

1 2 9 0



UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Maria Isabel Luís Monte

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DO ATUM FRESCO EM *SASHIMI*
DE *TAKE AWAY*: DETEÇÃO DE PARASITAS,
NITRATOS E NITRITOS**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar orientada pela Professora Doutora Angelina Pena e pela Professora Doutora Maria do Céu Sousa, apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2022

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Maria Isabel Luís Monte

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DO ATUM FRESCO EM *SASHIMI* DE
TAKE AWAY: DETEÇÃO DE PARASITAS,
NITRATOS E NITRITOS**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar orientada pela Professora Doutora
Angelina Pena e pela Professora Doutora Maria do Céu Sousa, apresentada à Faculdade de
Farmácia da Universidade de Coimbra

Coimbra, setembro de 2022

*“A questão não é atingir a perfeição, mas sim a
totalidade.” Carl Gustav Jung*

Agradecimentos

Gostaria de manifestar os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles, que, direta e indiretamente, me auxiliaram no decorrer desta etapa e possibilitaram que esta dissertação se concretizasse.

Às minhas orientadoras, a Professora Doutora Angelina Pena e a Professora Doutora Maria do Céu Sousa, pela orientação, dedicação e disponibilidade no decorrer deste percurso.

Aos profissionais do laboratório da ALS Global, sito em Tondela, pelo tempo despendido, auxílio manifestado e conhecimentos transmitidos.

Às auxiliares dos laboratórios de bromatologia e parasitologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC), pela colaboração, apoio e boa disposição, que foram fundamentais no decorrer do desenvolvimento da componente laboratorial.

Ao meu círculo de amigos pelos momentos de diversão, desabafo, reconforto e pela motivação transmitida.

Aos meus tios e primos, Magna, Maria João, João Barata, João Francisco e Luís que, desde sempre, foram e são um grande porto de abrigo.

Às minhas avós, Lucinda, e à mais recente estrelinha, Irene, que me educaram e sempre demonstraram que a persistência é o caminho para o sucesso.

Aos meus anjinhos da guarda, avô Luís e avô Monte, pela proteção ao longo destes anos e fonte de inspiração.

Aos meus dois grandes pilares, Maguie e Joana, por serem diariamente pessoas-luz na minha vida. Grata pela amizade, amor, paciência e carinho que todos os dias me transmitem.

Aos meus queridos pais, Noélia e Jana, que foram e são o maior suporte da minha vida e os grandes responsáveis pela conclusão desta dissertação. Sempre acreditaram no meu potencial quando as inseguranças se manifestaram e nunca me deixaram cruzar os braços perante os obstáculos.

A todos estes e muitos outros, Obrigada!

Índice

Agradecimentos	i
Índice de Tabelas	iv
Índice de Figuras	iv
Abstract	vi
Abreviaturas, siglas e símbolos	vii
Objetivo	x
Capítulo I. Introdução	1
1. Segurança Alimentar	2
1.1. Doenças causadas pela ingestão de alimentos	2
2. Pescado.....	3
2.1. Consumo de produtos da pesca e aquacultura na União Europeia e em Portugal	4
3. Sushi e Sashimi.....	5
3.1. Relação entre os portugueses e o consumo de Sushi e Sashimi	7
4. Atum.....	8
4.1. Consumo de Atum na União Europeia e em Portugal	9
Capítulo II. Detecção dos parasitas Anisakis e Diphyllbothrium latum no Sashimi de Atum Fresco.....	11
1. Parasitas no pescado	12
1.2. Risco de parasitismo em Sushi e Sashimi	12
2. O parasita Anisakis e a anisquiose.....	13
2.1. Anisakis no pescado	16
2.2. Casos clínicos de Anisakis após ingestão de pescado cru	17
3. O parasita Diphyllbothrium latum e a difilobotriose.....	20
3.1. Diphyllbothrium latum no pescado.....	22
3.2. Casos clínicos de Diphyllbothrium latum após ingestão de pescado cru.....	22
4. Enquadramento Legal de produtos de pesca e parasitas	24
5. Pesquisa de parasitas em pescado e produtos da pesca: revisão de métodos	25
6. Materiais e Métodos.....	27
6.1. Caracterização e processamento das amostras.....	27
6.2. Análise por Observação Visual Direta e método de Candling com luz Ultravioleta	28
6.3. Análise morfológica com o auxílio de microscópio.....	29
6.4. Análise molecular por PCR.....	29
7. Resultados e Discussão	30
Capítulo III. Fraude Alimentar: Detecção de Nitratos e Nitritos no Sashimi de Atum..	37
1. Nitratos e Nitritos	38

2.	Toxicidade dos Nitratos e Nitritos	41
3.	Enquadramento Legal de Aditivos Alimentares (Nitratos e Nitritos).....	44
4.	Fraude Alimentar.....	46
4.1.	Fraude alimentar no Pescado	50
4.2.	Fraude Alimentar por adição de Nitratos e Nitritos em Atum	51
4.2.1.	Ocorrências.....	52
4.2.2.	Operações e Auditorias a nível da UE.....	56
5.	Metodologias Analíticas: revisão	60
5.1.	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC)	60
5.2.	Comparação entre metodologias analíticas	60
6.	Validação de um Método Analítico	62
6.1.	Validação Indireta	63
6.1.1.	Especificidade/Seletividade	63
6.1.2.	Quantificação.....	64
6.1.2.1.	Sensibilidade	64
6.1.2.2.	Curva de Calibração/Linearidade.....	65
6.1.2.3.	Limiares analíticos de deteção e quantificação	66
6.1.2.4.	Gama de Trabalho.....	66
6.1.3.	Precisão	67
6.1.3.1.	Repetibilidade	67
6.1.3.2.	Precisão Intermédia.....	67
6.1.3.3.	Reprodutibilidade	68
6.1.4.	Exatidão.....	68
6.1.5.	Robustez.....	69
7.	Material e Métodos	69
7.1.	Caracterização e processamento das amostras.....	69
7.2.	Preparação das Amostras em laboratório	72
7.3.	Extração e Filtração.....	72
7.4.	Preparação das soluções padrão de calibração.....	73
7.5.	Análise por UPLC-PDA.....	73
8.	Resultados e Discussão	73
	Capítulo IV. Conclusões e Considerações Finais.....	76
	Referências Bibliográficas	80
	Anexos.....	93

Índice de Tabelas

Tabela 1. Identificação e caracterização das amostras de sashimi.....	27
Tabela 2. Resultados da observação direta e confirmação por luz UV para detecção de parasitas	32
Tabela 3. Tabela Síntese Fraude Alimentar (Adaptado de European Commission, 2017).....	52
Tabela 4. Métodos utilizados para determinar nitratos e nitritos em pescado e produtos de pesca ..	61
Tabela 5. Tabela de Conversão de Código de Identificação das Amostras	70

Índice de Figuras

Figura 1. Consumo anual per capita de atum na UE (2010-2019) (Adaptado de European Market Observatory for Fisheries and Aquaculture Products, 2021)	9
Figura 2. Ciclo de vida de Anisakis (Adaptado de Lopes, 2018).....	14
Figura 3. Imagem da endoscopia onde se observa o parasita Anisakis (Adaptado de Carmo, Marques, Bispo, & Serra, 2017).....	18
Figura 4. Imagens da endoscopia apresentado corpos larvares de Anisakis (Adaptado de Bernardo & Castro-Poças., 2018)	18
Figura 5. Imagem da gastroscopia, identificando Anisakis simplex (Adaptado de Kondo, 2018).....	19
Figura 6. Visualização de um nematode num EGD (Adaptado de Yamada & Ohwada, 2020)	19
Figura 7. Ciclo de vida de Diphyllbothrium latum (Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (CDC))	21
Figura 8. Ovo de Diphyllbothrium latum (Adaptado de Santos & Faro, 2005)	23
Figura 9. Ovo de Diphyllbothrium latum (Adaptado de Cavalcanti, Fíliá, & Crotti, 2004)	23
Figura 10. Proglotes de Diphyllbothrium (Adaptado de Capuano, Okino, Mattos, & Torres, 2007) ..	24
Figura 11. Ovos de Diphyllbothrium latum (Adaptado de Capuano, Okino, Mattos, & Torres, 2007) ..	24
Figura 12. Prensagem da amostra de sashimi de atum	29
Figura 13. Observação da amostra prensada de sashimi de atum sob luz UV no transiluminador	29
Figura 14. Amostras estabelecimento 10 (1ª recolha)	31
Figura 15. Amostras estabelecimento 10 (2ª recolha).....	31
Figura 16. Amostras estabelecimento 9.....	31
Figura 17. Elemento isolado da amostra P06#3.4 de sashimi de atum com 2 cm de comprimento ...	33
Figura 18. Critérios operacionais para detecção de Fraude Alimentar (Adaptado de Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, n.d.).....	47
Figura 19. Equipamento de trituração	71
Figura 20. Amostras filtradas	72
Figura 21. Resultado relatório detecção de Nitratos e Nitritos	73

Resumo

Num mundo globalizado onde se registam enormes influências nas preferências e hábitos alimentares, a culinária japonesa popularizou-se através do consumo de pratos preparados à base de pescado cru, como o *sushi* e o *sashimi*. Colocam-se, assim, questões relacionadas com a segurança alimentar, em particular pelo impacto que possam ter na saúde pública. Os casos clínicos reportados de parasitoses, relacionados ao consumo de *sushi* e *sashimi*, e as notificações de fraude alimentar por adição de nitratos e nitritos no atum têm sido relatadas de forma corrente em vários países, incluindo Portugal.

A investigação desenvolvida teve como objetivo a “Avaliação da Segurança do Atum Fresco em *Sashimi* de *Take Away*: Detecção de Parasitas, Nitratos e Nitritos”, através da análise parasitológica de deteção e identificação de *Anisakis* e *Diphyllobothrium latum*, complementada com a análise química de deteção de nitratos e nitritos, a fim de averiguar se este alimento é alvo de contaminação parasitológica e/ou fraude alimentar, pondo em causa a saúde dos consumidores.

