativa mais económica para a deteção de carne de porco em produtos cárneos processados [7].

Identificação de porco e/ou derivados em produtos cárneos *Halal*

No âmbito de um estudo realizado com a finalidade de avaliar a autenticidade de diferentes produtos cárneos processados, foram adquiridos 15 produtos *Halal* em lojas especializadas Portuguesas, os quais foram posteriormente avaliados para presença de ADN de porco [8]. Considerando que em Portugal existe um número reduzido de lojas de produtos *Halal*, o que poderá levar alguns muçulmanos a adquirir produtos em supermercados de cariz genérico, adicionalmente incluiu-se no estudo 26 produtos cárneos não-*Halal*, mas rotulados como sendo produtos contendo somente carne de aves.

Inicialmente foram preparadas misturas de referência binárias contendo diferentes percentagens de carne de porco (entre 25,0% e 0,0001%) em carne de vaca. Após homogeneização, as misturas foram divididas em duas partes semelhantes, tendo uma delas sido submetida a processamento térmico. Com base nestas misturas, procedeu-se à otimização de um ensaio de PCR específica para a espécie porco tendo por alvo o gene *cytb*, o qual foi posteriormente aplicado às amostras comerciais. Os resultados obtidos demonstraram que o método de PCR proposto apresentou uma especificidade e sensibilidade elevadas, evidenciadas pelos resultados negativos em testes de reatividade cruzada com outras espécies animais e vegetais, e pela deteção de carne de porco até ao nível de 0,0001% para carne crua e 0,001% para carne processada termicamente. Adicionalmente, os extratos de ADN obtidos das amostras comerciais foram

submetidos a análises de PCR em tempo real com o corante fluorescente EvaGreen seguido de análise de *melting*. Para fins de quantificação, foram construídas curvas de calibração com base nos resultados de PCR em tempo real obtidos para as amostras binárias, cruas e processadas termicamente. A Figura 1 apresenta as curvas de amplificação obtidas por PCR em tempo real para diferentes quantidades de ADN de porco, evidenciando a elevada sensibilidade do método proposto.

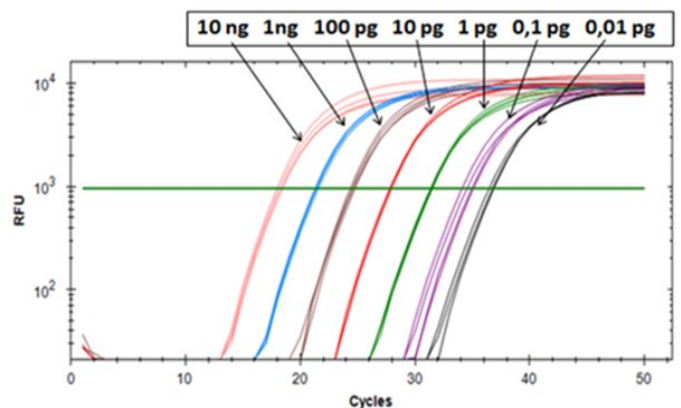


Figura 1. Curvas de amplificação por PCR em tempo real para diferentes quantidades de ADN de porco.

Foi detetado ADN de porco em 6 produtos *Halal* e em 16 produtos cárneos não-*Halal* à base de aves (Tabela 1). Contudo, apenas foi possível proceder à sua quantificação em 8 dessas amostras, uma vez que as restantes estavam abaixo do limite de quantificação. Os resultados da quantificação evidenciaram a presença de quantidades vestigiais de ADN de porco nas amostras de produtos *Halal* (valores estimados de 0,01% nas três amostras quantificáveis), o que sugere uma possível contaminação nas linhas de processamento em invés de uma adulteração intencional ou adição de pequena quantidade de gordura de porco. No entanto, uma vez que o consumo de porco é totalmente proibido para os muçulmanos, estes produtos deverão ser classificados como *Haram* (proibidos). As quantidades de ADN de porco nas amostras de produtos à base de carne de aves variaram entre 0,03% e 0,24%. Estes baixos valores sugerem igualmente uma contaminação em vez de uma substituição fraudulenta por adição de carne de porco, com vista a ganhos económicos. No entanto, refira-se que estes valores foram ligeiramente superiores aos verificados nos produtos *Halal* o que poderá indicar um controlo de qualidade mais efetivo no caso de indústrias que produzam produtos *Halal* destinado a consumidores muçulmanos.

Tabela 1. Resultados da detecção de ADN de porco em amostras de produtos *Halal* e produtos não-*Halal* à base de carne de aves.

Espécie	Resultados positivos/total de amostras (% rotulagem não-conforme)		
	Produtos cárneos <i>Halal</i>	Produtos cárneos não- <i>Halal</i>	Total
Porco	6/15 (40%)	16/26 (62%)	22/41 (54%)

Considerações finais

O crescente interesse e preocupação dos consumidores em relação à ocorrência de fraudes na indústria dos produtos cárneos tem sido uma força motriz para o desenvolvimento de novas metodologias analíticas que permitam garantir o cumprimento da legislação, proporcionando assim uma maior transparência no sector. Na última década, tem sido dada particular atenção ao desenvolvimento de metodologias analíticas para a identificação de espécies animais em produtos cárneos, com ênfase na detecção de carne de porco e seus derivados em produtos cárneos processados, sendo esta uma matéria de especial relevância para os consumidores muçulmanos uma vez que o consumo de porco é estritamente proibido. Desta forma, são necessárias técnicas rápidas, confiáveis e sensíveis que permitam confirmar a ausência total da espécie porco em produtos comercializados como sendo *Halal*, por forma a garantir os direitos da comunidade muçulmana e simultaneamente promover o comércio justo. Devido à sua elevada sensibilidade e especificidade, a técnica de PCR em tempo real tem mostrado ser uma ferramenta adequada para a referida finalidade.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) através do projeto PEst-C/EQB/LA0006/2013.

Referências

- [1] Aida, A. A., Man, Y. B. C., Wong, C. M. V. L., Raha, A. R., & Son, R. (2005). Analysis of raw meats and fats of pigs using polymerase chain reaction for Halal authentication. *Meat Science*, 69: 47-52.
- [2] Nakyinsige, K., Man, Y.B.C, & Sazili, A.Q. (2012). Halal authenticity issues in meat and meat products. *Meat Science*, 91: 207-214.
- [3] Farouk, M.M. (2013). Advances in the industrial production of halal and kosher red meat. *Meat Science*, 95: 805-820.
- [4] Ali, E., Razzak, A., Hamid, S.B.A., Rahman, M., Amin, A., Rashid, N.R.A., & Asing (2015). Multiplex PCR assay for the detection of five meat species forbidden in Islamic foods. *Food Chemistry*, 177: 214-224.
- [5] Ali, M. E., Kashif, M., Uddin, K., Hashim, U., Mustafa, S., & Man, Y. B. C. (2012). Species authentication methods in foods and feeds: the present, past, and future of Halal forensics. *Food Analytical Methods*, 5: 935-955.
- [6] Rodríguez, M. A., García, T., Gonzalez, I., Hernandez, P. E., & Martín, R. (2005). TaqMan real-time PCR for the detection and quantification of pork in meat mixtures. *Meat Science*, 70: 113-120.
- [7] Soares, S., Amaral, J. S., Oliveira, M.B.P.P., & Mafra, I. (2013). A SYBR Green real-time PCR assay to detect and quantify pork meat in processed poultry meat products. *Meat Science*, 94: 115-120.
- [8] Santos, G. S. (2013). Desenvolvimento de metodologias de biologia molecular para a autenticação de produtos cárneos com designação *Halal*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto.

Avaliação da autenticidade de Alheiras de caça por identificação específica de espécies

Joana S. Amaral^{1,2,*}, Isabel Mafra¹, M. Beatriz P. P. Oliveira¹

¹REQUIMTE, Departamento de Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Portugal. ²ESTiG, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal. (*E-mail: jamaral@ipb.pt)

Introdução

A produção de diferentes enchidos tradicionais é uma prática enraizada em várias regiões do país, em particular no Nordeste Transmontano onde é produzido um produto muito apreciados por diversos consumidores, nomeadamente a alheira. A alheira é um produto cárneo tradicional, fumado e fermentado, cuja origem remonta ao final do século XV e se relaciona com a presença de comunidades Judaicas nesta região. Naquela data, sendo frequente o consumo de enchidos pela população Cristã e sendo o porco uma espécie não consumida pelos Judeus, para evitar serem facilmente identificados pela Inquisição pelos seus diferentes hábitos alimentares, estes começaram a produzir um enchido com forma similar à da cozinha Cristã, mas usando carne de aves em vez de porco. A receita foi, eventualmente, passando através de gerações e tornou-se popular também entre os Cristãos, sendo atualmente produzida com base numa mistura de carne e gordura de porco, carne de aves, pão de trigo, azeite, alho, sal e especiarias [1]. Dado o seu sucesso, nos últimos anos, têm surgido novas versões deste tipo de enchido, entra as quais se destacam as alheiras de caça. Estas distinguem-se das suas congéneres tradicionais pelo facto de incluírem na sua composição carne de caça, a qual pode ser adicionada total ou parcialmente em relação à carne utilizada na sua confeção. Entre a caça frequentemente utilizada refira-se a carne de javali, veado, lebre, perdiz, entre outras. Sendo o preço da carne de caça, de uma forma geral, significativamente superior ao da carne de porco e de aves, estas alheiras são conseqüentemente vendidas a um preço superior. Por outro lado, nos últimos anos, tem-se assistido a um consumo crescente de carne de caça e respetivos produtos uma vez que esta é percebida pelo consumidor como sendo mais saudável e com características organolépticas agradáveis. Desta forma, e considerando tratar-se de um produto cárneo processado, no qual se torna difícil diferenciar visualmente o tipo de carne utilizada na sua produção, a alheira de caça apresenta uma elevada suscetibilidade de sofrer adulteração pela substituição de carnes de caça por outras de menor valor económico. Por forma a assegurar que o consumidor não seja defraudado com a compra de produtos adulterados que não correspondem às

suas expectativas, bem como evitar a competição desleal entre produtores, é importante o desenvolvimento de metodologias eficientes que permitam a identificação inequívoca de espécies animais utilizadas na produção de produtos cárneos processados.

Identificação de espécies animais em produtos cárneos processados

A identificação de espécies pode ser realizada por diferentes metodologias, sendo a análise de proteínas e a análise de ADN as mais frequentemente referidas na bibliografia [2]. Os métodos baseados na análise de proteínas, apesar de serem geralmente muito sensíveis, apresentam limitações quando aplicados em alimentos processados devido à inerente desnaturação proteica [3]. Pelo contrário, as moléculas de ADN, ubíquas em todo o tipo de células, apresentam uma estabilidade superior ao processamento, comparativamente com as proteínas, pelo que têm sido frequentemente utilizadas para a identificação de espécies em alimentos processados [4]. Entre os métodos baseados na análise de ADN, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é a técnica molecular mais utilizada devido sobretudo à sua simplicidade, rapidez, elevada especificidade e sensibilidade [2]. Até à presente data, são várias as metodologias propostas na literatura para a autenticação de carnes de caça, incluindo metodologias baseadas em PCR convencional com *primers* específicos de espécies, PCR em tempo real, análise de ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (PCR-RAPD), análise de polimorfismos no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP-PCR), PCR-sequenciação e *DNA barcoding* [5]. Contudo, nem todas são igualmente adequadas quando aplicadas na deteção de espécies animais em matrizes complexas, contendo vários ingredientes, tais como as alheiras de caça.

De entre as técnicas referidas, a PCR convencional com *primers* específicos de espécies e a PCR em tempo real são indubitavelmente as mais referenciadas em trabalhos de autenticação de produtos cárneos processados. No caso da primeira, um aspeto principal consiste no desenho de *primers* que reconheçam fragmentos específicos como marca-

dores de ADN, permitindo desta forma a identificação específica da espécie-alvo, mesmo em matrizes complexas, contendo uma mistura heterogénea de sequências de ADN genómico [2, 5]. Os genes utilizados para esta finalidade podem ser nucleares ou mitocondriais, sendo contudo mais frequente a utilização dos últimos pela sua maior abundância comparativamente aos genes nucleares, o que permite melhoramentos a nível da sensibilidade. Os genes mitocondriais mais utilizados para a deteção específica de espécies de caça são os que codificam o citocromo b (*cytb*) [6], ARN ribossomal 12S (12S rRNA) e 16S [7,8] e a região D-loop [9]. Comparativamente com a PCR convencional, a utilização de PCR em tempo real apresenta diversas vantagens, em particular o facto de permitir realizar análises quantitativas uma vez que a amplificação do fragmento-alvo é monitorizada no final de cada ciclo de amplificação. Para tal, utilizam-se corantes fluorescentes, tais como SYBR Green ou EvaGreen [6,7], ou sondas fluorescentes tais como as sondas de hidrólise, também conhecidas como TaqMan [10].

