

# Identificação microscópica e molecular de matérias estranhas em alimentos: detecção de práticas fraudulentas

## Microscopic and molecular identification of foreign matter in food: detection of fraudulent practices

Maria Aparecida Moraes Marciano<sup>1,\*</sup>

Maria Isabel Andrekowisk Fioravanti<sup>II</sup>

Elaine Marra de Azevedo Mazon<sup>II</sup>

Sheila Oliveira de Souza Silva<sup>III</sup>

Paulo Eduardo Brandão<sup>III</sup>

Simone de Carvalho Balian<sup>III</sup>

### RESUMO

**Introdução:** Uma das mais frequentes demandas da análise microscópica de alimentos são denúncias de consumidores que encontram matérias estranhas macroscópicas ou suspeitam da presença de ingredientes não declarados no rótulo do produto. A detecção de subprodutos e matérias estranhas em alimentos é uma prática fundamental para verificar indiretamente as boas práticas na produção de alimentos. **Objetivo:** Este estudo relata o processo de identificação microscópica e molecular (PCR) de matéria estranha encontrada em pastel de carne após queixa de consumidor do município de Itapira, estado de SP, Brasil. **Método:** Dois procedimentos distintos foram empregados para a identificação da matéria estranha: exame macroscópico seguindo padrões estabelecidos pelo FDA e técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação do DNA extraído da matéria estranha. **Resultados:** A análise macroscópica identificou a matéria estranha como sendo papilas gustativas de origem animal, e o teste da PCR confirmou que eram de origem bovina. **Conclusões:** A análise macroscópica e o teste da PCR permitiram a identificação do tipo de matéria estranha e confirmação de sua origem bovina, caracterizando a fraude pelo uso indevido de tecidos inferiores na preparação de pastéis prontos para consumo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Identificação Microscópica; Identificação Molecular; Matérias Estranhas em Alimentos; Práticas Fraudulentas; Controle de Alimentos

### ABSTRACT

**Introduction:** The most frequent demands on microscopic food analysis are allegations of consumers finding macroscopic foreign matter or suspecting the presence of undeclared ingredients on products labels. The detection of byproducts and foreign matter is a fundamental practice for indirectly verifying the conditions of food production. **Objective:** This study reports the processes of microscopic and molecular identification (PCR) of a foreign matter found in a meat pie after a consumer complaint, occurred in the city of Itapira, state of São Paulo, Brazil. **Method:** Two distinct procedures were used to identify the foreign matter: macroscopic examination, following FDA standards, and polymerase chain reaction (PCR) technique to identify DNA extracted from foreign matter. **Results:** The macroscopic analysis identified animal taste buds composing the pie fillings, and the PCR test confirmed that they were of bovine origin. **Conclusions:** Macroscopic analysis and the PCR test allowed the identification of the type of foreign matter and confirmed its bovine origin, which was enough to characterize it as a fraud by the improper use of inferior tissues in the preparation of ready-to-eat pastry.

**KEYWORDS:** Microscopic Identification; Molecular Identification; Foreign Matter in Food; Fraudulent Practices; Food Control

<sup>I</sup> Centro de Alimentos, Instituto Adolfo Lutz (IAL), São Paulo, SP, Brasil

<sup>II</sup> Centro de Laboratório Regional, Instituto Adolfo Lutz (IAL), Campinas, SP, Brasil

<sup>III</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil

\* E-mail: [mamarciano@usp.br](mailto:mamarciano@usp.br)



## INTRODUÇÃO

A Divisão de Produtos Relacionados à Saúde e o Grupo Técnico de Alimentos (Secretaria de Estado da Saúde) atuam na vigilância sanitária com vistas a promover e proteger a saúde da população. A ação conjunta destes órgãos tem como principal objetivo eliminar ou prevenir riscos decorrentes de alimentos que possam causar danos ao consumidor. Para isso, realizam o monitoramento programado da qualidade sanitária de produtos e de estabelecimentos na área de alimentos, bem como respondem às reclamações dos consumidores em casos de denúncias quanto a qualidade e segurança dos alimentos<sup>1</sup>.