As amostras de *sashimi* de atum foram adquiridas em 2021, em 13 estabelecimentos de *take away* de gastronomia japonesa, pertencentes ao concelho de Coimbra. Da análise parasitológica para a deteção e identificação de *Anisakis* e *Diphyllobothrium latum*, utilizando-se o método de observação visual direta com recurso ao “*Candling*” e PCR, concluiu-se que, não foi identificado qualquer tipo de contaminação parasitológica. No controle da fraude alimentar foi realizada a determinação de nitratos e nitritos com recurso à metodologia UPLC-PDA, de acordo com a norma EN 12014-4 de 2005, e concluiu-se não existir adição destes dois compostos às amostras em estudo.

Os resultados são positivos na ótica da Qualidade e Segurança Alimentar, da proteção da saúde do consumidor e, consequentemente, da saúde pública.

No âmbito da fraude alimentar no atum, em trabalhos futuros será importante obter mais informação sobre os níveis de histamina no atum, e a realização da análise colorimétrica, de modo a uma avaliação mais precisa da cor do atum.

Identifica-se como necessário promover, progressivamente, adaptações e alterações específicas na legislação nacional para acompanhar a evolução dos hábitos de consumo nacional, sendo igualmente fundamental continuar a promover e apoiar a investigação nestes domínios, no sentido da promoção da Segurança Alimentar.

Palavras-Chave: Segurança Alimentar; *Sashimi*; Atum; Parasitas; Fraude Alimentar;

Abstract

In a globalized world where there are huge influences on food preferences and habits, Japanese cuisine has become popular through the consumption of dishes prepared with raw fish, such as sushi and sashimi. Thus, questions related to food safety arise, in particular due to the impact they may have on public health. The reported clinical cases of parasitosis, related to the consumption of sushi and sashimi, and the notifications of food fraud due to the addition of nitrates and nitrites in tuna have been reported regularly in several countries, including Portugal.

The research carried out aimed at “Safety Assessment of Fresh Tuna in Take Away Sashimi: Detection of Parasites, Nitrates and Nitrites”, through parasitological analysis of detection and identification of *Anisakis* and *Diphyllobothrium latum*, complemented with chemical analysis of detection of nitrates and nitrites, in order to determine whether this food is the target of parasitological contamination and/or food fraud, jeopardizing the health of consumers.

The sashimi samples of tuna were acquired in 2021, in 13 take away establishments of Japanese cuisine, belonging to the municipality of Coimbra. From the parasitological analysis for the detection and identification of *Anisakis* and *Diphyllobothrium latum*, using the direct visual observation method using Candling and PCR, it was concluded that no type of parasitological contamination was identified. Also, for the same establishments and samples, through chemical analysis using the UPLC-PDA methodology in accordance with standard EN 12014-4 of 2005 for the detection of nitrates and nitrites, it was concluded that there was no fraud resulting from the addition of these two compounds to the samples.

The results are positive in terms of Quality and Food Safety, in consumer health protection and, consequently, public health.

It is accepted that, in the chemical analysis, it would be a good extension to add two complementary analyses, a colorimetric analysis, verifying the accuracy of the colors of the samples and the determination of the levels of histamine, indicator of the deterioration of the fish. By crossing these parameters, the results would be more assertive and rigorous.

It is identified as necessary to progressively promote adaptations and specific changes in national legislation to accompany the evolution of national consumption habits, and it is equally essential to continue to promote and support research in these areas, in the sense of promoting Food Safety.

Key words: Food Safety; Sashimi; Tuna; Parasites; Food Fraud.

Abreviaturas, siglas e símbolos

AAC	<i>Administrative Assistance and Cooperation System</i>
ACN	<i>Alert and Cooperation Network</i>
ADI	<i>Acceptable daily intake</i>
ASAE	<i>Autoridade de Segurança Alimentar e Económica</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CE	<i>Comissão Europeia</i>
CEE	<i>Comunidade Económica Europeia</i>
CO	<i>Monóxido de Carbono</i>
DGAV	<i>Direção-Geral de Alimentação e Veterinária</i>
DGCCRF	<i>Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes</i>
DG SANTE	<i>Directorate-General for Health and Food Safety</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DTA	<i>Doenças Transmitidas pelos alimentos</i>
ECZ	<i>Eletroforese capilar</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EGD	<i>Esofagogastroduodenoscopia</i>
EM	<i>Estados-Membros</i>
ESA	<i>European Free Trade Association Surveillance Authority</i>
EUROPOL	<i>European Union's law enforcement agency</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FASFC	<i>Federal Agency for the Safety of the Food Chain</i>
FE	<i>Fase Estacionária</i>
Fe	<i>Ferro</i>
FFUC	<i>Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra</i>
FM	<i>Fase Móvel</i>
FNN	<i>Food Fraud Network</i>
g	<i>grama</i>
GC-MS	<i>Cromatografia gasosa - espectrometria de massa</i>
GFSI	<i>Global Food Safety Initiative</i>
GTI	<i>Gabinete de Trocas Intracomunitárias</i>
HA	<i>Hospedeiro Acidental</i>

HAP	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
Hb	Hemoglobina
HD	Hospedeiro Definitivo
HI	Hospedeiro Intermediário
HPIEC-Q- Exactive	Cromatografia de Troca Iónica de alto desempenho com o método Q- Exactive
HPIEC-SCD	Cromatografia de Troca Iónica de alto desempenho com condutividade suprimida
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HT	Hospedeiro de Transporte
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC	Cromatografia Iónica
INTERPOL	<i>The International Criminal Police Organization</i>
IPAC	Instituto Português de Acreditação
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
JECFA	<i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i>
Kcal	Quilocalorias
Kg	Quilogramas
KJ	Quilojoules
l	litro
LD	Limite de Deteção
LQ	Limite de Quantificação
metHB	Metahemoglobina
mL	Mililitro
mg	Miligramas
N	Azoto
N₂O	Óxido Nitroso
NDMA	N-nitrosodimetilamina
NDEA	N-nitrosodietilamina
NMOR	N-nitrosomorfolina
NO	Óxido Nítrico
NO₂-	Nitrito
NO₃-	Nitrato

NOEL	<i>No Observed Effect Level</i>
NPIP	N-nitrosopiperidina
NPYR	N-nitrosopirrolidina
O	Oxigénio
PCB	Bifenilos policlorados
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PNCA	Plano Nacional de Colheita de Amostras
RASFF	<i>Rapid Alert System for Food and Feed</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
SCF	<i>Scientific Committee on Food</i>
TAC	Tomografia Axial Computadorizada
UE	União Europeia
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
UV	Ultravioleta
μmol	Micromole
μg	Micrograma

Objetivo

Portugal é considerado, atualmente, o país com maior consumo de produtos de pesca e aquacultura da União Europeia (UE), sendo o atum, o peixe com maior consumo *per capita*. Este é consumido maioritariamente através de conservas de atum, contudo alguns estudos apontam que o atum consumido em forma de *sushi* e *sashimi* é uma prática comum em vários países, incluindo Portugal. Reconhece-se que, atualmente, as sociedades tendem a registar influências irreversíveis nos valores culturais, nos padrões de comportamento e nos hábitos alimentares. Tendo a culinária milenar japonesa como exemplo, hoje é cada vez mais frequente, nos hábitos alimentares, o consumo de pratos preparados à base de pescado cru, nomeadamente o *sushi* e o *sashimi*.

Atendendo ao crescente número de ocorrências a nível mundial e nacional de práticas fraudulentas por adição de nitratos e nitritos ao atum, muitas das vezes utilizados no *sashimi* e aos sucessivos casos clínicos que correlacionam a anisakirose e a difilobotriose à ingestão de *sashimi*, torna-se crucial desenvolver investigação nesta área. A pertinência desta investigação é elevada dado o escasso número de estudos científicos que referenciam estas problemáticas.

Posto isto, o presente trabalho teve por objetivo a “Avaliação da Segurança do Atum Fresco em *Sashimi* de *Take Away*: Detecção de Parasitas, Nitratos e Nitritos” e pretendeu ser um contributo para o conhecimento das condições de segurança alimentar em que se processa esta oferta gastronómica, na área geográfica do concelho de Coimbra, Portugal. A avaliação foi realizada mediante uma análise parasitológica de deteção e identificação de *Anisakis* e *Diphyllobothrium latum* e através de uma análise química para quantificação de nitratos e nitritos.

Capítulo I. Introdução

I. Segurança Alimentar

O conceito de Segurança Alimentar surgiu no início do século XX, na Europa, durante a Primeira Guerra Mundial, tendo emergido da preocupação em assegurar a autarcia alimentar dos países, produzir alimentos suficientes para a sua população e evitar situações de vulnerabilidade face ao exterior (Burity, et al., 2010).

Atualmente o conceito é muito mais amplo e, segundo a *Codex Alimentarius* (2013), a Segurança Alimentar é considerada a área que assume a garantia de que os alimentos não provocarão danos ao consumidor quando são preparados ou ingeridos de acordo com a sua utilização prevista. Os géneros alimentícios devem ser isentos de qualquer tipo de perigo de natureza física (ossos, espinhas, vidros, metal, pedras e plásticos), química (contaminantes de origem industrial e ambiental, resultantes do processamento alimentar, da presença de resíduos de pesticidas, medicamentos veterinários, aditivos alimentares e outros), biológica (bactérias, vírus, parasitas e priões) e nutricional (sal, gordura e açúcar em excesso e alergénios) (Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, n.d.).

I.1. Doenças causadas pela ingestão de alimentos

Mais de 200 doenças são causadas pela ingestão de géneros alimentícios contaminados através de bactérias, vírus, parasitas ou substâncias químicas. Estas podem causar apenas ligeiras indisposições ou, no pior cenário, serem fatais. A contaminação dos alimentos pode ocorrer em qualquer etapa, desde a sua produção até ao seu consumo final (Codex Alimentarius, 2013; World Health Organization, n.d.).

