

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 coma a designação Halal: Deteção e quantificação de derivados de suíno

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

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> Satellite 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., Skąlecki, 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., Veliöğlu, 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] Bargaen, 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.

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**