No Brasil, o Ministério da Saúde, por meio da Resolução n. 14, de 28 de março de 2014<sup>2</sup>, definiu partes indesejáveis ou impurezas como partes provenientes de vegetais ou de animais que interferem na qualidade do produto, como cascas, pedúnculos, pecíolos, cartilagens, aponeuroses, ossos, penas e pelos animais e partículas carbonizadas do alimento advindas do processamento ou não removidas durante o processo. De acordo com o Ministério da Agricultura, a matéria-prima a ser utilizada no preparo de carne moída deve ser livre de tecidos inferiores como ossos, cartilagens, gordura parcial, aponeuroses, tendões, coágulos e linfonodos (Instrução Normativa n. 83, de 21 de novembro de 2003)<sup>3</sup>. O Decreto n. 9.013, de 29 de março de 2017, Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal - RIISPOA, através do Art. 280, estabelece que as carnes e os miúdos utilizados na elaboração de produtos cárneos devem estar livres de gordura, aponeuroses, linfonodos, glândulas, vesícula biliar, saco pericárdico, papilas, entre outros. Assim, fragmentos de papilas gustativas são considerados partes indesejáveis e por serem definidos como tecidos inferiores não permitidos como ingredientes na fabricação de produtos cárneos. O uso de matéria-prima de má qualidade ou o uso intencional de partes impróprias constitui fraude alimentar<sup>5</sup> e pode implicar em danos econômicos<sup>6</sup> e risco à saúde pública.

O estudo de matéria estranha em alimentos, incluindo sujidades, materiais decompostos e materiais diversos, é recomendado pela Association of Official Analytical Chemists International (AOAC) com a afirmativa de que esses contaminantes podem estar presentes devido a condições, práticas de produção, armazenamento ou distribuição inadequadas. Uma das demandas mais frequentes de análises microscópicas de alimentos vem de consumidores que reconhecem matéria estranha macroscópica em alimentos ou suspeitam da presença de ingredientes que não foram declarados nos rótulos. A detecção de subprodutos e componentes estranhos funciona como uma prática fundamental para a verificação indireta das condições higiênicas de unidades produtoras de alimentos por parte das Vigilâncias Sanitárias, que têm por finalidade reduzir a ocorrência no produto final<sup>8</sup>.

Dessa forma, este relato de experiência apresenta os resultados de uma análise microscópica ordenada e integrada, além da identificação das espécies animais por meio de uma análise molecular para validar as denúncias dos consumidores a respeito de matéria estranha presente nos alimentos.

## MÉTODO

### Coleta de amostras

As amostras referem-se à denúncia de um consumidor feita junto à Vigilância Sanitária de Itapira/SP (VISA) - referente à presença de fragmentos rígidos, estranhos ao conteúdo natural de pastel de carne e suspeita de fragmentos de toucinho suíno. Uma denúncia formal foi registrada na Vigilância no dia 13/1/2016, sendo a fiscalização e o protocolo de coleta das amostras executados no mesmo dia. As amostras foram imediatamente encaminhadas ao Instituto Adolfo Lutz (IAL) - Centro de Laboratório Regional de Campinas III para análise de orientação e, paralelamente, foi aberto um processo pelos técnicos da VISA de Itapira/SP que realizaram vistoria no estabelecimento comercializador do produto e colheram novas amostras em caráter fiscal, complementando a análise de orientação.

### Análise microscópica

Foram avaliadas amostras para fins de orientação de análise fiscal com relação à composição, quantidade, dados de apreensão e outras características, como condições de armazenamento e embalagem inviolável. Posteriormente, foram realizadas investigações de matérias estranhas macroscópicas, seguindo padrões estabelecidos pela Food and Drug Administration (FDA)<sup>9</sup> e pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC)<sup>10</sup>.