Anualmente, em média, 1 em cada 10 pessoas no mundo (cerca de 600 milhões de pessoas) adoece e 420.000 morrem após ingerir alimentos contaminados. Das mortes assinaladas, 40%, (125.000 mortes) estão associadas a crianças com idade inferior a 5 anos (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2019).

As doenças transmitidas pelos alimentos (DTA) são, de forma crescente, um grande problema de saúde pública a nível mundial e cada vez mais a sociedade revela preocupação com a prevenção das mesmas e com o cumprimento das normas e legislação no âmbito da segurança alimentar (World Health Organization, n.d.).

Assim, e para salvaguardar os direitos dos consumidores no âmbito da segurança alimentar, foram surgindo organismos públicos e grupos de trabalho que estabelecem normas e regulamentação alimentar (Pereira, 2016).

2. Pescado

O pescado é um termo que engloba peixes, crustáceos (camarão, siri, caranguejo) e mariscos (ostra, mexilhão, polvo, lula). É uma matéria-prima, cujo interesse aumentou nos últimos anos, representando um alimento fundamental na dieta da população mundial (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2020).

O pescado e os produtos de pesca contêm amplos benefícios nutricionais devido aos seus componentes naturais e por serem de fácil digestibilidade. Estes contêm ácidos gordos polisaturados (Ómega 3), proteínas com alto valor nutricional, aminoácidos essenciais (cisteína, glutamina, hidroxiprolina, prolina, taurina), peptídeos bioativos, minerais essenciais, tais como cálcio, selénio, ferro e zinco e ainda vitaminas hidrossolúveis e lipossolúveis (B3,B6,E,D) (Daschner, 2016).

Considerando os seus benefícios, a *European Food Safety Authority* (EFSA) recomenda duas refeições (150g) semanais de pescado ou produtos de pesca para assegurar o consumo completo dos nutrientes essenciais ao ser humano (European Food Safety Authority, 2014).

Apesar do consumo de pescado acarretar muitos benefícios para a saúde humana, não se podem descartar os seus potenciais riscos. O pescado, devido à sua composição, é um dos géneros alimentícios mais suscetíveis à deterioração e conseqüentemente à contaminação biológica, pois se a manipulação e conservação não for adequada, desde a captura até ao consumo final, este irá ser alvo de proliferação de microorganismos patogénicos e parasitas (Société Générale de Surveillance, 2017).

Sabe-se que, cada vez mais, os problemas relacionados com a contaminação ambiental provocada maioritariamente por atividades antrópicas, têm contribuído para a contaminação química do pescado, que quando ingerido pelo ser humano pode ser prejudicial (ECsafeSEAFOOD, 2017).

Os contaminantes químicos de maior relevância no pescado, provenientes de diversas origens são: biotoxinas marinhas; metais pesados; resíduos farmacológicos; pesticidas;

dioxinas; micotoxinas; histamina; estanho; hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP); bifenilos policlorados (PCB); e toxinas de origem bacteriana (Cruz, Rocha, & Mateus, 2015).

Para além dos contaminantes, substâncias não adicionadas de forma intencional ao alimento, os aditivos alimentares, intencionalmente adicionados, têm sido cada vez mais utilizados de forma irresponsável e ilegal/fraudulenta no pescado, com o intuito de mascarar a real qualidade do mesmo, pondo em risco a saúde dos consumidores.

2.1. Consumo de produtos da pesca e aquacultura na União Europeia e em Portugal

Relativamente ao consumo de produtos de pesca e aquacultura na União Europeia (UE), considerando os dados atuais, concluiu-se que em 2019 o consumo *per capita* diminuiu comparativamente a 2018 e 2017. Atualmente, o consumo anual por pessoa, na UE, é de 23,97 kg. Note-se que este valor diminuiu 390 g em relação ao ano de 2018, apresentando-se como o menor valor de consumo *per capita* da década. A queda deste valor foi impulsionada pela diminuição das capturas efetuadas (European Market Observatory for Fisheries and Aquaculture Products, 2021).

Portugal em 2018, foi considerado o país da UE com o segundo maior consumo de produtos da pesca e aquacultura, apresentando um valor anual de 60,92 kg por pessoa, sendo que na sua frente se apresentava Malta com um valor anual de 85,95 kg por pessoa (European Market Observatory for Fisheries and Aquaculture Products, 2020).

Os últimos dados referentes ao ano de 2019 referem que, apesar do consumo anual *per capita* ter diminuído, Portugal destacou-se como o principal consumidor de produtos da pesca e da aquacultura da UE, com um valor anual de 59,91 kg por pessoa. O consumo diminuiu 2% relativamente a 2018, justificado pela diminuição das importações e aumento das exportações. É crucial referir que os dados de Malta não foram utilizados neste relatório por não permitem a obtenção de estimativas precisas (European Market Observatory for Fisheries and Aquaculture Products, 2021).

Considerando os dados facultados pela Balança Alimentar Portuguesa (BAP), identificada como uma ferramenta de consulta de informações relativas ao padrão de abastecimento alimentar em Portugal, indicativas de uma medida de consumo aparente do ponto de vista da oferta de alimentos, no quinquénio de 2016-2020, a oferta do pescado aumentou 16.3% e

alcançou o valor de 62,7 g/hab/dia equivalente a 22,8 kg/hab/ano. Os valores foram superiores às disponibilidades apuradas em 2012-2015, nomeadamente, 53,9 g/hab/dia equivalente a 19,7 kg/hab/ano. Contudo, 2020, registou-se o valor mais baixo do quinquénio com um valor de 59,6 g/hab/dia, referente a 21,8 kg/hab/ano (Instituto Nacional de Estatística, 2021).

No período entre 2016 e 2018, as disponibilidades diárias de pescado para consumo aumentaram 5,8%, seguindo-se um decréscimo de 9,0% entre 2018 e 2020, o que refletiu o decréscimo sustentado de 10,8% das importações de pescado entre 2017 e 2020 e o aumento da produção nacional em 2018 (+9,2%). No ano de 2020, face a 2019, tanto a produção nacional como as importações de pescado decresceram (-18,9% e -4,0%, respetivamente). A variação na produção foi motivada pelo decréscimo das capturas de pescado pela frota nacional (-13,1%) devido à situação pandémica, em particular as capturas em águas nacionais, quer pela paragem das embarcações em terra quer por falta de mercado pelo encerramento dos estabelecimentos da restauração. Uma das consequências da menor produção de pescado em 2020 foi a diminuição das exportações em 11,1% (Instituto Nacional de Estatística, 2021).

De assinalar que Portugal tem um grau de autoaprovisionamento baixo em pescado (29,7%, em média, entre 2016 e 2020), pelo que as disponibilidades para consumo dependem largamente das importações (Instituto Nacional de Estatística, 2021).

3. *Sushi e Sashimi*

No mundo globalizado em que vivemos, impulsionado pela velocidade de circulação da informação, as sociedades tendem a registar influências irreversíveis nos valores culturais, nos padrões de comportamento e nos hábitos alimentares. Tendo a culinária milenar japonesa como exemplo. Hoje é cada vez mais frequente, nos hábitos alimentares, o consumo de pratos preparados à base de pescado cru, resultante da popularidade dos pratos tradicionais japoneses, como o *sushi* e o *sashimi*.

O *sushi* e o *sashimi* são os pratos tradicionais japoneses mais conhecidos no mundo. Embora o Japão seja, ainda, o país que apresenta o maior consumo de *sushi* (Silva & Yamao, 2006), nos últimos anos, tem-se verificado um aumento global de interesse pela comida tradicional japonesa, com restaurantes de *sushi* implementados em quase todos os países do mundo (Feng, 2012). Isso é sobretudo visível em países europeus (Kulawik & Dordević, 2020).

O *sushi* é caracterizado por ser a combinação do arroz japonês, preparado com vinagre de arroz, com pescados crus, podendo incluir a alga *nori* (folhas finas e secas, feitas a partir da desidratação de algas comestíveis da espécie *Porphyra*), frutas, hortaliças e o *kani-kama* (alimento a base de peixe com sabor artificial de carne de caranguejo), além de diversos acompanhamentos como o *wasabi* e o gengibre. Denomina-se de *sashimi* qualquer alimento marítimo consumido cru, como peixes, e mariscos, entre outros (Prado, Iwatani, Pereira, Boiago, & Toledo, 2014). No entanto, a palavra “*sushi*” é comumente usado para se referir a *sushi* e *sashimi* (Lehel, Yaucat-Guendi, Darnay, Palotás, & Laczay, 2020).

Geralmente, estes tipos de alimentos são comercializados em restaurantes típicos, ou seja, especializados em culinária japonesa, que possuem área exclusiva para o seu preparo, denominada de *sushibar*. Contudo, podem também ser encontrados em restaurantes comuns, como parte integrante de cardápios variados. O *sushiman* é o responsável pela produção destes preparos. Os restaurantes típicos são mais valorizados, pois apresentam um pouco da história local e são as melhores referências para o consumo de ingredientes típicos da culinária japonesa (Prado, Iwatani, Pereira, Boiago, & Toledo, 2014). Nos últimos anos, tem-se observado uma tendência crescente, para a preparação caseira de *sushi* e *sashimi* pelos próprios consumidores e venda de *sushi* e *sashimi* em supermercados (Buchtova, Dordevic, Duda, Honzlova, & Kulawik, 2019; Mol, Ucok Alakavuk, & Ulusoy, 2014).

O *sushi* e o *sashimi* são considerados nutritivos e saudáveis devido ao seu elevado valor proteico e baixo valor calórico. Estes são fontes importantes de vários componentes, como os ácidos gordos, vitaminas, tais como iodo e selênio, porém poderão pôr em risco a saúde dos seus consumidores por serem consumidos, na sua maioria crus, associados, muitas vezes, a contaminações microbiológicas e à presença de contaminantes químicos e consequentemente a infecções e intoxicações alimentares (Santos & Quadros, 2017; Alcântara, 2009; Beveridge, Phillips, Dugan, & Brummet, 2010; Kawarazuka & Béné, 2011).