Apesar da grande utilidade que os métodos baseados na análise de ADN apresentam para a deteção específica de espécies em produtos cárneos processados, a maioria dos trabalhos descritos na bibliografia incide sobretudo no desenvolvimento de metodologias, sendo poucos os estudos que reportam a sua aplicação. Contudo, estes últimos têm demonstrado que, apesar de alguns produtos se apresenta-

rem conforme a rotulagem [7, 9], a maioria apresenta discrepâncias, nomeadamente diversos produtos incluindo salsichas, patés, hambúrgueres, adquiridos em diferentes países (África do Sul, Áustria, Espanha e Portugal), realçando um elevado nível de não-conformidades com a rotulagem [10-14].

Identificação de espécies animais em Alheiras de caça

No âmbito da realização de estudos com vista à avaliação da autenticidade de alheiras de caça mediante a verificação da presença de espécies na sua composição, foram analisadas um total de 18 amostras adquiridas em lojas comerciais. A verificação da conformidade da rotulagem com a composição das amostras no que respeita a utilização de espécies animais na sua confeção, foi realizada mediante a utilização de diferentes métodos de PCR com *primers* específicos de espécies, os quais foram desenvolvidos e/ou otimizados para esta finalidade [6, 13, 14]. Os métodos permitiram a deteção de espécies de caça (lebre, coelho, veado, perdiz, faisão, codorniz, pato), bem como espécies de valor inferior, as quais são suscetíveis de serem utilizadas como substitutas da carne de caça (vaca, galinha e peru). Para tal, utilizaram-se *primers* específicos com alvo em genes mitocondriais (*cytb* ou rARN 12S), alguns previamente disponíveis na literatura, enquanto outros foram especificamente desenhados no âmbito deste trabalho (Tabela 1).

Tabela 1. *Primers* utilizados na deteção específica de espécies animais em Alheiras de caça.

Espécie	Primer	gene	Sequência (5'→3')	Ampliação (pb)	Referência
Codorniz (<i>Coturnix coturnix</i>)	12SCOT-F	rARN 12S	GAT TTA GCA GTA AAA TGG GAT CAC TTT	129	[8]
	12SCOT-R		TCG TCT TTG GCT TAA TGG TTG G		
Coelho (<i>Oryctogalus cuniculus</i>)	12SpRab-F	rARN 12S	CAA AAG TAA GCT CAA TTA CCA CCG TA	110	[15]
	12SpRab-R		ATA AGG GCT TTC GTA TAT TCG GAA		
Faisão (<i>Phasianus colchicus</i>)	12SPHA-F	rARN 12S	AGT GGT CAT ATG TTA TCC TCA CC	113	[8]
	12SPHA-R		GGG GTA AAA TTA GTC GTG GAG		
Galinha (<i>Gallus gallus</i>)	Chk-F	<i>cytb</i>	TCG CCC TCA CAA TCC TTA CAA CGA	118	[14]
	Chk-R		CTG GGA GGT CGA TTA GGG AGT TG		
Lebre (<i>Lepus spp.</i>)	Lep-F	<i>cytb</i>	ATA CAT GTA GGC CGT GGA ATC TAC	127	[6]
	Lep-R		TTT GTC CTC ATG GGA GGA CGT A		
Pato (<i>Anas platyrhynchos</i>)	Duk-F	<i>cytb</i>	CTC CGT CCT AAT CCT ATT CCT GG	111	[14]
	Duk-R		GAG GAG GTT GGC CAC TAG TGT		
Perdiz (<i>Alectoris spp.</i>)	12SALEC-F	rARN 12S	CGA CCT AAA AAC CAT CTT AGT TCC CA	141	[8]
	12SALEC-R		CGT AGT TCT CGG GCG GAT ATA TTG		
Peru (<i>Meleagris gallopavo</i>)	Tuk-F	<i>cytb</i>	CCC TTC GTA ATC GCA GGA ATT AC	109	[14]
	Tuk-R		GGT GGA ATG GGA TTT TGT CAG C		
Vaca (<i>Bos taurus</i>)	Bos-F	<i>cytb</i>	CTG CCG AGA CGT GAA CTA CG	99	[13]
	Bos-R		AAG CCT CGT CCT ACG TGC ATA		
Veados (<i>Cervus elaphus</i>)	12SCEQ-F	rARN 12S	CAA AAA CAT ATA ACG AAA GTA ACT TTC CGA CC	134	[7]
	12SCEQ-R		AGT ACT CTG GCG AAT AGT TTT GTC TGC A		
Eucariotas	18SEU-F	rARN 18S	TCT GCC CTA TCA ACT TTC GAT GG	140	[7]
	18SEU-R		TAA TTT GCG CGC CTG CTG		

Os resultados demonstraram uma elevada sensibilidade e especificidade na deteção da generalidade das espécies avaliadas, nomeadamente a deteção de vaca, galinha, faisão, perdiz, pato, coelho e lebre em misturas de carne de porco até 0,01% e de veado e peru até 0,1 [13, 14]. As metodologias propostas foram aplicadas às amostras de alheiras de caça comerciais, tendo sido detetadas várias inconsistências com a rotulagem, incluindo a ausência de espécies de caça em algumas amostras (faisão, perdiz, pato, veado, lebre e coelho) e a presença de espécies não declaradas (vaca, galinha e peru). Do total de amostras analisadas, cinco foram adquiridas como sendo alheiras de caça, sem especificação das espécies incluídas na sua composição. Considerando apenas as espécies de caça analisadas, destas cinco amostras apenas uma revelou conter caça. A Tabela 2 apresenta uma análise global, relativamente à conformidade da rotulagem das amostras avaliadas.

Tabela 2. Resultados globais relativos à identificação de espécies animais em Alheiras de caça reportados em trabalhos prévios [13, 14] (adaptado de [14]).

Ingredientes declarados no rótulo	Nº amostras rotuladas	Nº resultados positivos (PCR)
Coelho	9	2
Lebre	1	0
Veado	7	6
Vaca	1	12
Porco	14	18
Pato	8	5
Perdiz	5	1
Faisão	2	0
Codomiz	0	0
Aves de capoeira	7	15
Caça	5	1

Considerações finais

Os produtos cárneos processados são um alvo suscetível de fraudes, uma vez que a substituição de carnes de maior valor comercial por outras mais económicas é difícil de detetar visualmente. No que respeita a avaliação realizada em amostras de alheiras de caça, os resultados indicam a ocorrência de inconsistências com a rotulagem, geralmente devido à ausência de espécies de caça ou à inclusão de espécies não declaradas (vaca, galinha e peru), o que evidencia a necessidade de programas de inspeção e controlo que permitam evitar a concorrência desleal por parte de alguns produtores e, conseqüentemente, a valorização deste tipo de produtos tradicionais.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da Universidade do Porto/ Santander Totta “Projetos pluridisciplinares 2010” e à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) através do projeto PEst-C/EQB/LA0006/2013.

Referências

- [1] Ferreira, V., Barbosa, J., Vendeiro, S., Mota, A., Silva, F., & Monteiro, M. (2006). Chemical and microbiological characterization of alheira: a typical Portuguese fermented sausages with particular reference to factors relating to food safety. *Meat Science*, 73: 570–575.
- [2] Mafra, I., Ferreira, I.M.P.L.V.O., & Oliveira, M.B.P.P. (2008). Food authentication by PCR-based methods. *European Food Research and Technology*, 227: 649–665.
- [3] Rojas, M., González, I., Pavón, M.A. Pegels, N., Lago, A., Hernández, P. E., García, T., & Martín, R. (2010). Novel TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for verifying the authenticity of meat and commercial meat products from game birds. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 27: 749–763.
- [4] Soares, S., Amaral, J. S., Oliveira, M.B.P.P., & Mafra, I. (2013). A SYBR Green real-time PCR assay to detect and quantify pork meat in processed poultry meat products. *Meat Science*, 94: 115–120
- [5] Fajardo, V., González, I., Martín, I., Rojas, M., García, T., & Martín, R. (2010). A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species. *Trends in Food Science and Technology* 21, 408–421.
- [6] Santos, C.G., Melo, V.S., Amaral, J.S., Estevinho, L., Oliveira, M.B.P.P., & Mafra, I. (2012). Identification of hare meat by a species-specific marker of mitochondrial origin. *Meat Science*, 90: 836–841.
- [7] Fajardo, V., González, I., Martín, I., Rojas, M., Hernández, P., García, T., & Martín, R. (2008). Real-time PCR for detection and quantification of red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) in meat mixtures. *Meat Science*, 79: 289–298.
- [8] Rojas, M., González, I., Fajardo, V., Martín, I., Hernández, P. E., García, T., & Martín, R. (2009). Authentication of meats from quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*), partridge (*Alectoris spp.*), and guinea fowl (*Numida meleagris*) using polymerase chain reaction targeting specific sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene. *Food Control*, 20: 896–902.
- [9] Rojas, M., González, I., Fajardo, V., et al. (2009). Identification of raw and heat-processed meats from game bird species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of the mitochondrial D-loop region. *Poultry Science*, 88: 669–679.
- [10] Druml, B., Grandits, S., Mayer, W., Hoegger, R., & Cichna-Markl, M. (2015). Authenticity control of game meat products – A single method to detect and quantify adulteration of fallow deer (*Dama dama*), red deer (*Cervus elaphus*) and sika deer (*Cervus nippon*) by real-time PCR. *Food Chemistry*, 170: 508–517.
- [11] D’Amato, M.E., Alechine, E., Cloete, K.W., Davison, S., & Corach, D. (2013). Where is the game? Wild meat products authentication in South Africa: a case study. *Investigative Genetics*, 4: 6.
- [12] Cawthorn, D-M., Steinman, H.A., & Hoffman, L.C. (2013). A high incidence of species substitution and mislabelling detected in meat products sold in South Africa. *Food Control*, 32: 440–449.
- [13] Amaral, J.S., Santos, C.G., Melo, V.S., Oliveira, M.B.P.P., & Mafra, I. (2014). Authentication of a traditional game meat sausage (Alheira) by species-specific PCR assays to detect hare, rabbit, red deer, pork and cow meats. *Food Research International*, 60: 140–145.
- [14] Amaral, J.S., Santos, C.G., Melo, V.S., Estevinho, L., Oliveira, M.B.P.P., & Mafra, I. (2015). Identification of duck, partridge, pheasant, quail, chicken and turkey meats by species-specific PCR assays to assess the authenticity of traditional game meat Alheira sausages. *Food Control*, 47: 190–195.
- [15] Martín, I., García, T., Fajardo, V., Rojas, M., Pegels, N., Hernández, P. E., González, I., & Martín, R. (2009). Polymerase chain reaction detection of rabbit DNA in food and animal feed. *World Rabbit Science*, 17: 27–34.

Riscos e benefícios associados ao consumo de carne de caça

Joana S. Amaral^{1,2,*}, Isabel Mafra¹, M. Beatriz P. P. Oliveira¹

¹REQUIMTE, Departamento de Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Portugal. ²ESTIG, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal. (*E-mail: jamaral@ipb.pt)

Introdução

A caça de animais é praticada pelo homem desde tempos ancestrais, tendo sido uma das principais fontes de nutrientes/alimentos na era pré-histórica. Com o progredir da civilização, e principalmente após o desenvolvimento da agricultura e a domesticação de animais, a importância da carne de caça como meio de subsistência diminuiu substancialmente em várias regiões do globo. Contudo, atualmente continua ainda a ser de grande relevância em diversos países, principalmente nos chamados países subdesenvolvidos e em vias de desenvolvimento, sobretudo Africanos, mas também Asiáticos, nos quais a carne de animais selvagens é frequentemente consumida e também alvo de trocas económicas [1].