As matérias estranhas encontradas, de cor cinza, (Figura 1) foram isoladas em placas de Petri e identificadas utilizando-se um microscópio estereoscópico (ampliação de 30x; Figura 2). Suas características microscópicas foram comparadas aos padrões existentes no Banco de Padrões Microscópicos de Matérias Estranhas do Departamento de Morfologia e Microscopia do Laboratório Central de São Paulo/SP.



Figura 1. Exame macroanalítico da amostra de matéria estranha, mostrando fragmentos cinzentos suspeitos de papilas gustativas de origem animal.

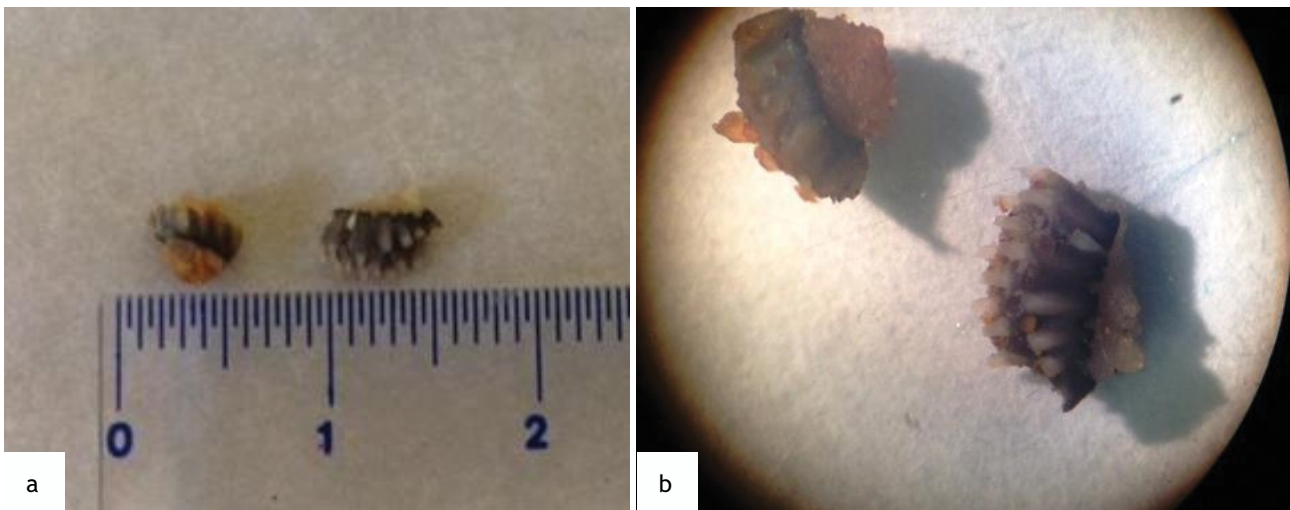


Figura 2. Tamanho dos fragmentos de papilas gustativas encontrados no produto (pastel de carne), observado a olho nu (a) e sob um microscópio estereoscópico (b) com aumento de 30x.

Tabela. Primers para amplificação gênica.

Primer	Gene	Sequências	Tamanho do fragmento	Referências
GAPDH fel S	GAPDH	5 'GCCGTGGAATTTGCCGT 3'	164 bp	Leutenegger CM, 1999 <sup>11</sup>
GAPDH fel AS		5 'GCCATCAATGACCCCTTCAT 3'		
BoV1 S	Cytb	5'GGCTTATATTACGGGTCTTACTACT 3'	279 bp	Bottero et al., 2002 <sup>12</sup>
BoV2 AS		5'GGCAATTGCTATGATGATAAATGGA 3'		

### Análise molecular

Os fragmentos de papila isolados das amostras foram submetidos a pré-tratamento com tripsina-verseno (ATV) para digestão celular e subsequente extração de material genético utilizando kit comercial QIAamp DNA Mini Kit-Qiagen®, EUA. O DNA de um padrão de língua bovina também foi extraído para comparação.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada com o DNA extraído, usando primers para o gene do citocromo b (cytb) de *Bos taurus* e *Bos indicus*<sup>11</sup> e o gene gliceraldeído-3-fosfato felino GAPDH<sup>12</sup>, descrito na Tabela.