Estes alimentos estão muito associados a perigos de origem biológica, nomeadamente à presença de parasitas e a perigos de origem química, mormente, metais pesados, biotoxinas, pesticidas e resíduos farmacológicos (Lehel, Yaucat-Guendi, Darnay, Palotás, & Laczay, 2020).

Com o acréscimo do número de estabelecimentos especializados e não especializados, bem como de modalidades de distribuição de comida tradicional japonesa, amplifica-se a exposição a uma série de perigos e oportunidades de contaminações. Paralelamente, o facto

do produto ser altamente manipulado, antes e depois do seu preparo e não ser sujeito, na maioria dos casos, a nenhum tratamento térmico de altas temperaturas, aumenta as hipóteses de uma provável contaminação (Souza, Silva, Filho, & Santos, 2015; Geiss, Heringer, & Wenzel, 2015).

As questões relacionadas com a segurança alimentar assumem uma importância acrescida, em particular pelo impacto que possam ter na saúde pública.

3.1. Relação entre os portugueses e o consumo de Sushi e Sashimi

A relação entre os portugueses e o consumo de pescado cru iniciou-se há cerca de três décadas. O primeiro restaurante japonês a servir pescado cru em Portugal foi o Bonsai, sendo implementado e inaugurado por Paulo Trancoso, em 1987. No passado foram várias as barreiras de aceitação, por parte da sociedade portuguesa, face ao consumo do pescado cru, estas relacionadas com os preços de consumo e com o facto do pescado não ser cozinhado (Cordeiro & Alves, 2018). Recentemente e de acordo com a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (2018), o consumo de pratos preparados à base de pescado cru é mais frequente, apesar dos consumidores portugueses ainda manifestarem insegurança no consumo dos mesmos.

No corrente ano, foi realizado em Portugal um estudo, por Golden, Caldeira, & Santos (2022), intitulado "*Raw fish consumption in Portugal: A survey on trends in consumption and consumer characteristics*". Neste, foi aplicado um questionário a 421 pessoas das quais 91% eram de nacionalidade portuguesa. Foi observado que 10,6% do peixe consumido pelos inquiridos, é consumido cru, maioritariamente na forma de *sushi* e *sashimi*. De acordo com as respostas, a quantidade total consumida de pescado cru num ano foi de 2656650 g, que equivale a 6310.3 g/pessoa/ano. Considerando só o *sushi* e o *sashimi*, as quantidades ingeridas rondam os 1959 g/pessoa/ano, apresentando-se como uma quantidade relativamente baixa tendo em conta a quantidade total consumida de todos os tipos de carnes e peixes na dieta portuguesa. Desta forma, o *sushi* e *sashimi* foram caracterizados insubstanciais de acordo com a dieta nacional. Os peixes mais consumidos crus em *sushi* e *sashimi* foram apontados como o salmão e a truta (51,25%), o atum (37,79%) e o bacalhau (4,96%).

4. Atum

Centrando-se no atum, numa perspetiva taxonómica, este integra-se no Reino Animália, Filo Chordata, Classe Actinopterygii, Ordem Perciformes, Família Scombridae e Género *Thunnus* (Patrocínio, 2009).

O atum fresco consumido cru expõe na sua composição, em 30g (porção unitária recomendada), 42 Kcal e 176 KJ. Os macroconstituintes que apresentam maiores percentagens são a água e a proteína. Contem também ácidos gordos e algumas vitaminas, nas quais se destacam a Vitamina A, Niacinas e equivalentes, e Folatos. Relativamente aos minerais, este alimento apresenta em maiores quantidades Potássio e Fósforo (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, n.d.). Todos estes constituintes são cruciais ao bom funcionamento do organismo humano.

Os japoneses classificam o atum como um peixe de carne vermelha, principalmente a espécie *Thunnus thynnus*, conhecido pelo nome comum, atum rabilho, e dividem cada uma das suas metades em duas partes: dorsal e abdominal. A parte mais gorda, na região do abdómen, é a mais apreciada e mais cara. Nos bares de *sushi* mais frequentados do Japão, o preço varia de acordo com as diferentes partes: a parte pálida e gorda, a zona dorsal mais oleosa e a região magra e escura da cauda. Todas elas têm texturas e sabores distintos (Barber & Takemura, 2008).

Em todo o mundo e em qualquer altura do ano, encontram-se pratos preparados com atum nos restaurantes de *sushi*. Contudo, apresentam melhor qualidade entre o Outono e o Inverno no Japão, Austrália, Ásia e Europa. Na América do Norte a sua melhor época é o Verão (Barber & Takemura, 2008).

O atum que melhor se adapta à preparação de *sushi* e *sashimi* é o atum-rabilho. Contudo, podem ser utilizadas outras espécies. O atum-rabilho é um peixe de grande porte, podendo alcançar mais de 500 kg de peso. Devido ao seu valor comercial e à sua escassez na natureza, está a ser produzido em aquacultura, principalmente no Japão. A sua produção tem vindo a aumentar anualmente (Barber & Takemura, 2008).

4.1. Consumo de Atum na União Europeia e em Portugal

O atum é o peixe mais consumido na UE. Durante a década de 2010-2019, não houve nenhum outro produto de pesca e aquacultura que conseguisse alcançar valores anuais de consumo *per capita* superiores a 3 kg, a não ser o atum. Em 2017, o valor anual de consumo do atum foi de 3,06 kg por pessoa, em 2018 o valor decresceu para 3,02 kg por pessoa e em 2019 voltou a aumentar para 3,10 kg por pessoa. Em 2019, dos 3,10 kg de atum consumidos por pessoa num ano, grande parte é referente ao consumo de atum enlatado (1,81 kg) (European Market Observatory for Fisheries and Aquaculture Products, 2021). O consumo anual *per capita* de atum na UE durante a década 2010-2019 pode ser observado na Figura 1.

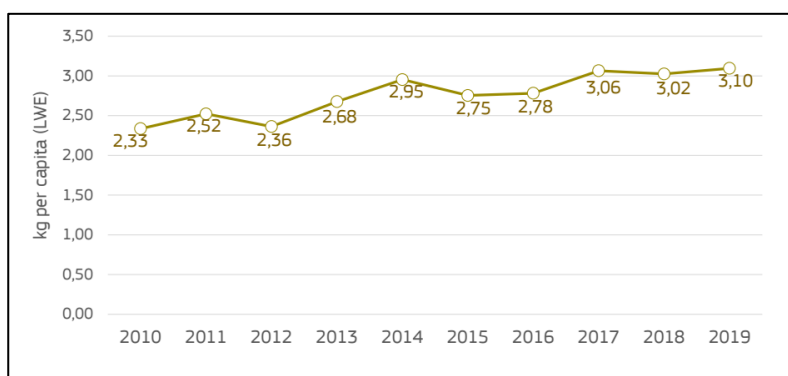


Figura 1. Consumo anual per capita de atum na UE (2010-2019) (Adaptado de European Market Observatory for Fisheries and Aquaculture Products, 2021)

O consumo do atum na UE é maioritariamente suportado pelas importações, contudo há também produção interna constituída principalmente por capturas efetuadas em Espanha e França. No entanto, uma parte significativa dessas capturas é desembarcada no estrangeiro perto de zonas de pesca, onde o atum é posteriormente processado e re-exportado (European Market Observatory for Fisheries and Aquaculture Products, 2021).

Relativamente ao consumo de atum pela sociedade portuguesa, em 2013, foi realizada uma investigação pela Universidade de Lisboa, constituída por um inquérito relativo às perceções atuais dos consumidores portugueses face ao consumo de atum. Referente às conclusões e ao modo de consumo, a maioria dos inquiridos respondeu que consome o atum sobre a forma de conserva (64% dos inquiridos). O atum fresco foi a segunda opção mais referenciada (18%) e de seguida o *sushi* (13%) (Costa L. M., 2013).

De acordo com outro estudo, igualmente desenvolvido através da aplicação de um inquérito, verificou-se que o atum foi indicado como o segundo tipo de pescado mais consumido na forma de *sushi* e *sashimi* pelos portugueses (Golden, Caldeira, & Santos, 2022).

**Capítulo II. Detecção dos parasitas *Anisakis*
e *Diphyllobothrium latum* no Sashimi de
Atum Fresco**

1. *Parasitas no pescado*

O parasita é caracterizado por ser um organismo que vive sobre (ectoparasita) ou dentro (endoparasita) de um outro organismo designado de hospedeiro, do qual é dependente para se alimentar (Centers for Disease Control and Prevention, 2022).

Os parasitas estão presentes em quase todos os ecossistemas e em todos os níveis tróficos. Todavia, os peixes estão entre os seres vertebrados que apresentam maior suscetibilidade ao parasitismo devido às características dos seus *habitats* naturais, incluídos no ecossistema aquático (Aquino, et al., 2019).

O *Sushi* e o *Sashimi*, por serem consumidos crus, são suscetível à contaminação por parasitas. Os parasitas que mais têm sido associados a infeções gástricas em humanos, após consumo destes pratos, são *Anisakis* e *Diphyllobothrium latum*.

1.2. *Risco de parasitismo em Sushi e Sashimi*

De acordo com Anantanawat, Kiermeier, McLeod, & Sumner (2012), o risco associado à ingestão de parasitas no decorrer do consumo de *sushi* e *sashimi* é significativamente reduzido, pois o pescado, quando ingerido dessa forma, é sujeito a vários procedimentos capazes de identificar e remover os parasitas, nomeadamente:

- O pescado antes de ser comercializado é obrigatoriamente inspecionado por autoridades competentes. Nesta etapa procede-se à remoção de parasitas existentes e/ou à proibição de venda do pescado altamente parasitado;
- Quando o pescado é comercializado pelas superfícies comerciais e de retalho, costuma ser preparado antes de ser vendido e nessa etapa os manipuladores de alimentos são capazes de remover as larvas existentes;
- Numa última etapa e no decorrer da confeção do pescado para *Sushi* e *Sashimi*, como as porções são cortadas muito finas (<10 mm para *sashimi* e <5 mm para *sushi*) é muito provável que as larvas possivelmente existentes sejam eliminadas pelos manipuladores de alimentos. É crucial referir que mesmo que o risco seja reduzido, há sempre a possibilidade de se ingerir pescado parasitado no decorrer do consumo de *sushi* e *sashimi*.