Para além de ser uma fonte de alimentos, adicionalmente a caça pode ser praticada com finalidades desportivas ou lúdicas. Independentemente do propósito principal, de uma forma geral, a caça é praticada em todo o mundo, sendo que o tipo de animal alvo varia segundo a região, a diversidade de animais, o sabor apreciado localmente, a tradição e conforme a perceção local do que pode ou não ser legitimamente caçado [2]. Assim, na Europa é frequente a caça de veado (*Cervus elaphus*), corço (*Capreolus capreolus*), gamo (*Dama dama*), javali (*Sus scrofa*) e aves diversas, ao passo que em África as espécies alvo de caça são maioritariamente ungulados africanos, tais como a gazela cabra-de-leque (*Antidorcas marsupialis*) e o kudu (*Tragelaphus strepsiceros*) entre outros antílopes [3].

De uma forma geral, entende-se “caça” como sendo animais selvagens [4], apesar do termo “caça” ou “carne de caça” ser mais frequentemente utilizado com propósito gastronómico para designar todas as aves e animais caçados como alimento [5]. Segundo a legislação Europeia, caça selvagem define-se como sendo “ungulados, lagomorfos ou outros mamíferos terrestres caçados para consumo humano, considerados como caça selvagem ao abrigo da lei aplicável no Estado Membro em causa, incluindo os mamíferos que vivem em áreas vedadas em condições de liberdade semelhantes às da caça selvagem, e aves selvagens caçadas para

consumo humano” [6]. Várias espécies originalmente consideradas como sendo selvagens, atualmente são também alvo de criação, para além de continuarem a poder ser caçadas livres na natureza. Nos Estados Unidos da América (EUA), espécies como o alce americano, javali, veado, faisão e alguns antílopes (*Antilope cervicapra* e *Boselaphus tragocamelus*) estão a ser criados em cativeiro [4], enquanto na Europa, em particular nos países nórdicos, a caça de criação mais comum são cervídeos, tais como veado, gamo e rena (*Rangifer tarandus*) [7]. A criação de cervídeos, principalmente veado, é também uma indústria de relevo na Nova Zelândia, existindo cerca de 1,1 milhões destes animais em diversas quintas, os quais se destinam principalmente a exportação para países europeus [8].

Apesar dos dados sobre produção e consumo de carne de caça serem escassos [7], de acordo com a Divisão de Estatísticas da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAOSTAT), a produção de carne de caça tem vindo a aumentar na última década, nomeadamente de cerca de 1,59 milhões de toneladas em 2000 para 1,99 milhões de toneladas em 2012 [9]. Este aumento produtivo pode eventualmente estar relacionado com um aumento de consumo de carne de caça. Efetivamente, de uma forma geral, nos últimos anos têm-se assistido a uma procura crescente deste tipo de alimento por parte dos consumidores, o que pode ser dever-se a diferentes fatores, entre os quais a associação da carne de caça a produtos *gourmet* e diferenciados, a perceção crescente de tratar-se de um produto mais saudável comparativamente com outro tipo de carnes, a associação da caça a um produto biológico (uma vez que não são usados quaisquer antibióticos, esteroides ou outros fármacos no tratamento de animais selvagens) e a procura por novas experiências gastronómicas [10, 11].

Apesar da carne de caça apresentar geralmente uma composição benéfica, o seu consumo pode contudo ter alguns riscos. Seguidamente apresenta-se de forma resumida os benefícios e riscos mais relevantes associados ao consumo de carne de caça.

Composição nutricional

A carne de caça, na sua generalidade, pode ser considerada como um alimento nutritivo, sendo uma fonte relevante de proteínas (com teores geralmente superiores a 20%), minerais e vitaminas. Pelo contrário, o teor lipídico é geralmente baixo, variando entre 0,3 g e 4,6 g por 100 g de músculo, conforme a espécie [12].

Atualmente considera-se que o consumo elevado de lípidos se relaciona indubitavelmente com riscos para a saúde, contudo dever-se-á ter em conta não apenas a quantidade, mas também o tipo de ácidos gordos (AG) consumidos. Considerando que AG saturados tais como os ácidos láurico, mirístico e palmítico estão associados ao aumento do colesterol-LDL, o seu consumo deve ser evitado e se possível substituído por AG mono- ou polinsaturados os quais têm sido associados a benefícios para a saúde.

Atendendo a que os animais de caça se referem a espécies tão variadas, incluindo ungulados (*e.g.* antílopes africanos e cervídeos), lagomorfos e aves selvagens, será expectável a existência de uma grande variabilidade igualmente no que respeita a composição em AG da sua carne. Apesar de variável, de uma forma geral, a carne de caça apresenta um perfil em AG favorável, nomeadamente devido a um nível relativamente baixo em AG saturados em algumas espécies, tais como o duiker comum (*Sylvacapra grimmia*) e a codorniz (*Coturnix coturnix*) [13, 14], e a um nível elevado de AG polinsaturados, o qual que se verifica em diversas espécies. Adicionalmente, a carne de caça, à exceção da maioria das aves selvagens e javali, apresenta frequentemente níveis elevados de AG polinsaturados ω -3, conduzindo a um rácio ω -6: ω -3 inferior a 4:1, o qual tem sido associado a benefícios para a saúde.

Riscos microbiológicos

As condições microbiológicas das carcaças de animais de caça podem variar muito, dependendo logo à partida no facto de os animais serem desmanchados em matadouros ou pelos caçadores, bem como de outros fatores que influenciam a contaminação e crescimento bacterianos, tais como a saúde do animal, o tipo de microrganismos existentes na pele e vísceras do animal, condições de evisceração no campo e prática do caçador, tempo decorrido até à conservação da carcaça, condições higiénicas gerais do transporte, armazenamento e processamento, entre outras [15, 16].

Outro fator importante, relaciona-se com a experiência e precisão do caçador, dado que a localização anatômica do tiro é extremamente importante do ponto de vista higiénico, uma vez que animais abatidos com disparos que atinjam a zona abdominal apresentam frequentemente danos nas vísceras e consequentemente, contaminação bacteriana da carcaça.

Ao avaliar o estado de higiene de 289 amostras de caça recém-abatida na Alemanha, Atanassova e colaboradores [17] relataram uma associação entre a experiência do caçador e a ocorrência de Enterobacteriaceae, com prevalência consideravelmente superior no último dos caçadores inexperientes. Resultados similares têm sido reportados por outros autores, associando a contaminação visível com terra ou fezes, a cargas microbianas elevadas na carcaça, o que demonstra a importância da experiência e habilidade do caçador nestes casos.

Do ponto de vista microbiológico, nomeadamente no que respeita zoonoses transmitidas por alimentos, deve ainda considerar-se a possibilidade de ocorrência de casos de infeção de humanos associados ao consumo de caça [7]. Os riscos biológicos mais relevantes, incluindo parasitas, bactérias e vírus (tais como *Salmonella* spp., *Trichinella*, *Toxoplasma gondii*, entre outros) variam entre diferentes países de acordo com a epidemiologia e hábitos de consumo alimentar de cada região. Recentemente, no que respeita a inspeção de carnes de caça de criação, segundo o parecer do Painel de Riscos Biológicos da Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) e a sua avaliação do risco, *Salmonella* spp. em javalis de criação e *T. gondii* em cervos e javalis de criação foram considerados como perigos de elevada relevância, enquanto *Trichinella* spp. em javali foi considerado um perigo de baixa prioridade devido aos controlos atuais, os quais devem ser continuados [7]. No que respeita *Trichinella* spp., uma zoonose parasitária causada por nemátodes, refira-se contudo que têm sido descritos casos de infeção em diferentes países associados principalmente ao consumo de carne de javali [15].

Exposição ao chumbo

A maioria dos animais de caça, principalmente caça maior, são mortos a tiro sendo frequentemente utilizadas munições contendo chumbo. O chumbo é um metal não-essencial e tóxico que afeta negativamente diversos siste-

mas no corpo humano, sendo observáveis efeitos mesmo para níveis muito baixos de chumbo no sangue (PbS), tais como défices neuro-cognitivos e de desenvolvimento neurológico observados sobretudo em crianças, e elevada pressão arterial sistólica e doença renal crónica em adultos. Uma vez que a carne de caça é obtida de animais mortos com munições de chumbo, a qual pode ficar contaminada com este metal, o consumo de caça pode representar um risco para a saúde humana. Apesar de alguns autores defenderem que a exposição ao chumbo por esta via é baixa, atendendo ao facto de que o projétil é removido, bem como a carne à volta do canal de entrada do projétil (sendo que em alguns casos pode inclusivamente atravessar o animal e não ficar na carcaça), estudos recentes com base em radiografias têm demonstrado a presença de pequenos fragmentos de projétil, consideravelmente afastados e dispersos, principalmente no caso de impacte da bala com os ossos do animal [18]. Desta forma, vários autores têm sugerido que o consumo elevado de caça, por exemplo em famílias de caçadores de subsistência, pode constituir um perigo potencial devido à exposição ao chumbo. De facto, alguns estudos levados a cabo em famílias de caçadores têm demonstrado a associação entre consumo frequente de caça e níveis elevados de chumbo no sangue [19]. Segundo a opinião recente emitida pelo painel da EFSA, considerando os níveis comuns de exposição, em geral o risco de efeitos clínicos importantes em consumidores Europeus adultos, quer a nível do sistema cardiovascular quer renal, é baixo a negligenciável, existindo contudo alguma apreensão relativamente a efeitos sobre o desenvolvimento neurológico no caso de crianças e grávidas [20].

Considerações finais

Nos últimos anos tem-se assistido a um consumo crescente de carne de caça, associado a diferentes motivações. Entre estas, o facto de os consumidores procurarem cada vez mais alimentos tidos como sendo saudáveis e/ou biológicos e estarem recetivos a novas experiências gastronómicas. De uma forma geral, considerando a grande abrangência de espécies consideradas como caça, este tipo de carne apresenta um perfil nutricional benéfico para a saúde, principalmente quando comparado com outros tipos de carne. Contudo, alguns riscos podem também estar associados ao seu consumo, nomeadamente riscos microbiológicos devido a

contaminações das carcaças e a zoonoses e o risco de exposição ao chumbo proveniente das munições. No caso de se tratar de caça para consumo pessoal, dever-se-á dar particular atenção aos riscos microbiológicos. Neste caso é ainda relevante ter em consideração a experiência do caçador, acrescentando-se o facto de que o caçador/preparador da carne deverá remover todos os fragmentos visíveis de munições, bem como a carne que lhe esteja próxima e ao longo do canal da ferida de entrada do projétil, na tentativa de minimizar tanto quanto possível a exposição ao chumbo aquando do consumo de caça.

Referências

- [1] Convention on Biological Diversity (CBD). (2011). Livelihood alternatives for the unsustainable use of bushmeat. Report prepared for the CBD Bushmeat Liaison Group. Technical Series No. 60. SCBD, Montreal, Canada.
- [2] Hofbauer, P., & Smulders, F.J.M. (2011). The muscle biological background of meat quality including that of game species. In *Game meat hygiene in focus*, Eds. P. Paulsen, A. Bauer, M. Vodnansky, R. Winkelmayr, F. J. M. Smulders, pp.273-296. Wageningen Academic Publishers: The Netherlands.
- [3] Hoffman, L. C., & Cawthorn, D. -M. (2012). What is the role and contribution of meat from wildlife in providing high quality protein for consumption? *Animal Frontiers*, 2: 40-53.
- [4] USDA, Food Safety and Inspection Service (2015). Game from Farm to Table. Food Safety information. (<http://www.fsis.usda.gov/>, acedido em Março 2015).
- [5] Cobos, A., Hoz, L., Cambero, M. I., & Ordoñez, J. A. (1995). Chemical and fatty acid composition of meat from spanish wild rabbits and hares. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 200: 182-185.
- [6] Commission Regulation (EC) No. 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules on the hygiene of foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L 139/55.
- [7] EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2013). Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat from farmed game, *EFSA Journal*, 11(6): 3264.
- [8] Wiklund, E., Farouk, M., & Finstad, G. (2014). Venison: Meat from red deer (*Cervus elaphus*) and reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). *Animal Frontiers*, 4: 55-61.
- [9] FAOSTAT (2014). (<http://faostat.fao.org/site/569/default.aspx#ancor>, accessed in October 2014).
- [10] Fajardo, V., González, I., Martín, I., et al. (2010). A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats

from game animal species. *Trends in Food Science and Technology* 21: 408–421.

[11] Hoffman, L. C., Wiklund, E. (2006). Game and venison — Meat for the modern consumer. *Meat Science* 74, 197–208.

[12] Hoffman, L. C., & Cawthorn, D. (2013). Exotic protein sources to meet all needs. *Meat Science*, 95: 764 – 771.