Cada reação de amplificação foi realizada num volume de 25 µL contendo 2,5 µL de DNA da amostra, 12,5 µL de Go taq Green Master Mix 2x (Promega, EUA), 7,5 µL de água ultra-pura, 1,25 µL de primer sense e 1,25 µL de primer antissense a uma concentração de 10 pmol/µL. Para GAPDH, o seguinte programa de ciclagem foi usado: desnaturação inicial a 94 °C por 3 min; 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 20 s, anelamento a 55 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 30 s; e extensão final de 72 °C por 7 min. Para Cytb, foi utilizado o seguinte programa de ciclagem: desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos; 39 ciclos de 94 °C durante 30 s, anelamento a 60 °C durante 30 s e 72 °C durante 45 s; e extensão final a 72 °C por 10 min.

O produto foi purificado diretamente da banda única amplificada obtida em gel de agarose usando ExoSap (Ge Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos purificados foram submetidos a sequenciamento bidirecional, utilizando o Big Dye™ v 3.1 e o sequenciador automatizado ABI-3500® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Os cromatogramas obtidos para cada sequência de fita de DNA de cada amostra foram submetidos à aplicação de Phred online (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) para avaliação de sua qualidade. Apenas posições com pontuação maior que 20 (menor que 1% de probabilidade de erro) foram utilizadas e os cromatogramas também foram verificados manualmente com o programa BioEdit versão 7.2.5 e submetidos ao BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

## RESULTADOS

### Análise microscópica

Um exame macroscópico minucioso revelou a presença de fragmentos de papilas gustativas sugestivos de espécies animais (Figura 2). Segundo a legislação vigente, a presença de papilas, consideradas um tecido inferior, configura uma irregularidade.

Como o tamanho das papilas encontradas nas amostras era pequeno em comparação com o padrão de língua bovina, havia

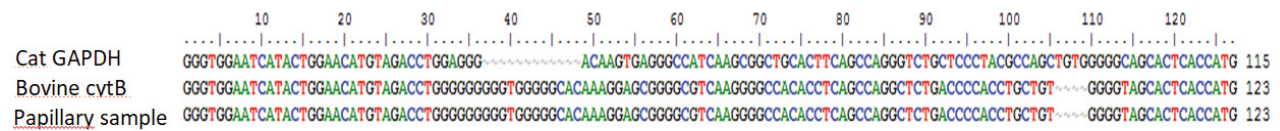


Figura 3. Alinhamento nucleotídico dos genes GAPDH de gato e do citocromo B bovino (cytB) e da sequência obtida após PCR para a amostra papilar, evidenciando sua similaridade com a de bovinos.

a possibilidade de as papilas serem de origem felina. Assim, as papilas gustativas foram encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular (Labmas) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), a fim de identificar as espécies pela PCR.

### Análise molecular

Como pode ser visto na Figura 3, a sequência de gene da PCR das amostras da papila gustativa revelou homologia com uma sequência genotípica do genótipo do citocromo B (cytB) bovino disponível no GenBank. Para o alinhamento, foi utilizado o programa Clustal W da BioEdit, versão 7.0.9 (1997-2007, Tom Hall, Ibis Biosciences Carlsbad, CA, EUA).

## DISCUSSÃO

A análise microscópica identificou os tecidos inferiores (papilas gustativas) utilizados como parte do recheio do salgado de carne bovina, e a PCR confirmou a origem bovina desse material, indicando que não havia relação com espécies felinas.