Nesta área, foi elaborado um estudo em Portugal intitulado de “*Seafood safety and food-borne zoonoses from fish - Examining the risk of Anisakis in the Portuguese Population and Consumer Risk Perceptions of Fish Consumption*” que concluiu que o risco de infecção por anisquiase por parte da população portuguesa, é significativamente reduzido, uma vez que o consumo de pescado cru pelos portugueses é pouco expressivo na dieta nacional. Todavia, com o aumento da tendência de consumo de alimentos crus ou ligeiramente processados, o risco de infecção pode aumentar (Golden O. , Caldeira, Rangel, & Santos, 2022).

Decorrente do mesmo estudo, verificou-se que a maioria dos inquiridos (86%) associou a transmissão de parasitas ao consumo de pescado cru. Contudo, uma grande percentagem mencionou nunca ter ouvido falar do parasita *Anisakis* nem de métodos preventivos. Dos respondentes que mencionaram possuir conhecimento sobre métodos preventivos, a maioria respondeu que os métodos mais importantes são “cozinhar bem o pescado” e “congelá-lo a -20°C”. Assim, o estudo concluiu que um número significativo de inquiridos apresentava pouco ou nenhum conhecimento acerca do parasita *Anisakis*, dos riscos a eles associados e dos métodos de prevenção (Golden O. , Caldeira, Rangel, & Santos, 2022).

2. O parasita *Anisakis* e a anisquiase

Anisakis são parasitas nematodes pertencentes ao Filo Nematelminths, Classe Nematoda, Ordem Ascarida, Subordem Ascaridina, Superfamília Ascaridoidea e Família Anisakidae. Esta família inclui os géneros *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Contracaecum* e *Hysterothylacium* (Aibinu, Smooker, & Lopata, 2019). Das 9 espécies atualmente reconhecidas do género *Anisakis*, *A. simplex sensu stricto* e *A. pegreffii*, são as mais relatadas e sanitariamente mais relevantes, pois são responsáveis pela anisquiase. Esta zoonose acontece quando os seres humanos consomem produtos do mar crus ou pouco cozinhados contendo larvas de terceiro estágio (L3) (Gomes, Quiazon, Kotake, Itoh, & Yoshinaga, 2020).

No ciclo de vida do género *Anisakis* (Figura 2), os mamíferos marinhos são os hospedeiros definitivos (HD), os crustáceos bentónicos e planctónicos são hospedeiros intermediários (HI) e os peixes e cefalópodes (lula) hospedeiros de transporte (HT) ou paraténicos uma vez que as larvas ao perfurar a parede do tubo digestivo, alcançam a cavidade corporal, onde podem aumentar de tamanho, sem ocorrer nenhum ciclo evolutivo. As fêmeas adultas libertam os ovos no intestino dos HD, que os expulsam juntamente com as fezes. Ainda dentro do ovo, a larva sofre as duas primeiras mudanças, com eclosão da larva L3. Uma

vez livre, esta entra na cadeia alimentar de pequenos crustáceos, que posteriormente servem de alimento a peixes. Nestes, a larva perfura a parede intestinal e permanece livre na cavidade abdominal ou migra para as vísceras ou músculo onde enquista, conservando a sua capacidade infetante. Dado que as formas larvares dos anisquídeos não têm especificidade de hospedeiro, podem ser encontradas em variadas espécies de peixes, aumentando a probabilidade de transmissão. O homem pode ser um hospedeiro acidental (HA) ao ingerir peixes ou cefalópodes com larvas L3 viáveis, a única forma larvar suscetível de causar infecção (Ramos, 2011).

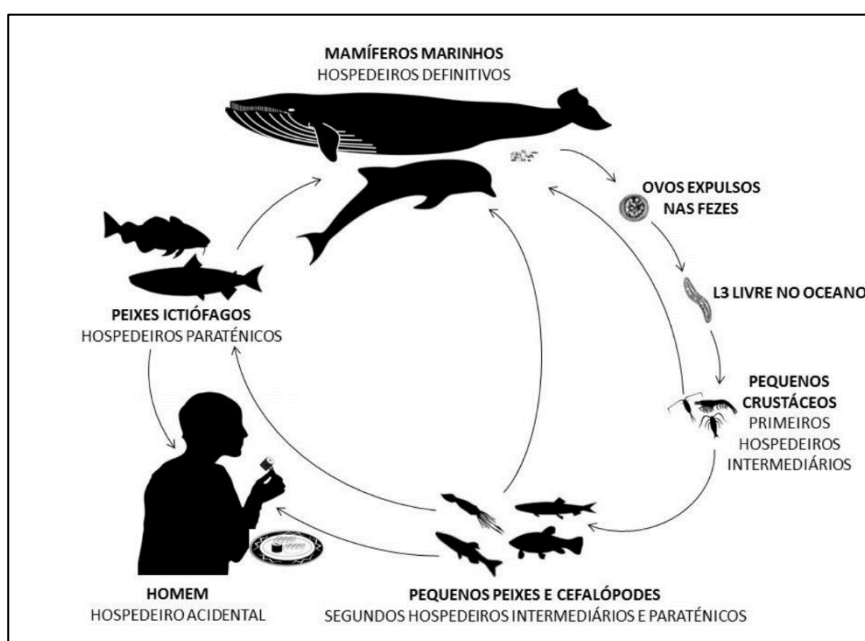


Figura 2. Ciclo de vida de *Anisakis* (Adaptado de Lopes, 2018)

Existem vários fatores que afetam a ocorrência de anisquídeos no pescado: os fatores abióticos que fazem referência às influências que os organismos possam receber a partir do ecossistema; os fatores bióticos que são caracterizados pelos efeitos causados pelos organismos num ecossistema e fatores antropogênicos que são causados pela ação do homem no ecossistema (Lopes, 2018).

Os pratos de pescado cru, como *sushi* e *sashimi* comumente encontrados no Japão e atualmente em muitos outros países, são uma fonte significativa de infecção por *Anisakis*. A anisaquiose, resultante da infecção por *Anisakis*, atinge mundialmente cerca de 2000 indivíduos por ano. Esta parasitose tem maior prevalência no Japão, e em comunidades piscatórias europeias e sul americanas. A Europa contribui com cerca de 3,5% para o total de casos

(Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, n.d.). Sabe-se que antes de 2010, mais de 20.000 casos de anisakiase foram relatados em todo o mundo (Andreoletti, et al., 2010).

Inevitavelmente, e com a globalização deste prato tradicional japonês, houve a necessidade de melhorar os métodos de diagnóstico (desenvolvimento de ferramentas) e implementar campanhas de consciencialização da população relativamente à infeção por *Anisakis* (Aibinu, Smooker, & Lopata, 2019).

O controle desta infeção passa pela cozedura do pescado, e o congelamento de modo a eliminar as larvas de *Anisakis* (Gomes, Quiazon, Kotake, Itoh, & Yoshinaga, 2020).

A anisakiase pode manifestar-se sob quatro formas clínicas: gástrica, intestinal, ectópica e alérgica (Gomes T. A., 2014; Audicana & Kennedy, 2008). Na forma gástrica, o paciente apresenta geralmente dor abdominal intensa, náuseas, vómitos e por vezes febre. O início da sintomatologia é rápido desde a ingestão do parasita e comumente dura alguns dias. A endoscopia pode evidenciar eritema, edema, gastrite erosiva severa, nódulos e úlceras. Na biopsia torna-se clara a presença de um característico infiltrado de células eosinofílicas – granuloma eosinofílico – na mucosa e submucosa e é comum o paciente apresentar leucocitose com eosinofilia nos resultados hematológicos. Quando a invasão parasitária da mucosa gástrica pelo parasita está associada à alergia, estamos perante uma situação conhecida por anisakiase gastro-alérgica (Gomes T. A., 2014). Nesta anisakiase, os pacientes desenvolvem simultaneamente manifestações clínicas de alergia, como urticária, angioedema ou anafilaxia e alguns sintomas abdominais. No entanto, alguns pacientes apresentam reações de hipersensibilidade mais generalizadas, não havendo nenhuma associação a sintomas gastrointestinais. A espécie *A. simplex* é conhecida como a responsável por reações de hipersensibilidade não apenas em indivíduos que consomem peixes contaminados, como também em indivíduos que trabalham com o pescado, apresentando sintomas como asma, rinite, conjuntivite e dermatite (Speciale, et al., 2017).

A infeção na forma intestinal caracteriza-se por apresentar dor abdominal constante ou intermitente, de um a sete dias após a ingestão do peixe ou cefalópode infetado, podendo estar associadas situações de peritonite e/ou ascite, em alguns casos pode ocorrer diarreia. Existem outras complicações que podem surgir, porém raramente, como é o exemplo da estenose ileal, invaginação, perfuração ou obstrução intestinal e pneumoperitonite (Gomes T. A., 2014).

A parasitose do tipo ectópica, extra-gastrointestinal ou intraperitoneal é quando o parasita perfura e migra para fora do tubo digestivo. Esta anisakiíase é mais rara, contudo já foram encontradas larvas na cavidade pleural, mesentério, fígado, pâncreas, ovário e tecido subcutâneo. Esta anisakiíase deve ser valorizada quando há historial recente de ingestão de pescado cru ou insuficientemente confeccionado, seguido de dor abdominal súbita. Endoscopicamente é possível fazer-se um diagnóstico definitivo, removendo-se e identificando-se a larva. Frequentemente, após a remoção do parasita, parte da sintomatologia pode subsistir durante semanas a meses (Gomes T. A., 2014).