[13] Hoffman, L.C., & Ferreira, A.V. (2004). Chemical composition of two muscles of the common duiker (*Sylvicapra grimmia*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84: 1541–1544.

[14] Sartowska, K. E., Korwin-Kossakowska, A., Polawska, E., Lipinska, P., & Sender, G. (2014). Sex-related differences in the nutritional value of Japanese quail Meat. *International Journal of Food Science and Technology*, 49: 2635–2642.

[15] Gill, C.O. (2007). Microbiological conditions of meats from large game animals and birds. *Meat Science* 77: 149–160.

[16] Paulsen, P., Smulders, F.J.M., & Hilbert, F. (2012). Salmonella in meat from hunted game: A Central European perspective. *Food Research International*, 45: 609–616.

[17] Atanassova, V., Apelt, J., Reich, F., & Klein, G. (2008). Microbiological quality of freshly shot game in Germany. *Meat Science*, 78: 414–419.

[18] Pain, D.J., Cromie, R.L., Newth, J., Brown, M.J., Crutcher, E., Hardman, P., Hurst, L., Mateo, R., Meharg, A.A., Moran, A.C., Raab, A., Taggart, M.A., & Green, R.E. (2010). Potential hazard to human health from exposure to fragments of lead bullets and shot in the tissues of game animals. *PLoS ONE*, 5:e10315.

[19] Iqbal, S., Blumenthal, W., Kennedy, C., Yip, F.Y., Pickard, S., Flanders, W.D., Loring, K., Kruger, K., Caldwell, K.L., & Jean Brown, M. (2009). Hunting with lead: association between blood lead levels and wild game consumption. *Environmental Research*, 109:952–959.

[20] European Food Safety Authority Panel on Contaminants in the Food Chain (EFSA CONTAM) (2010). Scientific Opinion on Lead in Food. *EFSA Journal*, 8:1570.

Aditivos alimentares em produtos à base de carne

Graça Mariano¹, Miguel Monteiro²

¹ Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, Departamento de Riscos Alimentares e Laboratórios

² Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

Introdução

Esta revista dedica-se aos riscos associados aos produtos à base de carne, pelo que e sabendo-se do consumo deste tipo de produtos e da sua distribuição no mercado global, valerá a pena realçar o uso dos aditivos alimentares, entre outras funções tecnológicas, como meio de prolongar a durabilidade dos preparados de carne e produtos à base de carne permitindo deste modo a sua comercialização mundial.

A carne é o produto mais valioso que se retira da pecuária. A sua constituição, rica em proteínas de alta qualidade e aminoácidos essenciais, minerais e vitaminas de elevada biodisponibilidade, gorduras e ácidos gordos, assim como em componentes bioativos e pequenas quantidades de hidratos de carbono, faz da carne um género alimentício de elevado valor nutricional^{1,2}.

Consoante a carne seja ou não processada e o tipo de processamento (que pode ser físico, químico ou bioquímico)³, existem 5 classes distintas previstas no Regulamento (CE) n.º 853/2004 que importa diferenciar, nomeadamente: **carne fresca** - carne não submetida a qualquer processo de preservação que não a refrigeração, a congelação ou a ultracongelação, incluindo carne embalada em vácuo ou em atmosfera controlada; **carne picada** - carne desossada que foi picada e que contém menos de 1% de sal; **carne separada mecanicamente ou "CSM"** - produto obtido pela remoção da carne dos ossos carnudos depois da desmancha ou de carcaças de aves de capoeira, utilizando meios mecânicos que provoquem a perda ou a alteração da estrutura das fibras musculares; **preparados de carne** - carne fresca, incluindo carne que tenha sido reduzida a fragmentos, a que foram adicionados outros géneros alimentícios, condimentos ou aditivos ou que foi submetida a um processamento insuficiente para alterar a estrutura das suas fibras musculares e eliminar assim as características de carne fresca; **produtos à base de carne** - produtos transformados, resultantes da transformação da carne ou da ulterior transformação desses produtos transformados, de tal modo que a superfí-

cie de corte à vista permita constatar o desaparecimento das características da carne fresca.

Enquadramento histórico dos aditivos alimentares

A prática de adição de determinados químicos e substâncias naturais com propriedades tecnológicas nos alimentos, como o sal, remonta a centenas de anos atrás, ainda que os padrões de utilização tenham mudado significativamente ao longo do tempo.

Atualmente o recurso a aditivos alimentares tem tido especial destaque uma vez que permite a centralização do processamento e a distribuição alimentar mundial. O desenvolvimento da Química e da Bioquímica tem possibilitado novas e mais eficientes técnicas de produção de alimentos com base no conhecimento científico sobre a composição e propriedades dos alimentos⁴.

Assim nos meados do século XX reconheceu-se a necessidade de legislação e regulamentação específica dos aditivos alimentares, pelo que os problemas que existiam até então começaram a ser resolvidos com maior determinação.⁴

De uma forma geral, o setor alimentar está assente em dois pilares basilares. O primeiro é relativo ao conceito de "food security" (que tendencialmente se dá como adquirido nos países desenvolvidos), e que consiste na garantia da disponibilidade e acessibilidade de géneros alimentícios em quantidade e com valor nutritivo suficientes para suprir as necessidades diárias da população⁵; o segundo pilar é o conceito de "food safety", vertente sobre a qual incidem maiores preocupações e relativamente à qual há uma obrigatoriedade de controlo por parte das autoridades oficiais, na medida em que os alimentos podem comportar riscos microbiológicos e/ou químicos.

A par destes riscos existe ainda outra preocupação, relativamente à possibilidade de se usarem os aditivos de forma inadequada ou dos mesmos não estarem devidamente identificados na rotulagem dos alimentos, induzindo assim em erro os consumidores.

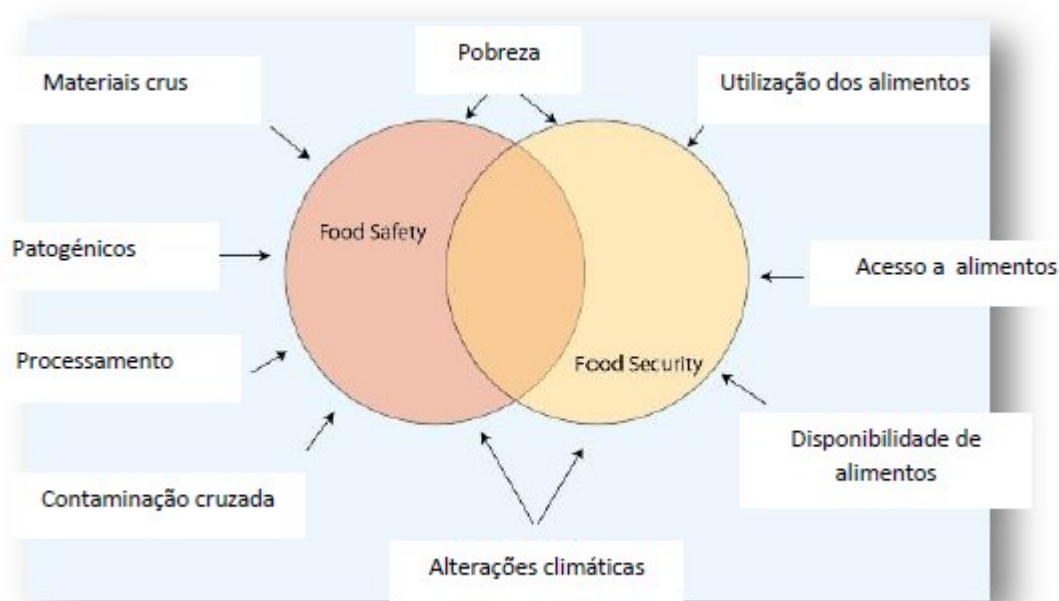


Figura 1- Inter-relação entre “food safety” e “food security”^{5 5}

Portugal, como estado membro da União Europeia (UE), tem várias formas de verificar a segurança dos géneros alimentícios, nomeadamente através do PNCA (Plano Nacional de Colheita de Amostras), sob a responsabilidade da ASAE. Este plano visa fazer um controlo analítico e de rotulagem dos géneros alimentícios colocados no mercado, com o objetivo de garantir que os mesmos são seguros para a saúde do consumidor e que cumprem com os requisitos legais aplicáveis. É uma forma de controlo oficial por amostragem, baseada no risco, cumprindo assim o estipulado no Art.º 8 do Regulamento (CE) n.º 882/2004.

Legislação sobre aditivos alimentares

Os aditivos alimentares são substâncias que não são consumidas habitualmente como géneros alimentícios em si mesmos mas que são intencionalmente adicionadas aos mesmos para atingir determinado objetivo tecnológico, como por exemplo, a conservação dos géneros alimentícios. Todos os aditivos aprovados têm de obedecer aos critérios estabelecidos no Regulamento (CE) n.º 231/ 2012, sobre as especificações para os aditivos alimentares enumerados nos anexos II e III do Regulamento (CE) n.º (CE) N.º 1333/2008. De entre os aditivos podemos distinguir 3 grupos principais: os “edulcorantes”, os “corantes” e o terceiro grupo, denominado de “outros”, que são os aditivos que não são nem edulcorantes nem corantes. Dentro deste último grupo (“outros”),

podemos encontrar uma significativa lista de aditivos que engloba a classe dos conservantes, antioxidantes, transportadores, reguladores de acidez, emulsionantes, gases de embalagem, estabilizadores, entre outros.

Só os aditivos alimentares incluídos na lista comunitária constante do anexo II do Regulamento (CE) n.º 1333/2008 , podem ser colocados no mercado enquanto tais e utilizados nos géneros alimentícios nas condições de utilização nele especificadas. Para fazer face ao progresso científico e aos avanços tecnológicos no ramo alimentar, este regulamento tem sido sucessivas vezes atualizado.

A utilização de aditivos nos géneros alimentícios não é um processo linear, e muito menos o controlo do mercado, já que nem sempre a presença de determinados aditivos em algumas categorias de alimentos, indicia uma adição intencional. Acontece que é possível detetar um aditivo num género alimentício, sem que seja adicionado com intenção de obter um efeito tecnológico ao produto final, mas sim ter sido transportado através de um ingrediente, no qual teve um efeito tecnológico. O artigo 18.º do Regulamento (CE) n.º1333/2008 identifica o *carry-over* como sendo um princípio possível, desde que seja uma categoria de alimento, no qual seja possível o *carry-over*, isto é, que não seja um alimento listado na tabela A do citado regulamento e desde que a quantidade detetada não consiga causar um efeito tecnológico no produto final onde foi encontrado.

1. Sulfitos

Os sulfitos são considerados antioxidantes, prolongam o prazo de conservação dos géneros alimentícios protegendo-os contra a deterioração causada pela oxidação, tal como a rancidez e as alterações de cor. Enquanto aditivos alimentares aprovados, os sulfitos podem ser utilizados em diversas categorias de géneros alimentícios. De acordo com o Regulamento (CE) n.º 1333/2008, o uso de E 220-228 (dióxido de enxofre, sulfitos) é proibido na carne picada mas está autorizado nos preparados de carne, tipo breakfast sausages (burger meat com um teor mínimo de 4 % de cereais e/ou outros produtos vegetais misturados com a carne) e também na salsicha fresca (longaniza fresca e butifarra fresca). Este aditivo tem um limite máximo numérico estabelecido de 450 mg/kg.

Os sulfitos estão amplamente difundidos na indústria alimentar, sendo uma substância considerada alergénica, pelo que a exposição de indivíduos sensíveis aos mesmos pode induzir uma panóplia de sinais clínicos adversos que vão desde dermatite, urticária, rubor, dor abdominal e diarreia, até asma e reações anafiláticas em situações extremas. Assim, um indivíduo alérgico tem particulares cuidados durante toda a sua vida no sentido de evitar a ingestão de alimentos que contenham sulfitos⁶.

2. Nitritos e nitratos

Os nitratos têm também a capacidade de prolongar o prazo de durabilidade dos géneros alimentícios protegendo-os contra a deterioração causada por microrganismos. Conforme estipulado no Regulamento (CE) n.º 1333/2008, os nitratos e nitritos não estão autorizados na carne fresca, nem nos preparados de carne, estando contudo autorizados para serem utilizados nos produtos à base de carne submetidos ou não a tratamento térmico. Uma outra subcategoria dedicada aos produtos à base de carne curados tradicionalmente beneficia também de disposições específicas no que se refere aos nitritos e nitratos.