De acordo com o RIISPOA, Decreto n. 9.013/2017<sup>4</sup>, o uso de tecidos inferiores de origem animal é uma ação ilícita e fraudulenta, bem como uma falha das boas práticas na fabricação de alimentos<sup>13</sup>, exigindo notificação e ações apropriadas da Vigilância Sanitária local.

Denúncias de condições inadequadas e suspeitas pelos consumidores são práticas importantes que ajudam as agências oficiais a identificar irregularidades e fatores de risco para a população<sup>14</sup>, tomando as medidas cabíveis, que envolvem ações educacionais, punitivas, apreensão, interdição e comunicação de risco, nos níveis locais, regionais e nacionais<sup>15</sup>.

A PCR vem se mostrando uma ferramenta útil na detecção e caracterização de matéria estranha em alimentos e água. No entanto, apesar da disponibilidade de diferentes métodos para obtenção de ácidos nucleicos, a complexidade das diferentes matrizes alimentares dificulta a extração do material genético para análise. Assim, foram desenvolvidos e testados diferentes métodos de extração para aplicação na rotina laboratorial, seja para a identificação de genótipos em componentes de alimentos ou para a investigação de matéria estranha. Neste estudo, o uso de tripsina associada a versene (ATV) no pré-tratamento da amostra permitiu um bom desempenho de extração, auxiliando na digestão do tecido e garantindo

resultados confiáveis, confirmando a presença de DNA bovino e ausência de DNA felino.

O sucesso neste caso foi possível devido ao desempenho sinérgico da Vigilância Sanitária de Itapira/SP, do IAL e dos Labmas da VPS da FMVZ/USP. Aplicando suas respectivas especialidades, esta ação conjunta permitiu a confirmação da ação ilegal do produtor do alimento. Este trabalho é um exemplo prático que demonstra que o conhecimento técnico aplicado em conjunto com as ações dos serviços oficiais dedicados à salvaguarda da saúde pública permite ao Estado cumprir seu papel de garantir o direito e a dignidade humana relativos a uma alimentação segura e saudável.

Em uma revisão, Tibola et al. (2018) demonstraram que os tipos de adulterações prevalentes no Brasil foram diluição e substituição intencional de ingredientes, a fim de obter vantagens econômicas. Os produtos alimentícios à base de leite, carne e peixe são os principais alvos de fraudes e adulterações, sendo o leite, os derivados lácteos e os óleos vegetais os que tiveram a maior incidência de adulterações no Brasil entre 2007 e 2017. No entanto, casos de fraude e adulteração em diferentes tipos de alimentos são relatados na literatura científica, sendo que incidentes menores são tipicamente relatados apenas na mídia. Além disso, a subnotificação de fraude e adulteração de alimentos é comum, especialmente quando os efeitos adversos à saúde são crônicos, com evidências pouco claras de causa e efeito. As adulterações intencionais, deliberadamente projetadas para evitar sua detecção, também são difíceis de serem relatadas em periódicos acadêmicos<sup>16</sup>.

## CONCLUSÕES

Conforme estabelecido pela legislação nacional vigente, a presença de papilas gustativas bovinas em produtos prontos para consumo é uma fraude relacionada ao uso indevido de tecidos inferiores como matéria-prima no preparo da carne moída.

A análise microscópica permitiu a identificação das papilas gustativas e a PCR confirmou a origem bovina das papilas gustativas encontradas nas amostras de carne obtidas para fins de análise de orientação e fiscal, com base na denúncia do consumidor.

A ação ordenada e integrada de diferentes especialidades técnicas permitiu uma ação rápida e eficiente na elucidação de matéria estranha em alimentos prontos para consumo (carnes) a partir do caso de uma denúncia de consumidor no município de Itapira/SP.