Por fim, *A. simplex* é também responsável por alergia. A sintomatologia inclui geralmente urticária, angioedema, rinite, broncoconstrição, sinais gastrointestinais ou ainda gengivoestomatite, que ocorrem geralmente entre as primeiras 5 horas após consumo do peixe ou cefalópode infetado. A conjugação rápida de todos estes sinais, anafilaxia ou choque anafilático, é também possível e é potencialmente letal pois há o risco de edema da glote. Foi recentemente associado a *A. simplex* como novo agente etiológico da síndrome de *Kounis*, cujos sinais cardiovasculares estão associados à alergia. Acredita-se que, mesmo morto, o parasita poderá igualmente ser prejudicial, desenvolvendo uma resposta alérgica, até mesmo quando o próprio já não está fisicamente presente no organismo. Atualmente há o conhecimento de que o contacto com os componentes alergénios do *Anisakis* nem precisa de ser efetuado por via digestiva, tendo já ocorrido situações cutâneas, oculares e respiratórias, respetivamente na forma de dermatite, conjuntivite e asma alérgicas ocupacionais (Gomes T. A., 2014).

2.1. *Anisakis* no pescado

As larvas de *Anisakis* podem ser encontradas comumente em pescado consumido por uma grande parte da população como atum, cavala, arenque, salmão, bacalhau, anchova, lula e bonito (Machado M. , 2018 ; Bataier, Tozzetti, & Neves, 2009).

Há relatos de parasitismo por *Anisakis* em pescado de valor comercial, tradicionalmente utilizados em receitas de pescado cru ou mal cozinhado, nomeadamente: Salmão (Setyobudi, Jeon, Lee, Seong, & Kim, 2011); Bacalhau (Marigo, Taniwaki, Pinto, Soares, & Catão-Dias, 2015); Arenque (Levsen & Lunestad, 2010); Cavala (Tokiwa, Kobayashi, Ike, Morishima, & Sugiyama, 2018; Santos, Castro, Cavaleiro, Rangel, & Palm, 2017); Robalo (Castellanos & RicardoTangua, 2018); Polvo (Ferreira, 2013); Tilápia (Abiyu, Mekonnen, Hailay, & Haftu,

2020); Camarão (Pascual, et al., 1997) e Atum (Eslami, Sabokroo, & Ranjbar-Bahadori, 2011; Farjallah, et al., 2008; Ferrantelli, et al., 2014; Mladineo & Poljak, 2014; Piras, et al., 2014; Rosar, 2017; Yera, Fréalles, Dutoit, & Dupouy-Camet, 2018; Žilić & Mladineo, 2006).

Os parasitas que estão normalmente associados ao atum não apresentam, por norma, risco elevado para a saúde humana. Todavia, algumas espécies de parasitas relatadas apresentam-se como potencialmente perigosas, como é o exemplo do parasita *Anisakis simplex* (Yemmen & Gargouri, 2022).

Analisando-se os relatórios anuais do *Rapid Alert System for Food and Feed* (RASFF), entre o período de 1979 a 2019, foram notificados 546 casos de *Anisakis* em pescado. Não foi verificada nenhuma notificação que fosse respeitante ao atum (Golden, Caldeira, & Santos, 2022).

Existem registos da ocorrência de larvas de anisquídeos em espécies de peixes marinhos, com valor comercial, capturados na Costa portuguesa e Ilhas (Ramos, 2011). Sabe-se que a zona oceânica envolvente do arquipélago da Madeira é particularmente rica em biodiversidade destes nematodes (Gomes T. A., 2014).

Em Portugal continental, um estudo realizado ao largo da costa de Peniche e de Sesimbra registou a ocorrência de várias espécies de cetáceos como o golfinho-comum-de-bico-curto (*Delphinus delphis*), o golfinho-roaz (*Tursiops truncatus*), o golfinho-riscado (*Stenella coeruleoalba*), a toninha-comum (*Phocoena*) e a baleia-anã (*Balaenoptera acutorostrata*) (Vieira, Carvalho, & Brito, 2009). Todos estes cetáceos são hospedeiros definitivos preferenciais de *Anisakis* (Lopes, 2018).

2.2. Casos clínicos de *Anisakis* após ingestão de pescado cru

O primeiro relato de anisquiose no ser humano ocorreu em 1960 por Van Thiel, na Holanda, após o consumo de arenque cru. Cada vez mais é comum os parasitas *Anisakis* estarem envolvidos numa série de doenças com sintomas gástricos, intestinais, manifestações ectópicas e síndromes alérgicas em humanos que consomem peixe/marisco/moluscos malcozinhados, ou que têm exposição profissional com o pescado (Hochberg & Hamer, 2010).

No Japão, em 2014, uma mulher de 39 anos, deu entrada nas urgências com dor abdominal que durava já há algumas horas. No seu histórico clínico a mesma não revelava

nenhuma patologia, contudo no decorrer da anamnese, revelou ter consumido *sushi* na noite anterior, contendo peixe cru, incluindo atum, salmão e cavala. Através de uma gastroduodenoscopia superior, foi observada e confirmada a larva de *Anisakis* que penetrou na mucosa gástrica (Fukita, Asaki, & Katakura, 2014).

Em Portugal, no ano de 2017, uma equipa de médicos identificou *Anisakis* num paciente de 32 anos, residente em Lisboa, que deu entrada no hospital com febre, vômitos e dores de estômago. O doente, que havia comido *sushi* recentemente, foi submetido a uma endoscopia na qual se detetou um verme alojado no seu estômago (Figura 3). A análise microbiológica mostrou que a larva pertencia ao género *Anisakis* spp. O paciente em causa foi vítima de anisaquiose (Carmo, Marques, Bispo, & Serra, 2017).

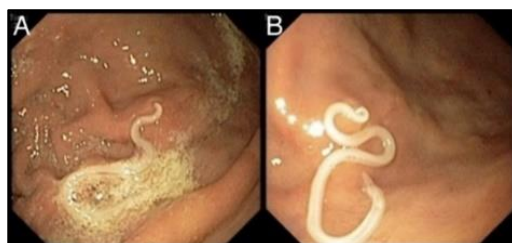


Figura 3. Imagem da endoscopia onde se observa o parasita *Anisakis* (Adaptado de Carmo, Marques, Bispo, & Serra, 2017)

Em Portugal, no ano de 2018, um outro caso foi notificado em Lisboa. Uma paciente com 65 anos deu entrada no hospital com uma dor epigástrica muito forte permanecendo hospitalizada durante dois dias. Após exames médicos, foram identificadas numa endoscopia, seis larvas (Figura 4). Através da análise microbiológica confirmou-se que os parasitas eram do género *Anisakis*. A paciente relatou que havia consumido peixe cru um dia antes do início dos sintomas (Bernardo & Castro-Poças., 2018).

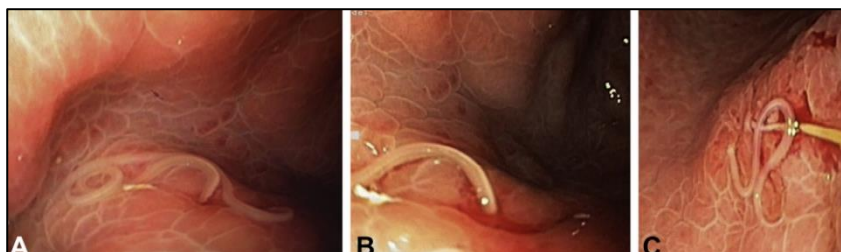


Figura 4. Imagens da endoscopia apresentado corpos larvares de *Anisakis* (Adaptado de Bernardo & Castro-Poças., 2018)

No Japão, um homem de 40 anos apresentou dor abdominal superior aguda, 8 horas após a ingestão de *sushi*. Durante o exame físico, foi detetada sensibilidade na região epigástrica. A tomografia axial computadorizada (TAC) ao abdômen expôs espessamento difuso da parede do corpo gástrico com o tecido adiposo circundante. A gastroscopia de emergência identificou uma larva de 15 mm de comprimento de *Anisakis simplex* penetrando o corpo inflamado do estômago (Figura 5) (Kondo, 2018).



Figura 5. Imagem da gastroscopia, identificando *Anisakis simplex* (Adaptado de Kondo, 2018)

Um homem saudável de 82 anos, sem sintomas relacionados com a ingestão do parasita, foi incidentalmente diagnosticado com anisakiase durante a realização de um exame médico designado de Esofagogastroduodenoscopia (EGD). Este revelou a presença de um nematode (Figura 6) penetrando a camada mucosa do antro gástrico. Este foi removido com pinça de biópsia e confirmado histologicamente como *Anisakis simplex*. O paciente revelou que havia consumido *sashimi* dois dias antes (Yamada & Ohwada, 2020).

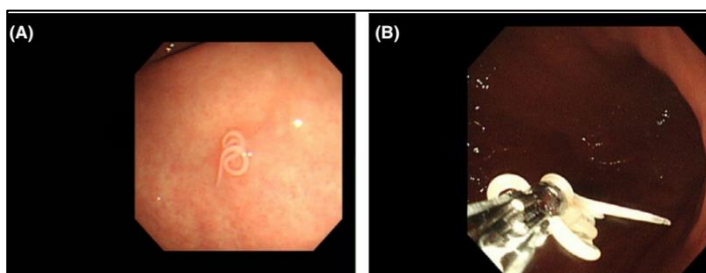


Figura 6. Visualização de um nematode num EGD (Adaptado de Yamada & Ohwada, 2020)

3. O parasita *Diphyllobothrium latum* e a difilobotriose

O género *Diphyllobothrium* pertence à família Diphyllobothriidae, Ordem Diphyllobothriidea, Classe Cestoda e Filo Platyhelminthes. Até à presente data, foram descritas aproximadamente 50 espécies, mas apenas 12 são consideradas patogénicas para o ser humano. As mais frequentes são *Diphyllobothrium latum* (cosmopolita), *Diphyllobothrium nihonkaiense* (Japão, Coreia do Sul, Leste da Rússia e provavelmente América do Norte), *Diphyllobothrium dendriticum* (Hemisfério Norte) e *Diphyllobothrium pacificum* (Argentina, Chile, Peru) (Dupouy-Camet & Peduzzi, 2014).