Para o caso dos nitratos e nitritos é mais complexo fazer o controlo da utilização indevida nos alimentos, uma vez que existe um processo de oxi-redução, facto que levou a que no Regulamento (CE) n.º 1333/2008 esteja estabelecida um

teor máximo de nitritos/nitratos que podem ser adicionados durante o processo produtivo (na indústria) e não o teor máximo permitido no alimento colocado no mercado.

O risco que está associado ao consumo de alimentos com nitratos resulta da conversão de nitratos em nitritos, logo após a ingestão, ocorrendo na saliva de indivíduos de todas as faixas etárias, e também no trato gastrointestinal de crianças. Este último grupo populacional converte aproximadamente o dobro dos nitratos ingeridos em nitritos, face ao que se verifica para o caso dos adultos (10% versus 5%).⁹

Os efeitos que a ingestão de nitratos pode implicar a curto prazo, consistem na conversão da forma normal da hemoglobina para metahemoglobina que não tem a capacidade de transportar oxigénio. Concentrações suficientemente elevadas de nitratos podem resultar em desordens sanguíneas temporárias, especialmente em crianças, que se traduzem por metahemoglobinémia que é também designada por “síndrome do bebé azul”. Nestes casos, se os indivíduos não forem devidamente tratados podem verificar-se eventos de alguma gravidade que podem no pior cenário terminar na morte do indivíduo por falta de oxigénio nos tecidos. As mulheres grávidas estão também, à semelhança das crianças, no grupo de indivíduos mais sensíveis aos potenciais efeitos de nitratos em quantidades não habituais (fora dos parâmetros legais), uma vez que durante a gravidez se verifica um aumento natural nos níveis de metahemoglobina no sangue. Neste grupo inserem-se também os indivíduos com predisposição genética a ter os níveis de metahemoglobina anormalmente elevados, ou aqueles que têm dificuldades digestivas devido a reduzida acidez estomacal.

A longo prazo os nitratos podem ser carcinogénicos. Acredita-se que após a conversão dos nitratos em nitritos no organismo, os mesmos podem reagir com certas substâncias com grupos amina (encontradas nos alimentos), formando nitrosaminas que são conhecidas por serem potentes carcinogénicos.

(Nota: A formação de nitrosaminas é inibida por antioxidantes que podem estar presentes nos alimentos como a Vitamina C e E)⁷.

Resultados PNCA

Os resultados relacionados com a pesquisa de aditivos nos géneros alimentícios colocados no mercado, obtidos no âmbito do controlo realizado pelo PNCA, encontram-se descritos e tratados estatisticamente no artigo incluído nesta edição de “Riscos & Alimentos”, intitulado: “A segurança alimentar dos produtos cárneos no mercado retalhista, face aos resultados do Plano Nacional de Colheita de Amostras (PNCA)”, pelo que, não será desenvolvido neste artigo. Realça-se, no entanto, que em 2014, no âmbito do PNCA, terem sido colhidas 42 amostras de carnes para deteção de sulfitos, não tendo havido nenhum resultado não conforme em carne picada.⁸ Apenas foram detetados sulfitos em produtos que eram preparados de carne e não carne picada, sem que o quantitativo excedesse o limite estabelecido para o produto em causa (não excedia o limite de 450 mg/kg).

Discussão e perspectivas futuras

O uso de aditivos em alimentos, encontra-se regulamentada e é controlado pelas Autoridades Competentes. A ASAE, nos seus laboratórios, tem vindo a desenvolver cada vez mais métodos analíticos que permitem detetar e quantificar o maior número de aditivos nas várias categorias de alimentos. Para além do controlo analítico, a ASAE, sensibilizada para o problema da monitorização do consumo de aditivos através da ingestão dos alimentos, tem vindo inclusivamente a desenvolver estudos que permitam caracterizar a exposição dos consumidores nacionais ao consumo de aditivos na dieta nacional. De acordo com o determinado no artº 27 do Regulamento (CE) n.º. 1333/2008, os Estados-Membros devem manter sistemas de controlo do consumo e da utilização de aditivos alimentares numa abordagem baseada no risco e devem comunicar com a devida frequência os dados recolhidos à Comissão Europeia e à EFSA. Para isso é necessário uma metodologia comum para a recolha de informações pelos Estados-Membros relativamente ao consumo de aditivos alimentares na Comunidade. Ainda há no entanto muito para fazer, os Estados-Membros têm que iniciar esta monitorização, e perceber o efeito cumulativo dos vários aditivos face ao consumo individual nos diferentes alimentos para os quais estão aprovados.

Referências

1. <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/meat/home.html>
2. <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/meat/background.html>
3. <http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/food-safety-education/get-answers/food-safety-fact-sheets/food-labeling/additives-in-meat-and-poultry-products/additives-in-meat-and-poultry-products>
4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3300261>
5. <http://www.nature.com/scitable/knowledge/library/food-safety-and-food-security-68168348>
6. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2222.2009.03362.x/abstract>
7. <http://des.nh.gov/organization/commissioner/pip/factsheets/ard/documents/ard-ehp-16.pdf>
8. Audição ASAE @ A.R. – 4 fevereiro 2015

Clones de *Salmonella* não tifóide em produtos cárneos e seu impacto no Homem

Patrícia Antunes^{1,2} & Luísa Peixe²

¹Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação, Universidade do Porto, Portugal. patriciaantunes@fcna.up.pt

²UCIBIO/REQUIMTE. Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto. Portugal. lpeixe@ff.up.pt

Salmonella não tifóide é uma das principais causas de doenças transmitidas por alimentos em todo o mundo, sendo a estimativa global de 93,8 milhões de casos e 155.000 mortes por ano (Majowicz *et al*, 2010). Na Europa, é a segunda causa de zoonoses mais registada (82,694 casos confirmados e 20,4 casos por 100.000 habitantes em 2013) e a causa mais frequente de surtos de origem alimentar (EFSA e ECDC, 2015a). *Salmonella enterica* Enteritidis e *S. enterica* Typhimurium são os serótipos mais comuns de salmonelose, sendo os alimentos de origem animal, onde se incluem ovos, carne de aves, carne de porco e outros produtos cárneos, os principais veículos da infeção (EFSA e ECDC, 2015a).

Nos países europeus, nos últimos cinco anos (2009-2013), tem sido observada uma tendência decrescente no número de casos humanos de salmonelose, principalmente devido ao sucesso dos programas de controlo de *Salmonella* na produção de aves e ovos, o que conduziu à diminuição do nível de não cumprimento em produtos avícolas, particularmente com uma menor ocorrência de *Salmonella* em ovos (EFSA e ECDC, 2015a). Este cenário conduziu também a alterações na frequência de ocorrência de serótipos de *Salmonella* causadores de infeções humanas, sendo particularmente relevante a diminuição do número de casos por *S. Enteritidis* (19% menos casos em 2013 do que em 2011), habitualmente associado ao consumo de carne de aves e ovos, apesar de se manter como o serótipo mais frequente (EFSA e ECDC, 2015a). No entanto, tornou-se mais frequente a ocorrência de outros serótipos (ex. aumento do registo de isolados da variante monofásica de *S. Typhimurium*) a causar infeções humanas através da cadeia alimentar e com origem em diferentes espécies animais para consumo humano. De salientar, que a crescente ocorrência destes serótipos tem sido associada a determinados subtipos, designados de linhagens clonais ou clones (caracterizados por métodos de tipagem de referência como o *Pulsed-field Gel Electrophoresis*-PFGE e o *Multilocus sequence typing*-MLST), e que apresentam resistência a múltiplos agentes antimicrobianos (Antunes *et al*, 2011; Butaye *et al*, 2006; Campos *et al*, 2015; EFSA e ECDC, 2015b; Gomes-Neves *et al*, 2014).

Apesar da maioria das infeções por *Salmonella* não tifóide ser autolimitada, o uso de antibióticos é determinante para o sucesso do tratamento de infeções invasivas, que afetam especialmente os grupos de risco (crianças, idosos e imunodeprimidos) (Parry *et al*, 2008).

Assim, são de relevância para a saúde pública os clones de *Salmonella* associados a infeções humanas que apresentem uma boa capacidade de colonização de diversos animais de produção e de disseminação ou persistência ao longo da cadeia alimentar (ex. produção primária, linha de abate no matadouro, equipamento e manipuladores de produtos cárneos) (Antunes *et al*, 2011; Butaye *et al*, 2006; Gomes-Neves *et al*, 2014). Na última década, o serótipo ***S. enterica* Typhimurium** tem sido associado a vários clones clinicamente relevantes, particularmente associados à produção animal e ao consumo de carne e derivados, sendo de destacar o clone globalmente disseminado de *S. Typhimurium* DT104 resistente a múltiplos antibióticos (Antunes *et al*, 2006; Antunes *et al*, 2011; Butaye *et al*, 2006; Gomes-Neves *et al*, 2014). Em Portugal e outros países europeus, salienta-se a ocorrência de outro clone de *S. Typhimurium*, designado de *S. Typhimurium* produtor de OXA-30, associado principalmente a carne de porco e derivados (Antunes *et al*, 2006; Antunes *et al*, 2010). A análise recente dos isolados portugueses de *S. Typhimurium* obtidos de diversas origens demonstra a manutenção, durante a última década, destes dois clones com as características de resistência a múltiplos antibióticos típicas destas estirpes (Campos *et al*, 2015). Adicionalmente, nos últimos anos, a ocorrência de isolados de *S. Typhimurium* multirresistentes, incluindo a cefalosporinas de espectro alargado (antibióticos clinicamente relevantes utilizados na terapêutica da salmonelose), tem aumentado globalmente, associando-se em algumas situações à disseminação de determinados clones (ex. *S. Typhimurium* DT193 de humanos e suínos na Alemanha) dos animais ao Homem (Eller *et al*, 2013; EFSA e ECDC, 2015b).

Entre os serótipos clinicamente relevantes inclui-se também ***S. enterica* 4,[5],12:i:-** (variante monofásica de *S. Typhimurium*), sugerido como um novo serótipo epidémico envolven-

do diferentes países europeus, incluindo Portugal, associado a elevadas taxas de multirresistência (Antunes *et al*, 2011; EFSA, 2010; Hopkins *et al*, 2010; Mourão *et al*, 2014). Este serótipo, de importância crescente a nível mundial, apresenta-se na Europa como o terceiro mais frequente a causar casos de salmonelose, tendo sido registado um aumento de 68,8% entre 2011 e 2013 (EFSA e ECDC, 2015a), e também associado a surtos de grande dimensão com origem no consumo de produtos cárneos (Gossner *et al*, 2012; Raguenaud *et al*, 2012). Os animais de produção, particularmente os suínos, têm sido apontados como o reservatório de *S. enterica* 4,[5],12:i:- e os produtos derivados como os principais veículos da infeção (EFSA, 2010; Hauser *et al*, 2010), tal como tem sido demonstrado em vários estudos epidemiológicos (Antunes *et al*, 2011; Gomes-Neves *et al*, 2014; Hauser *et al*, 2010; Mourão *et al*, 2014). Atualmente, são reconhecidos dois clones predominantes de *S. enterica* 4,[5],12:i:-, previamente designados como 'European clone' (ST19; vários perfis de PFGE) e 'Spanish clone' (ST19; vários perfis de PFGE), disseminados em diversas regiões geográficas da Europa (Hauser *et al*, 2010; Hopkins *et al*, 2010; Mourão *et al*, 2014) ou com particular ocorrência na Península Ibérica, respetivamente (Antunes *et al*, 2011; García *et al*, 2014; Mourão *et al*, 2014). Um terceiro clone menos frequente (designado como *Southern-European clone*; ST34), foi recentemente descrito em Portugal (Mourão *et al*, 2014) e também entre alguns isolados esporádicos de Itália e Espanha (García *et al*, 2014). Todos os clones apresentam uma combinação de características moleculares de resistência a diversos antibióticos (Mourão *et al*, 2014), sendo de salientar o registo de isolados com resistência a antibióticos clinicamente relevantes (fluoroquinolonas ou cefalosporinas) utilizados na terapêutica de infeções graves (Clemente *et al*, 2013; Eller *et al*, 2013; Mulvey *et al*, 2013). Adicionalmente, verificamos num estudo recente que os dois clones predominantes (*European* e *Spanish*) apresentam habitualmente uma maior tolerância ao cobre em condições anóxicas, o que poderá facilitar a sua adaptação e expansão em ambientes contaminados com metais, nomeadamente na produção animal (Mourão *et al*, 2015).

