

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

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* apresentam 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.

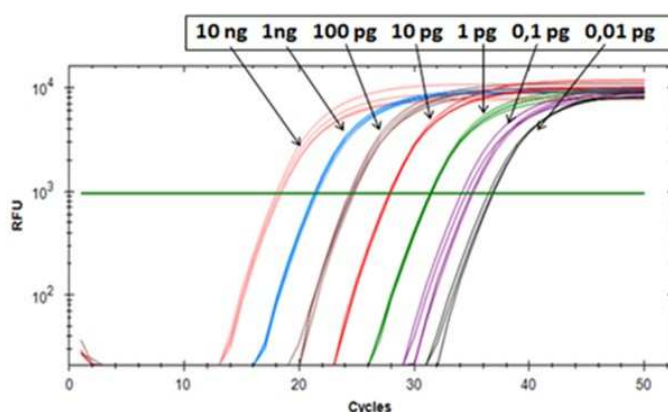


Figura 1. Curvas de amplificação por PCR em tempo real para diferentes quantidades de ADN de porco.

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.

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**