Esta ténia parasita é responsável pela maioria das infeções por platelmintos reportadas em seres humanos. O parasita atinge maioritariamente populações onde é habitual comer alimentos frescos, crus ou pouco cozinhados. Quanto mais diversos forem os hábitos alimentares de uma sociedade, maior será a probabilidade da população ser infetada (Villazanakretzer, Napolitano, Cummings, & Magann, 2016).

O surgimento da difilobotriose humana deve-se, principalmente, à recente mudança nos hábitos alimentares das populações locais, tais como defumados, marinados e produtos de pescado cru (Gustinelli, et al., 2016).

O ciclo de vida de *D. latum* é complexo e envolve vários hospedeiros (Figura 7). Os ovos são eliminados em água doce, amadurecem durante 8-12 dias a uma temperatura de água de 16-20°C, produzindo larvas denominadas de coracídio. Estas são ingeridas por crustáceos zooplancónicos, crustáceos do género *Cyclops* e *Diaptomus* que funcionam como os primeiros hospedeiros intermediários. O coracídio transforma-se numa larva procercoide dentro da cavidade dos crustáceos. Quando um peixe carnívoro ingere os crustáceos, o procercoide transforma-se numa larva plerocercoide, com alguns milímetros de comprimento. Esta larva migra para a musculatura do hospedeiro ou para as suas vísceras, onde pode permanecer inativo em forma de cisto por vários anos, ou então pode ser ingerido por outros peixes predadores (hospedeiros paraténicos) e infetá-los. Na Europa foram registadas espécies de peixes suscetíveis à contaminação por *D. latum*, tais como *Perca fluviatilis* (Perca), *Esox lucius* (Lúcio), *Salvelinus alpinus* (Artic Char) e *Lota* (Lota). Os humanos e outros animais ictiófagos são infetados pela ingestão do peixe cru contaminado, onde a larva plerocercoide desenvolve-se rapidamente para um ser adulto, no intestino destes hospedeiros definitivos (Dupouy-Camet & Peduzzi, 2014).

A larva infetante de *D. latum* é encontrada na carne de peixes frescos de água doce e de água salgada que normalmente migram para a água doce sendo o principal hospedeiro o salmão, embora outras espécies, como o atum, têm sido responsáveis por surtos nos Estados Unidos (Machado & Marques, 2014).

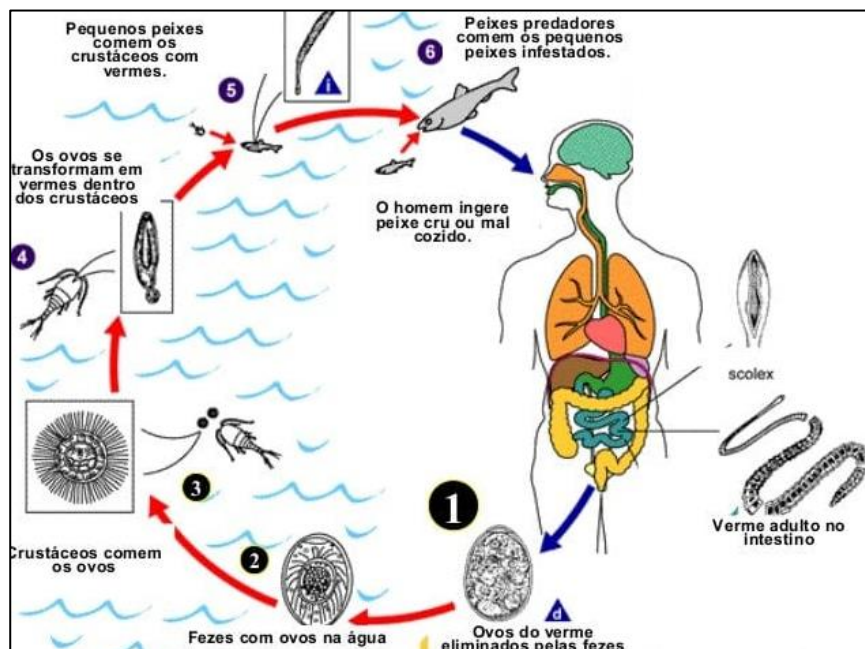


Figura 7. Ciclo de vida de *Diphyllbothrium latum* (Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (CDC))

Relativamente às medidas de prevenção e controle, é evidente a necessidade da realização de campanhas de informação dirigidas aos consumidores de pescado cru. Nos países europeus a legislação exige que o peixe destinado a ser consumido cru deva ser congelado previamente a uma temperatura inferior a -20°C , durante pelo menos 24 horas, capaz de matar os parasitas. Contudo, estas medidas não são cumpridas de forma confiável. Outra medida é o processo de confecção, devendo o pescado ser cozinhado a 55°C por pelo menos 10 minutos para que o parasita seja eliminado (Dupouy-Camet & Peduzzi, 2014).

O ser humano é um dos hospedeiros definitivos, sendo infetado por meio da ingestão de larvas plerocercóide presentes em carne de peixe (hospedeiro intermediário) sem um tratamento térmico adequado. Estas larvas alojam-se no intestino do hospedeiro definitivo e atingem a forma adulta (CRMV-MG, 2018).

As tênias de *Diphyllbothrium* são um dos parasitas humanos mais compridos conhecidos até à data, atingindo até 25 metros (3000–4000 proglotes) de comprimento, podendo viver

por vários anos (Dupouy-Camet & Peduzzi, 2014; Fairley & King, 2015). A ingestão de uma única larva plerocercóide pode levar à infecção. A larva cresce de 1 a 2 cm por dia e três semanas após a ingestão provoca sintomas. Os sintomas de difilobotriose humana podem incluir desconforto e dor abdominal, diarreia, perda de peso, astenia e vertigem. Todos esses sintomas não são patognomônicos e são bastante comuns entre a população (Dupouy-Camet & Peduzzi, 2014). Existem também relatos de casos assintomáticos. Nos casos de parasitismo prolongado podem ocorrer anemia microcítica e megaloblástica e sequelas neurológicas, devido à interferência do parasita na absorção de vitamina B12 pelo hospedeiro (Patrocínio, 2009; CRMV-MG, 2018).

3.1. *Diphyllobothrium latum* no pescado

O parasita *Diphyllobothrium latum* pode ser encontrado nas carnes de peixes frescos de água doce e de água salgada que normalmente migram para a água doce, sendo o principal hospedeiro o salmão. Apesar do salmão ser o principal hospedeiro, o atum, tem sido, também, associado a surtos relatados nos Estados Unidos (Machado & Marques, 2014). Contudo, são escassas as evidências científicas de ocorrências de *D. latum* no atum, pois este é um peixe característico de água salgada.

Há alguns relatos de *D. latum* associados ao consumo de pescado cru ou malcozinhado, nomeadamente em *sushi* e *sashimi* (Capuano D. M., Okino, Mattos, & Torres, 2017; Craig, 2012; Mezzari & Wiebbelling, 2008; Sampaio, et al., 2005; Santos & Faro, 2005; Tavares, Luque, & Bomfim, 2005).

3.2. Casos clínicos de *Diphyllobothrium latum* após ingestão de pescado cru

Uma mulher de 29 anos de nacionalidade brasileira, em 2004, apresentou desconforto gastrointestinal, incluindo dor abdominal durante vários dias, diarreia, cólicas e náuseas. Não apresentou vômitos nem febre. A sua história clínica revelou que havia comido pescado cru (*sushi*) alguns dias antes de se manifestarem os sintomas. Foram realizadas várias análises e testes laboratoriais, incluindo exame fecal. Este revelou uma grande quantidade de ovos operculados de *Diphyllobothrium latum* (Figura 8). Uma dose única de Praziquantel (600 mg) foi suficiente para curar a infecção (Santos & Faro, 2005).



Figura 8. Ovo de *Diphyllobothrium latum*
(Adaptado de Santos & Faro, 2005)

Foi detetado um caso de infecção assintomática causada por *Diphyllobothrium latum*, numa senhora de 38 anos, residente em Roma. A contaminação resultou provavelmente após a ingestão de *sushi* em um restaurante japonês, um ano antes. Foram realizados exames macroscópicos e microscópicos, revelando pequenos segmentos de proglotes grávidas de *D. latum*. O exame parasitológico, realizado na amostra fecal, destacou ovos operculados (Figura 9) (Cavalcanti, Fília, & Crotti, 2004).

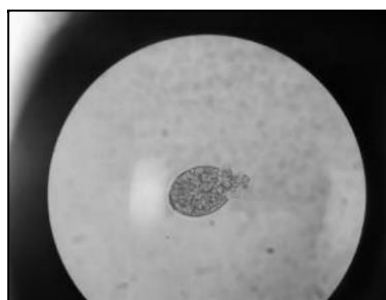


Figura 9. Ovo de *Diphyllobothrium latum* (Adaptado de Cavalcanti, Fília, & Crotti, 2004)

Em abril de 2005, um estudante universitário, procurou acompanhamento médico após eliminação de proglotes de uma ténia (Figura 10). Mencionou que durante quatro meses tem apresentando náuseas, flatulência, diarreia, dor abdominal e perda de peso. Foi feito uma análise às fezes do paciente que revelou a presença de ovos operculados de *Diphyllobothrium*, medindo entre 40 a 50 μm de largura e 60 a 70 μm de comprimento (Figura 11). O paciente foi tratado com uma dose única de Praziquantel. A investigação epidemiológica deste caso demonstrou que a possível fonte de infecção do paciente foi a ingestão de *sashimi* (Capuano, Okino, Mattos, & Torres, 2007).