Relativamente a outros serótipos menos frequentes, mas com importância clínica, têm sido registados alguns surtos de dimensões significativas e associados ao consumo de produtos cárneos, mostrando a necessidade de monitorização contínua da cadeia alimentar para a deteção precoce da

emergência de novos serótipos e/ou clones de *Salmonella*. Um dos serótipos globalmente emergentes é *S. enterica* **Rissen**, encontrando-se entre os mais frequentemente associados a suínos e produtos cárneos à base de porco (Antunes *et al*, 2006; Antunes *et al*, 2011; Clemente *et al*, 2013; Gomes-Neves *et al*, 2014). Em Portugal, *S. Rissen* foi o quarto serótipo mais identificado a causar infeções entre 2002 e 2013 (Silveira *et al*, 2014), sendo associado frequentemente a um clone com origem na produção suína e produtos cárneos derivados, apresentando habitualmente resistência a múltiplos antibióticos (Antunes *et al*, 2006; Antunes *et al*, 2011; Campos *et al*, 2015). Na Europa, é também de salientar o aumento (26,5% entre 2011 e 2013) de casos humanos de *S. enterica* **Infantis**, o quarto serótipo mais frequente, tendo sido o mais reportado em carne de frango (EFSA e ECDC, 2015a). Este aumento é justificado pela disseminação, em diversos países europeus, de vários clones multirresistentes de *S. Infantis* com origem na indústria de produção de carne de aves (Nógrády *et al*, 2012). Outro exemplo de disseminação de um clone associado à cadeia de produção de aves foi o associado ao surto (> 700 casos) de *S. enterica* **Stanley** que abrangeu vários países da Europa central. Este surto foi causado por um novo clone que apresenta diminuição de suscetibilidade à ciprofloxacina, com origem na produção de perus (perus e carne de peru), encontrando-se a circular no mercado alimentar europeu, pelo menos desde 2011 (ECDC e EFSA, 2014).

Uma situação particular relacionada com a crescente globalização das viagens e do comércio (alimentos/animais) em diferentes regiões geográficas foi a ocorrida nos últimos anos com a disseminação e persistência global do serótipo *S. enterica* **Kentucky**. Este serótipo tem sido particularmente associado a um clone (ST198; perfil de PFGE designado de X1) multirresistente disseminado em alimentos, animais e humanos em diversas regiões mundiais (África, Ásia, Europa e América do Norte) (Le Hello *et al*, 2011; Le Hello *et al*, 2013). Este clone epidémico tem sido associado a diversos reservatórios animais, particularmente produção de aves, sendo a carne de frangos e perus importantes veículos da sua propagação ao Homem (Le Hello *et al*, 2013; Wasyl *et al*, 2015). Uma das características do clone ST198 é a resistência a múltiplos antibióticos, nomeadamente resistência elevada às fluoroquinolonas e ocasionalmente resistência a cefalosporinas e carbapenems, para além da sua capacidade de colonização das aves e persistência no ambiente de

produção animal (Le Hello *et al*, 2011; Le Hello *et al*, 2013; Wasyl *et al*, 2015).

A seleção destes clones bem-sucedidos de *Salmonella*, particularmente bem adaptados ao ambiente de produção animal e com capacidade de colonização e/ou infecção de animais e humanos, poderá estar associada a uma maior capacidade de sobrevivência aos agentes antimicrobianos, onde se incluem os antibióticos e os compostos não utilizados com fins terapêuticos, como por exemplo o cobre comumente administrado em rações como promotor de crescimento (Mourão *et al*, 2015). Diversos fatores, onde se inclui o comércio internacional de animais, rações e produtos cárneos, e uma produção primária para algumas espécies animais associada a poucas linhagens também poderão desempenhar um papel relevante na disseminação destes clones (Clemente *et al*, 2013; EFSA e ECDC, 2015b; Mourão *et al*, 2014; Mourão *et al*, 2015). A expansão global de clones de *Salmonella* resistentes às primeiras opções terapêuticas (fluoroquinolonas e cefalosporinas de 3ª geração) para o tratamento de infecções humanas por estes agentes bacterianos é preocupante, estando associada a maior morbidade, mortalidade e impacto económico (EFSA e ECDC, 2015b).

Assim, o seguimento da dinâmica populacional e conhecimento dos fatores promotores da sobrevivência e/ou persistência de *Salmonella* não tífóide nos animais de produção e nos alimentos derivados é essencial para a compreensão da evolução deste patogénico zoonótico, identificação dos serótipos e linhagens clonais emergentes, assim como das suas origens e vias de transmissão, por forma a melhorar as estratégias de prevenção e de intervenção ao longo da cadeia alimentar.

Referências:

Antunes P, Machado J, Peixe L. 2006. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal. *J Antimicrob Chemother* 58 (2):297-304.

Antunes P, Coque TM, Peixe L. 2010. Emergence of an IncIy plasmid encoding CMY-2 β -lactamase associated with the international ST19 OXA-30-producing β -lactamase *Salmonella* Typhimurium multidrug-resistant clone. *J Antimicrob Chemother*. 65(10):2097-100.

Antunes P, Mourão J, Pestana N, Peixe L. 2011. Leakage of emerging clinically relevant multidrug-resistant *Salmonella* clones from pig farms. *J Antimicrob Chemother* 66 (9):2028-2032.

Butaye P, Michael GB, Schwarz S, Barrett TJ, Brisabois A, White DG. 2006. The clonal spread of multidrug-resistant non-typhi *Salmonella* serotypes. *Microbes Infect* 8(7):1891-1897.

Campos J, Marçal S, Mourão J, Machado J, Novais C, Peixe L, Antunes P. 2015. Clonal dynamics of clinically relevant multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium, S. 4,[5],12:i:- and S. Rissen in the last decade. 25th European Congress of Clinical Microbiology

and Infectious Diseases (ECCMID), 25-28 April, Copenhagen, Denmark, P1109.

Clemente L, Manageiro V, Ferreira E, Jones-Dias D, Correia I, Themudo P, Albuquerque T, Caniça M. 2013. Occurrence of extended-spectrum β -lactamases among isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* from food-producing animals and food products, in Portugal. *Int J Food Microbiol*. 15;167(2):221-8.

ECDC e EFSA (European Centre for Disease Prevention and Control and European Food Safety Authority), 2014. Multi-country outbreak of *Salmonella* Stanley infections – Third update, 8 May 2014. Stockholm and Parma: ECDC/EFSA; 2014. Available at: <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/>

[Publications/Salmonella-stanley-multi-country-outbreak-assessment-8-May-2014.pdf](http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Salmonella-stanley-multi-country-outbreak-assessment-8-May-2014.pdf).

EFSA (European Food Safety Authority). Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). 2010. Scientific Opinion on monitoring and assessment of the public health risk of 'Salmonella Typhimurium-like strains'. *EFSA Journal* 2010;8:1826.

EFSA e ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control). 2015a. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. *EFSA Journal* 13 (1):3991, 162 pp.

EFSA e ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control). 2015b. The EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. *EFSA Journal* 13 (2):4036, 178 pp.

Eller C, Simon S, Miller T, Frick JS, Prager R, Rabsch W, Guerra B, Werner G, Pfeifer Y. 2013. Presence of β -lactamases in extended-spectrum-cephalosporin-resistant *Salmonella enterica* of 30 different serovars in Germany 2005-11. *J Antimicrob Chemother* 68 (9):1978-81.

Garcia P, Hopkins KL, Garcia V, Beutlich J, Mendoza MC, Threlfall J, Mevius D, Helmuth R, Rodicio MR, Guerra B, Med-Vet-Net WPPG. 2014. Diversity of Plasmids Encoding Virulence and Resistance Functions in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Typhimurium Monophasic Variant 4,[5],12:i:- Strains Circulating in Europe. *PLoS One* 9 (2):e89635.

Gomes-Neves E, Antunes P, Manageiro V, Gärtner F, Caniça M, da Costa JM, Peixe L. 2014. Clinically relevant multidrug resistant *Salmonella enterica* in swine and meat handlers at the abattoir. *Vet Microbiol* 10;168(1):229-33.

Gossner CM, van Cauteren D, Le Hello S, Weill FX, Terrien E, Tessier S, Janin C, Brisabois A, Dusch V, Vaillant V, Jourdan-da Silva N. 2012. Nationwide outbreak of *Salmonella enterica* serotype 4,

- [5],12:i:- infection associated with consumption of dried pork sausage, France, November to December 2011. *Euro Surveill* 17 (5).
- Hauser E, Tietze E, Helmuth R, Junker E, Blank K, Prager R, Rabsch W, Appel B, Fruth A, Malorny B. 2010. Pork contaminated with *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:-, an emerging health risk for humans. *Appl Environ Microbiol* 76 (14):4601-4610.
- Hopkins KL, Kirchner M, Guerra B, Granier SA, Lucarelli C, Porrero MC, et al. 2010. Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4, [5],12:i:- in Europe: a new pandemic strain? *Euro Surveill* 15:19580.
- Le Hello S, Hendriksen RS, Doublet B, Fisher I, Nielsen EM, Whitchard JM, Bouchrif B, Fashae K, Granier SA, Jourdan-Da Silva N, Cloeckeaert A, Threlfall EJ, Angulo FJ, Aarestrup FM, Wain J, Weill FX. 2011. International spread of an epidemic population of *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198 resistant to ciprofloxacin. *J Infect Dis*. 2011 1;204(5):675-84.
- Le Hello S, Bekhit A, Granier SA, Barua H, Beutlich J, Zajac M, Münch S, Sintchenko V, Bouchrif B, Fashae K, Pinsard JL, Sontag L, Fabre L, Garnier M, Guibert V, Howard P, Hendriksen RS, Christensen JP, Biswas PK, Cloeckeaert A, Rabsch W, Wasyl D, Doublet B, Weill FX. 2013. The global establishment of a highly-fluoroquinolone resistant *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198 strain. *Front Microbiol*. 2013 18;4:395.
- Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, Jones TF, Fazil A, Hoekstra RM, International Collaboration on Enteric Disease 'Burden of Illness' Studies. 2010. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin. Infect. Dis*. 50:882-889. doi: 10.1086/650733.
- Mourão J, Machado J, Novais C, Antunes P, Peixe L. 2014. Characterization of the emerging clinically-relevant multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:- (monophasic variant of *S. Typhimurium*) clones. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014 33 (12):2249-57.
- Mourão J, Novais C, Machado J, Peixe L, Antunes P. 2015. Metal tolerance in emerging clinically relevant multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:- clones circulating in Europe. *Int J Antimicrob Agents*. 2015 Mar 7. pii: S0924-8579(15)00076-X. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2015.01.013.
- Mulvey MR, Finley R, Allen V, Ang L, Bekal S, El Bailey S, Haldane D, Hoang L, Horsman G, Louie M, Robberts L, Wylie J, McCracken M, Langner S, Ahmed R, Tabor H, Gilmour M. 2013. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:- involving human cases in Canada: results from the Canadian Integrated Program on Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS), 2003-10. *J Antimicrob Chemother* 68 (9):1982-1986.
- Nógrády N, Király M, Davies R, Nagy B. 2012. Multidrug resistant clones of *Salmonella Infantis* of broiler origin in Europe. *Int J Food Microbiol*. 15;157(1):108-12.
- Parry CM, Threlfall EJ. 2008. Antimicrobial resistance in typhoidal and nontyphoidal salmonellae. *Curr Opin Infect Dis*. 21(5):531-8.
- Raguenaud ME, Le Hello S, Salah S, Weill FX, Brisabois A, Delmas G, Germonneau P. 2012. Epidemiological and microbiological investigation of a large outbreak of monophasic *Salmonella Typhimurium* 4,5,12:i:- in schools associated with imported beef in Poitiers, France, October 2010. *Euro Surveill* 17 (40):20289.
- Silveira L, Marques A, Santos J, Furtado C, Machado J. 2014. *Salmonella enterica*: serotipos menos frequentes com importância em patologia humana, caracterizados no INSA entre 2002-2013. *Observações_Boletim Epidemiológico do Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge*. http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/2297/3/observacoesNEspecial3-2014_artigo12.pdf.
- Wasyl D, Kern-Zdanowicz I, Domańska-Blicharz K, Zajac M, Hozowski A. 2015. High-level fluoroquinolone resistant *Salmonella enterica* serovar Kentucky ST198 epidemic clone with IncA/C conjugative plasmid carrying bla(CTX-M-25) gene. *Vet Microbiol*. 2015 Jan 30;175(1):85-91.

