

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: Detecção e quantificação de derivados de suíno

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

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, entre 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')	Amplicação (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	134	[7]
	12SCEQ-R		CGA CC 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.