## REFERÊNCIAS

1. São Paulo (Estado). Secretaria de Estado da Saúde. Centro de Vigilância Sanitária. Alimentos. São Paulo: Centro de Vigilância Sanitária; 2017[access 2017 May 12]. Available from: [http://www.cvs.saude.sp.gov.br/apresentacao.asp?te\\_codigo=1/](http://www.cvs.saude.sp.gov.br/apresentacao.asp?te_codigo=1/)
2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Resolução-RDC Nº 14, de 28 de março de 2014. Dispõe sobre matérias estranhas macroscópicas e microscópicas em alimentos e bebidas, seus limites de tolerância e dá outras providências. Diário Oficial União. 31 mar 2014.
3. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BR). Instrução Normativa Nº 83, de 21 de novembro de 2003. Aprovar os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de carne bovina em conserva (corned beef) e carne moída de bovino. Diário Oficial União. 3 dez 2003.
4. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BR). Decreto Nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei Nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei Nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Diário Oficial União. 30 mar 2017.
5. Menezes Junior JBF. Investigations into the microscopic examination of some food substances. Rev Instituto Adolfo Lutz. 1949;9(1/2):18-77.
6. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - Inmetro, Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial - ABDI. Estudo da cadeia de alimentos: mecanismos de acesso ao mercado da EU. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia; 2009[access 2017 May 18]. Available from: [http://www.inmetro.gov.br/barreirastecnicas/pdf/Estudo\\_alimentos.pdf](http://www.inmetro.gov.br/barreirastecnicas/pdf/Estudo_alimentos.pdf)
7. Ministério da Saúde (BR) Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria SVS/MS Nº 326, de 30 de julho de 1997. Aprovar o Regulamento Técnico “Condições Higiênicas Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos”, conforme Anexo I. Diário Oficial União. 8 Jan 1997.
8. Marciano MAM, Silva AM, Nogueira MD, Soares JS, Mattos EC, Zorzenon FJ et al. Manual Técnico para a Pesquisa de Matérias Estranhas-(Volume I) -Farinhas, massas, produtos de panificação e derivados de cereais. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz - Núcleo de Morfologia e Microscopia, 2014.
9. U. S. Food & Drug Administration - FDA. Macroanalytical procedures manual: 1984. Washington, DC: U. S. Food & Drug Administration; 1988[access 2017 May 12] Available from: <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006953.htm>
10. Latimer G. Official methods of analysis of AOAC International. 20th ed. Rockville, MD: AOAC International; 2016.
11. Bottero MT, Civera T, Anastasio A, Turi RM, Rosati S. Identification of cow's milk in “buffalo” cheese by duplex polymerase chain reaction. J Food Prot. 2002;65(2):362-6.
12. Leutenegger CM, Mislin CN, Sigrist B, Ehrenguber MU, Hofmann-Lehmann R, Lutz H. Quantitative real-time PCR for measurement of feline cytokine mRNA. Vet Immunol Immunopathol. 1999;71(3-4):291-305. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(99\)00100-2](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(99)00100-2)
13. U. S. Food & Drug Administration - FDA. The food defect action levels: levels of natural or unavoidable defects in foods that present no health hazards for humans. Washington, DC: U. S. Food & Drug Administration; 2005 [access 2017 Jun 7]. Available from: <http://www.fda.gov/food/foodborneillnesscontaminants/ucm083891.htm/>
14. Rodrigues RMM, Nogueira MD. Fiscalização de alimentos por análise microscópica em vigilância sanitária. In: Muradian LBA, Penteado MDVC. Tópicos sobre legislação e análise de alimentos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007. p. 72-80.
15. Silva Junior EA. Manual de controle higiênico sanitário em serviços de alimentação. 7a ed. São Paulo: Varela; 2014.
16. Tibola CS, Silva SA, Dossa AA, Patrício DI. Economically motivated food fraud and adulteration in Brazil: incidents and alternatives to minimize occurrence. J Food Sci. 2018;83(8):2018-38. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14279>

### Conflict of Interest

Authors have no potential conflict of interest to declare, related to this study's political or financial peers and institutions.



This publication is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported license. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.pt>.