A segurança alimentar dos produtos cárneos no mercado retalhista, face aos resultados do Plano Nacional de Colheita de Amostras (PNCA)

Mafalda T. Costa¹, Ana Teresa Roldão², Inês Reis³

¹ Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, Departamento de Riscos Alimentares e Laboratórios

² Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto

³ Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa

A perspetiva do consumidor, quanto às matérias de segurança alimentar, estará sempre dependente da eficácia do desempenho das entidades competentes em matéria de controlo e segurança dos mercados.

A atuação das entidades que coordenam e monitorizam os planos de controlo em segurança alimentar deve ser eficaz na deteção dos riscos associados, eficiente nas ações que desencadeiam para eliminar os perigos detetados e simultaneamente garantirem discricção nas suas ações, de forma a minimizar fenómenos de alarmismo e/ou pânico nos consumidores.

Na vertente preventiva, no âmbito da segurança alimentar, a ASAE detém um papel de máxima relevância, por garantir a execução do Plano Nacional de Colheita de Amostras (PNCA)¹, que monitoriza o mercado retalhista.

Este artigo pretende dar uma perspetiva do estado de arte quanto às questões de segurança alimentar dos produtos cárneos, no mercado retalhista nacional, face aos resultados do PNCA de 2014.

Plano Nacional de Colheita de Amostras

O PNCA¹ tem como objetivos assegurar e verificar que os géneros alimentícios colocados no mercado não colocam em risco a segurança e saúde humanas, bem como assegurar os interesses do consumidor ao nível da correta e adequada informação da rotulagem. Desta forma, cabe ao Departamento de Risco Alimentares e Laboratórios (DRAL) a sua elaboração, planeamento e execução laboratorial.

De acordo com o fixado Artigo 3º do Regulamento (CE) n.º 882/2004², os Estados-Membros devem assegurar que os controlos oficiais sejam realizados regularmente, em função dos riscos. Para esse fim, recorre-se à **Matriz de Risco Composta (MRC)** e cálculo do **Número Prioritário de Risco (NPR)**, ferramentas que permitem definir o tamanho amostral de todos os grupos de géneros alimentícios e classificá-los, quantitativamente, quanto ao nível de risco que representam. Os indicadores utilizados são: o **Índice de Gravidade** ou Grau de risco dos perigos identificados associados aos géneros alimentícios; o **Índice de Ocorrência** ou grau de incumprimento do ano anterior; o **Índice de Deteção** ou probabilidade de detetar o perigo. A partir do cálculo do NPR são estabelecidos o número mínimo de amostras (nº) por grupo de género alimentício a colher e estabelecem-se, ainda, quais as determinações laboratoriais a realizar.

A verificação da aceitabilidade das amostras colhidas no âmbito deste plano foi efetuada atendendo ao estabelecido em regulamentação Nacional e/ou Comunitária.

1. Estrutura do PNCA para o grupo das “Carnes”

A fim de identificar variáveis e permitir a extração de informação pertinente, as amostras de géneros alimentícios encontram-se agrupadas, de acordo com as suas características, em 13 grupos, que por sua vez são divididos em subgrupos mais detalhados.

Conforme consta na figura 1, o grupo das “Carnes” foi identificado com risco elevado quanto à segurança alimentar, tendo sido determinado o número mínimo de 168 amostras a colher no âmbito do PNCA.

PNCA 2014 - Plano de amostragem estratificado em função do risco			
Grupos	NPR	Proporção Estrato	nº
Carnes	240	0,129	168

Risco Elevado

Figura 1 - Plano de amostragem para o grupo das “Carnes” estratificado em função do risco

Relativamente ao grupo das “Carnes”, género alimentício em foco neste artigo, encontra-se classificado nos seguintes subgrupos:

Carne fresca – carne não submetida a qualquer processo de preservação que não a refrigeração, a congelação ou a ultracongelação, incluindo carne embalada em vácuo ou em atmosfera controlada [n.º 1.10 do Anexo I do Regulamento (CE) n.º 853/2004³];

Carne picada – carne desossada que foi picada e que contém menos de 1 % de sal [n.º 1.13 do Anexo I do Regulamento (CE) n.º 853/2004³];

Preparados de carne – carne fresca, incluindo carne que tenha sido reduzida a fragmentos, a que foram adicionados outros géneros alimentícios [n.º 1.15 do Anexo I do Regulamento (CE) n.º 853/2004³];

Produtos à base de carne – produtos transformados, resultantes da transformação da carne ou da anterior transformação desses produtos transformados, de tal modo que a superfície de corte à vista permita constatar o desaparecimento das características da carne [n.º 7.1 do Anexo I do Regulamento (CE) n.º 853/2004³].

2. Análises laboratoriais realizadas

Em 2014, foram alvo de colheita para análises químicas, microbiológicas e avaliação de rotulagem **2143** amostras dos diversos grupos de géneros alimentícios, das quais **249** pertenceram ao grupo das “Carnes”, tendo representado **12%** do total de amostras colhidas.

As amostras do grupo das “Carnes” foram sujeitas a determinações laboratoriais, distribuídas pelos subgrupos, conforme a Tabela 1.

Tabela 1 - Amostras colhidas por subgrupo, no grupo das “Carnes”

Amostras	Total Geral
Grupo das “Carnes”	249
Carne fresca	34
Carne picada	42
Preparados de carne	73
Produtos à base de carne	100

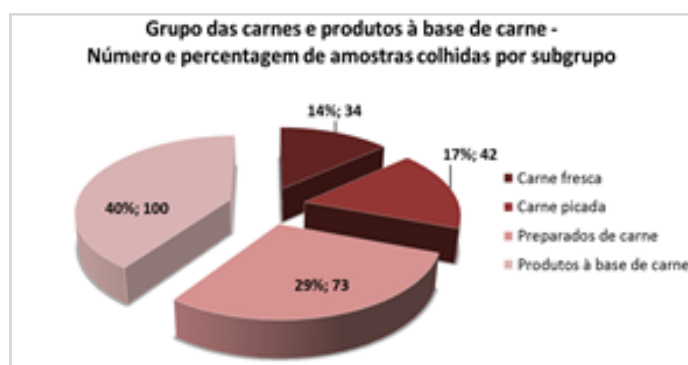


Gráfico 1 - Percentagem de amostras colhidas por subgrupo, no grupo das “Carnes”.

A percentagem de amostras colhidas por subgrupo encontra-se representada no Gráfico 1. As 249 amostras analisadas do grupo das “Carnes” foram sujeitas a análises microbiológicas e a análises químicas, conforme descrito no Gráfico 2.

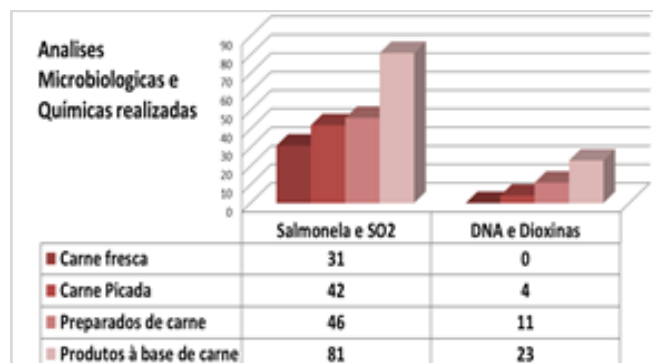


Gráfico 2 - Análises efetuadas por subgrupo de amostras

Os ensaios microbiológicos efetuados corresponderam aos critérios de segurança contemplados no Regulamento (CE) n.º 2073/2005⁴, nomeadamente pesquisa de *Salmonella* em 10 g ou em 25 g.

Os ensaios químicos foram orientados para a pesquisa dos contaminantes, previstos no Regulamento (CE) n.º 1881/2006⁵, nomeadamente para a análise das dioxinas, bem como para a determinação do teor de dióxido de enxofre ou sulfitos nos subgrupos de carne picada e preparados de carne, dada a necessidade de controlo e monitorização dos requisitos legais deste aditivo (Regulamento (CE) n.º 1333/2008¹²).

Em outubro de 2014, o Laboratório de Microbiologia da ASAE deu início ao método de biologia molecular, permitindo o estudo de autenticidade das espécies de bovino, suíno, ovino, caprino, coelho, peru e galinha, possibilitando a confirmação das espécies animais indicadas no rótulo dos géneros alimentícios. Esta técnica de biologia molecular, desenvolvida pelo Laboratório de Microbiologia da ASAE, quantifica, ainda, por gamas de concentração, as espécies presentes no género alimentício.

Discussão - Análise dos resultados conformes e não conformes (NC)

Da totalidade das 249 amostras colhidas e sujeitas a ensaio, 9 apresentaram-se não conformes ou não satisfatórias (gráfico 3), o que equivale a dizer que 3,6 % das amostras deste grupo, não cumpriram o disposto na Legislação Nacional e/ou Comunitária (tabela 2).

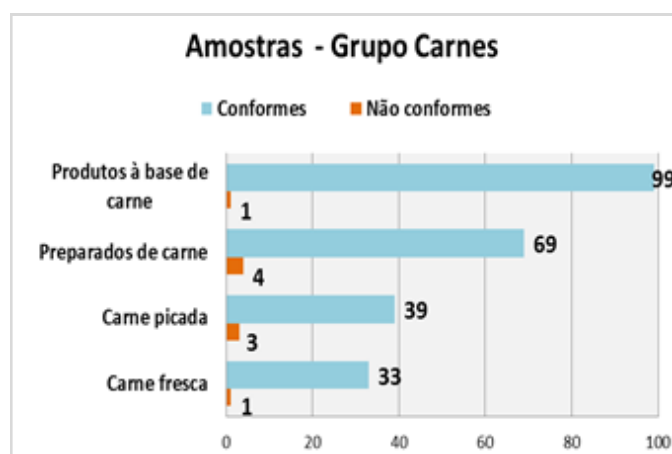


Gráfico 3 - Amostras conformes e não conformes por subgrupos

Amostras	Conformes	NC	% NC
Grupo das "Carnes"	240	9	3,6 %
Carne fresca	33	1	2,9 %
<i>Salmonella</i>	33	1	2,9%
Carne picada	39	3	7,1 %
<i>Salmonella</i>	20	3	13,0 %
Preparados de carne	69	4	5,5 %
DNA	16	3	15,8
<i>Salmonella</i>	45	1	2,2 %
Produtos à base de carne	99	1	1,0 %
DNA	3	1	(*)

Tabela 2 - Número e percentagem de amostras conformes e não conformes por grupo das "Carnes".

(*) - Baixa dimensão amostral

A avaliação dos subgrupos permitiu verificar que o subgrupo das **carnes picadas** apresentou maior percentagem de não conformidades, com **7,1%** de incidência, seguida do subgrupo dos **preparados de carne com 5,5%** de não conformidades (tabela 2).

2.1. Pesquisa de *Salmonella* e perigos microbiológicos

A presença (pesquisa positiva) de *Salmonella* foi a causa das não conformidades encontradas e o perigo microbiológico detetado em 5 amostras. Destas 5 amostras não satisfatórias à *Salmonella*, 3 foram detetadas em carne picada, 1 numa amostra de carne fresca e 1 numa amostra de preparados de carne (tabela 2).

A carne fresca, a carne picada e os preparados de carne, apesar de por tradição culinária não serem consumidos crus mas cozinhados/transformados, podem ser consumidos crus se ao consumidor não chegar a informação clara de que não o deverá fazer.

É o produtor ou o fabricante de um produto alimentar o responsável por decidir se o produto está pronto a ser consumido, sem necessidade de ser cozinhado ou submetido a outra transformação, para garantir a sua segurança e o cumprimento dos critérios microbiológicos.

De acordo com a alínea g) do artigo 2º do Regulamento (CE) n.º 2073/2005⁴, relativo aos critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, os "alimentos prontos para consumo" são os "alimentos destinados pelo produtor ou fabricante ao consumo humano direto, sem necessidade de cozedura ou outra transformação, eficazes para eliminar ou reduzir para um nível aceitável os microrganismos perigosos". Este Regulamento fixa, igualmente, que a carne fresca, a carne picada e os preparados de carne, quando destinados a serem cozinhados, não poderão apresentar, em nenhuma das cinco unidades que constituem uma amostra, positividade à *Salmonella* em 10g ou, na carne de aves, em 25g, enquanto a carne picada, os preparados de carne e os produtos à base de carne, destinados a serem consumidos crus, não poderão apresentar, em nenhuma das cinco unidades que constituem uma amostra, positividade à *Salmonella* em 25g.

A *Salmonella*, detetada em **5 amostras deste grupo**, é a bactéria responsável pela Salmonelose, uma doença de animais que pode ser transmitida a humanos (zoonose)⁶. Esta é talvez a doença mais frequentemente associada a consumo de alimento contaminados, em particular de carne de aves e ovos. No entanto, outros alimentos como carne de vaca, de porco, leite, fruta, ervas aromáticas, especiarias, chocolate e outros, têm sido associados a casos isolados ou surtos de salmonelose. Por outro lado, o contacto de alimentos contaminados com superfícies, equipamentos ou utensílios usados na preparação de outros alimentos podem originar a sua contaminação por contaminação cruzada⁷.

Estes resultados poderão ser indicadores de más práticas de higiene resultantes de planos de higienização mal implementados ou por utilização de matérias-primas contaminadas microbiologicamente e/ou por contaminação cruzada.

2. Pesquisa de DNA e fraude

Não colocando em risco a segurança alimentar, a **fraude**¹ associada ao grupo das “Carnes” está relacionada com a presença de ingredientes não declarados na rotulagem dos géneros alimentícios (por exemplo, a presença de carne de cavalo em produtos que não declaram ou presença de outras espécies de valor comercial inferior à declarada).

Quanto aos resultados obtidos por **biologia molecular (pesquisa de ADN)** podemos concluir que a taxa de ocorrência de amostras não conformes é de 17,4%, ou seja, os mesmos são preocupantes quanto à veracidade da informação da autenticidade destes subgrupos de géneros alimentícios disponíveis ao consumidor.

O subgrupo Preparados de Carne, com uma taxa de incumprimento de 15,8%, é o mais atingido do ponto de vista de suspeita de fraude ou presença de espécies animais não mencionadas na rotulagem (tabela 2).

Os requisitos relativos à livre circulação de géneros alimentícios, conforme dispõe o Regulamento (CE) nº 178/2002⁸ devem garantir, para além de um elevado nível de proteção da vida e da saúde humanas, a proteção dos interesses dos consumidores onde se inclui as boas práticas no comércio de géneros alimentícios.

O Regulamento (CE) n.º 1169/2011⁹, relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, estabelece normas da União em matéria de rotulagem dos alimentos que são aplicáveis a todos os alimentos. Em conformidade com este Regulamento, a rotulagem e os métodos utilizados não devem induzir o consumidor em erro, nomeadamente no que respeita às características do alimento, incluindo à sua verdadeira natureza e identidade. Além disso, a denominação de venda de um alimento deve ser suficientemente precisa para permitir que o comprador conheça a verdadeira natureza. Acresce que, todos os ingredientes têm de ser mencionados no rótulo de géneros alimentícios pré-embalados destinados ao consumidor final ou a coletividades. Em especial, os alimentos que contenham carne entre os seus ingredientes, quando destinados ao consumidor final ou a coletividades, têm também de indicar a espécie animal de que a carne provém diretamente na embalagem ou num rótulo adjunto.

¹ Fraude - Natureza diferente ou de qualidade e quantidade inferiores à que afirmam possuírem ou aparentarem (DL 28/84 de 20 de janeiro)

3. Perigos químicos

Relativamente aos **perigos químicos, não foi detetada a presença de sulfitos em carnes picadas** nem em concentrações superiores ao limite máximo estabelecido em produtos cuja adição se encontra autorizada, tal como **não foi detetada a presença de Dioxinas e PCB's**, nos subgrupos analisados.

3.1. Sulfitos

Os sulfitos são adicionados aos produtos à base de carne, como conservantes. A sua presença aumenta a fase de latência das bactérias (fase de adaptação metabólica ao novo ambiente- *lang phase*)¹⁰, desacelera a taxa de crescimento microbiológico, inibindo, desta forma, os processos de decomposição e putrefação da carne que originam odores desagradáveis. São eficazes contra *Salmonella spp* e muitas outras *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp*, *Lactobacillus spp* e várias espécies de leveduras. Nos preparados de carne como as salsichas frescas, hambúrgueres e outros preparados são um antioxidante eficaz. Atuam, também, como agentes redutores para evitar o escurecimento de preparados de carne picada e salsichas frescas. Os sulfitos, autorizados a serem utilizados em alguns géneros alimentícios, devem ser declarados na rotulagem sempre que a sua concentração for superior a 10mg/kg. A presença não declarada deste aditivo em géneros alimentícios pode representar um eventual risco para a saúde do consumidor, já que a sua presença poderá desencadear reações alérgicas a consumidores mais sensíveis¹¹.

O Regulamento (CE) n.º 1333/2008¹² estabelece normas relativas aos aditivos utilizados nos géneros alimentícios e nele consta, dentro do grupo dos produtos da carne, quais os subgrupos autorizados a aplicação tecnológica de sulfitos, conforme consta na tabela 3.

Tabela 3 - Teores máximos admissíveis no grupo das “Carnes”

Aditivo nº	Designação	Teor máximo (mg/kg)	Categoria nº 08.2 Preparados de carne, na aceção do Regulamento (CE) n.º 853/2004 ³
E 220-228	Dióxido de enxofre - sulfitos	450	Unicamente <i>breakfast sausages</i> ; <i>burger meat</i> com um teor mínimo de 4 % de cereais e/ou outros produtos vegetais misturados com a carne
E 220-228	Dióxido de enxofre - sulfitos	450	Unicamente salsicha fresca, <i>longaniza</i> fresca, <i>butifarra</i> fresca

3.2. Dioxinas e PCB's

As dioxinas referem-se a dois grupos de compostos: os PCDDs (dibenzo-p-dioxinas policloradas) e os PCDFs (dibenzofuranos)¹³. São compostos estáveis, persistentes, altamente tóxicos, cancerígenos, teratogénicos, que podem aparecer em matrizes orgânicas, inorgânicas e biológicas. Não são produzidas intencionalmente e ocorrem numa série de processos químicos, formando-se em pequena quantidade em quase todos os processos de combustão. A principal via de exposição humana às dioxinas prende-se com a ingestão de alimentos, sendo a principal fonte os produtos de origem animal com alto teor em gordura (carne, leite, ovos, peixe e seus derivados).

No âmbito do PNCA, as análises de dioxinas incidiram nos subgrupos de preparados de carne e produtos à base de carne, dada a sua composição apresentar, em geral, percentagens consideráveis de gordura animal.

Conclusão

A questão de reflexão que se coloca é se, de facto, é **seguro consumir carne em Portugal**. Após análise dos resultados, é importante refletir sobre três grandes áreas de controlo: a **informação ao consumidor, os critérios microbiológicos e os critérios químicos**.

Quanto à **informação ao consumidor**, será necessário que a veracidade das menções de rotulagem seja garantida pelos operadores económicos, sendo que a ASAE, neste âmbito, se encontra já a desenvolver um plano de monitorização orientado exclusivamente para a pesquisa de DNA em espécies cárneas nos géneros alimentícios.

Quanto aos **critérios microbiológicos**, a taxa de incumprimento reflete a necessidade de se garantir um controlo cada vez mais rigoroso seja na vertente preventiva (através do PNCA), seja na vertente inspetiva (ações previstas de fiscalização).

Relativamente aos **critérios químicos**, não há razões de preocupação dado os resultados obtidos.

Face aos resultados obtidos e sabendo que “risco zero” não existe, podemos concluir que **o mercado retalhista garante confiança nos géneros alimentícios que disponibiliza**.

A ASAE continua, obviamente, nas suas vertentes de atividade inspetiva e preventiva atenta e atuante na perspetiva de garantir o risco mínimo aos consumidores.

Referências

- [1] Autoridade de Segurança Alimentar e Económica; Divisão dos Riscos Alimentares (2014) Relatório Anual, Plano Nacional de Coleta de Amostras;
- [2] Regulamento (CE) n.º 882/2004 da Comissão Europeia, de 29 de abril de 2004
- [3] Regulamento (CE) n.º 853/2004 da Comissão Europeia, de 29 de abril de 2004
- [4] Regulamento (CE) n.º 2073/2005 da Comissão, de 15 de novembro de 2005
- [5] Regulamento (CE) n.º 1881/2006 da Comissão, de 19 de dezembro de 2006
- [6] European Food Safety Authority (2014) “EFSA explains zoonotic diseases: Salmonella”. 978-92-9199-608-7;
- [7] European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control (2012) Scientific Report of EFSA and ECDC: The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012;
- [8] Regulamento (CE) n.º 178/2002 da Comissão, de 28 de janeiro de 2002
- [9] Regulamento (CE) n.º 1169/2011 da Comissão, de 25 de outubro de 2011
- [10] Food Science Australia (2006) Meat Technology – Information sheet. Sulphur dioxide, sulphites in meat products.
- [11] EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). (2014) Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes;
- [12] Regulamento (CE) n.º 1333/2008 da Comissão, de 16 de dezembro de 2008
- [13] <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/dioxins.htm>, European Food Safety Authority, Dioxins and PCBs, acedido em 18.04.15

“ASAE vai à Escola”

Um instrumento de apoio à sensibilização e promoção da higiene e segurança alimentar

Rita Vilela

Escritora, Psicóloga e Formadora

A segurança alimentar é um assunto sério. Os riscos são muitos, mas há gestos que podem ajudar a minimizá-los.

E se é na infância que se adquirem muitos dos hábitos que nos acompanharão durante toda a vida, é nessa fase que devemos começar a trabalhar esta temática, no sentido de alertar para os riscos e promover comportamentos mais saudáveis que possam perdurar no tempo.



Tendo isso presente, o Departamento de Riscos Alimentares e Laboratórios da ASAE desenvolve um importante trabalho de sensibilização junto das escolas. Integrado no projeto “ASAE vai à Escola”, os projetos “Alimento Seguro” e “mãos limpas”, que contam com a participação de médicos veterinários e biólogos da ASAE, já chegaram a mais de cinco mil alunos.

Mas o público-alvo é vasto, há imenso trabalho a fazer, pelo que são bem-vindos todos os instrumentos que possam contribuir para o mesmo objetivo, alargando o universo de crianças sensibilizadas no tema.

Identificada a necessidade, nasceu a ideia de criar um livro, uma história que cativasse e divertisse as crianças mas que, ao mesmo tempo, trabalhasse as ideias chave neste domínio, sensibilizando para riscos e formas de os evitar. Afinal, todos gostamos de ouvir histórias, uma boa história é uma excelente forma de fazer passar uma mensagem.

E da ideia passou-se à obra. Com o apoio técnico e patrocínio da ASAE (enquanto ponto focal da EFSA) e a minha escrita, nasceu o “Curso de defesa contra bactérias más”, que a Sandra Serra ilustrou com graça e talento, e que a Booksmile publicou.

O enredo é simples, a linguagem acessível aos mais jovens: quando o Afonso, o primo da Maria, adoece, o médico vai procurar pistas que levem à descoberta do verdadeiro responsável por aquela doença. A verdade vai surpreender os dois primos. Para perceberem o que se passou, a Maria e o Afonso vão frequentar um dos cursos do Jardim Zoológico, onde, com a ajuda dos diversos animais, irão aprender a conhecer as bactérias e a defender-se daquelas que lhes podem fazer mal.

Na escolha das ideias chave a transmitir, que surgem no livro sobre a forma de regras, foi preciosa a colaboração do Departamento de Riscos Alimentares da ASAE. A título de exemplo, aqui fica a regra da andorinha: “As bactérias são como eu, gostam de viajar. Mas, como não têm asas, apanham boleia de tudo o que lhes toca”.

A higiene e a segurança alimentar são assunto sério, mas a forma de comunicar os riscos não precisa de o ser, nem deve sê-lo, e, após a leitura deste livro, espero que concordem comigo.

Para saber mais sobre a obra podem consultar o meu blog:

<http://procura-de-resposta.blogspot.pt/>

Ficha Técnica:

**Riscos e Alimentos, nº 9
junho 2015**

**Propriedade:
Autoridade de Segurança
Alimentar e Económica
(ASAE)**

**Coordenação Editorial, Edição e Revisão:
Departamento de Riscos
Alimentares e Laboratórios
(DRAL) /UNO**

**Distribuição:
DRAL / UNO**

**Periodicidade:
Semestral**