Figura 10. Proglotes de *Diphylobothrium* (Adaptado de Capuano, Okino, Mattos, & Torres, 2007)

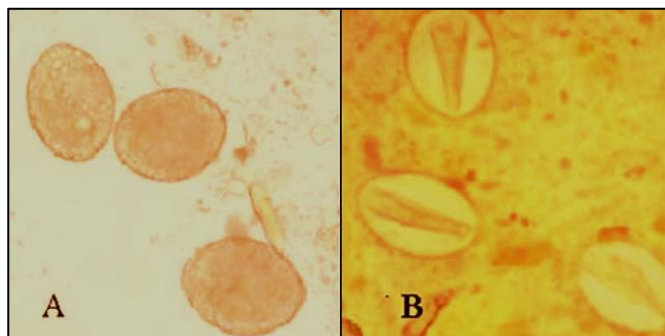


Figura 11. Ovos de *Diphylobothrium latum* (Adaptado de Capuano, Okino, Mattos, & Torres, 2007)

4. Enquadramento Legal de produtos de pesca e parasitas

Tendo em conta a parte D do capítulo III da secção VIII do anexo III do Regulamento (CE) n.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de abril de 2004, os produtos da pesca a consumir crus ou praticamente crus devem ser congelados a uma temperatura não superior a -20°C em todo o produto durante um período de, pelo menos, 24 horas. Na parte D do capítulo V da secção VIII do anexo III do presente regulamento, é também mencionado que, “os operadores das empresas do sector alimentar deverão garantir que os produtos da pesca foram submetidos a um exame visual para deteção de parasitas visíveis antes de serem colocados no mercado. Não poderão colocar no mercado para consumo humano produtos da pesca obviamente contaminados por parasitas”.

De acordo com o Capítulo I, Secção I, do Capítulo II do Regulamento (CE) n.º 2074/2005 da Comissão de 5 de dezembro de 2005, “a inspeção visual deve ser efetuada num número representativo de amostras. As pessoas encarregadas dos estabelecimentos em terra e as pessoas qualificadas a bordo de navios fábrica devem determinar a dimensão e a frequência das inspeções em função do tipo de produto da pesca, da sua origem geográfica e da sua utilização. Durante a produção, a inspeção visual dos peixes eviscerados deve ser realizada por pessoas qualificadas, na cavidade abdominal, nos fígados e nas ovas destinados ao consumo humano. A inspeção visual dos filetes ou das postas de peixe deve ser realizada por pessoas qualificadas, no momento em que os peixes são aparados e depois da filetagem ou do corte das postas. Quando não

for possível efetuar um exame individual devido ao tamanho dos filetes ou às operações de filetagem, deve ser elaborado um plano de amostragem que deve manter-se à disposição da autoridade competente em conformidade com a secção VIII, capítulo II, ponto 4, do anexo III do Regulamento (CE) n.º 853/2004. Sempre que, do ponto de vista técnico, a transiluminação dos filetes seja necessária, deverá ser incluída no plano de amostragem”.

5. Pesquisa de parasitas em pescado e produtos da pesca: revisão de métodos

Foram analisados alguns documentos referentes a métodos utilizados na identificação dos parasitas *Anisakis* e *Diphyllobothrium latum* em pescado e produtos da pesca, incluindo também em *sushi* e *sashimi*.

O género *Anisakis* pode ser detetado por observação e medição morfológica, extração de DNA e PCR (*Polymerase chain reaction*), análise RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e amplificação e sequenciamento de genes mtDNA *cox2* (Setyobudi, Jeon, Lee, Seong, & Kim, 2011).

Para identificação de *Diphyllobothrium latum*, os critérios morfoanatômicos permitem apenas a identificação ao nível de género, mas não são confiáveis na identificação das espécies, pois possuem características muito semelhantes entre si. Desta forma, métodos moleculares têm sido os mais recomendados. No passado, técnicas bioquímicas (ensaio isoenzimático ou imunoeletroforese) foram utilizadas como alternativas ao estudo morfológico para identificação de espécies. Desde o final dos anos 90, o desenvolvimento da biologia molecular baseada no sequenciamento de alvos de DNA nuclear e mitocondrial (mtDNA) resultou num melhor conhecimento do género *Diphyllobothrium* (Wicht, et al., 2010).

Alguns métodos para detetar parasitas em peixes, incluem inspeção visual, corte, “*Candling*” (inspeção sob luz UV), prensagem e Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) em tempo real; A inspeção visual e o “*Candling*” são métodos muito utilizados (Anantanawat, Kiermeier, McLeod, & Sumner, 2012).

O “*Candling*” é um método de deteção de parasitas com algumas limitações. Para que haja uma maior eficácia na deteção dos parasitas, existem técnicas complementares que podem ser utilizadas, nomeadamente a prensagem do filete. O filete deverá ser prensado até cerca de 3-4 mm de espessura, entre duas folhas de vidro acrílico e posteriormente colocado numa

mesa apropriada com 1500 lux de luz branca, ou sob luz ultravioleta a 366 nm numa sala escura ou câmara de visualização (Karl & Leinemann, 1993).

O “*Candling*” em conjunto com a prensagem, demonstra ser mais eficaz na detecção, de parasitas nematodes, como é o caso do *Anisakis*, e dos parasitas plerocercoides como é o exemplo do *Diphyllobothrium latum* (Williams, Hernandez-Jover, & Shamsi, 2020).

Num estudo comparativo, foram analisadas três metodologias diferentes de “*Candling*” para isolar plerocercoides em filetes de truta. O método recomendado pelo *Codex* (diretamente sobre o filete) teve uma eficácia de detecção de 22%. O filete foi cortado em peças com 4 mm de espessura e juntamente com a utilização do método de “*Candling*” foi reexaminado, a eficácia de detecção foi de 40,8%. Analisou-se a prensagem dos filetes cortados por inteiro em conjunto com a utilização do método de “*Candling*” obtendo uma eficácia de 59,2%. Quando os métodos foram todos combinados, nomeadamente o uso do “*Candling*” e prensagem sobre filetes cortados em peças de 4 mm de espessura, houve 100% de eficácia de detecção (Torres & Puga, 2011).

Relativamente à metodologia por PCR, esta apresenta-se altamente sensível uma vez que pequenas quantidades de DNA ou RNA específicas podem ser enzimaticamente amplificadas até que sejam obtidas milhões de cópias da sequência alvo. Na última década, a metodologia por PCR tornou-se a técnica genética mais utilizada em identificação e diagnóstico microbiológico. Mesmo com o aumento da utilização deste tipo de técnicas em estudos de microbiologia de alimentos, até 2008 eram escassos os estudos em Portugal com recurso a esta técnica (Gandra, Gandra, Mello, & Godoi, 2008). Atualmente muitos testes sorológicos e moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), estão a ser utilizados para detecção de parasitas específicos. Esses testes são mais comuns em ambientes de pesquisa/académicos, mas também são oferecidos por laboratórios de diagnóstico comerciais (Lejeune, 2021).

6. Materiais e Métodos

6.1. Caracterização e processamento das amostras

As amostras de *sashimi* de atum foram adquiridas em 2021, durante os meses de maio e junho, em treze estabelecimentos de *Take Away* de gastronomia japonesa, pertencentes ao concelho de Coimbra. Na sua maioria foram recolhidas 3 doses por estabelecimento, sendo que cada dose incluía 4 peças prontas para consumo, ou seja, 12 amostras por estabelecimento. Em quatro estabelecimentos, respetivamente no estabelecimento 1, 5, 9 e 11 foi recolhida apenas 1 dose de 4 peças. No decorrer da colheita e análise parasitológica, achou-se pertinente, após algum tempo, fazer uma segunda recolha de mais 1 dose em alguns estabelecimentos, respetivamente nos estabelecimentos 4, 6, 10 e 12.

No total, recolheram-se 35 doses, totalizando 140 amostras de *sashimi* de atum para análise parasitológica (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação e caracterização das amostras de *sashimi*

Estabelecimento	Nº Doses	Código de Identificação (Dose/s)	Código de Identificação (Amostra)	Data de Recolha	Composição
1	1	P01#1	P01#1.1 a P01#1.4	15/06/2021	Sashimi de Atum
2	3	P02#1	P02#1.1 a P02#1.4	31/05/2021	Sashimi de Atum; Cebolinho; Folha de Bambu
		P02#2	P02#2.1 a P02#2.4		
		P02#3	P02#3.1 a P02#3.4		
3	3	P03#1	P03#1.1 a P03#1.4	04/05/2021	Sashimi de Atum; Agrião; Nabo; Pepino; Gengibre
		P03#2	P03#2.1 a P03#2.4	06/05/2021	
		P03#3	P03#3.1 a P03#3.4		
4	4	P04#1	P04#1.1 a P04#1.4	19/05/2021	Sashimi de Atum; Alface; Nabo
		P04#2	P04#2.1 a P04#2.4		
		P04#3	P04#3.1 a P04#3.4		
		P04#4	P04#4.1 a P04#4.4	15/06/2021	Sashimi de Atum; Nabo
5	1	P05#1	P05#1.1 a P05#1.4	09/06/2021	Sashimi de Atum; Alface; Nabo
6	4	P06#1	P06#1.1 a P06#1.4	10/05/2021	Sashimi de Atum; Alface
		P06#2	P06#2.1 a P06#2.4		
		P06#3	P06#3.1 a P06#3.4	15/06/2021	
		P06#4	P06#4.1 a P06#4.4		
7	3	P07#1	P07#1.1 a P07#1.4	28/05/2021	Sashimi de Atum; Pepino; Gengibre; Nabo; Lima; Coentros; Cebolinho
		P07#2	P07#2.1 a P07#2.4		
		P07#3	P07#3.1 a P07#3.4		
8	3	P08#1	P08#1.1 a P08#1.4	26/05/2021	Sashimi de Atum; Limão; Cebolinho
		P08#2	P08#2.1 a P08#2.4		

		P08#3	P08#3.1 a P08#3.4		
9	1	P09#1	P09#1.1 a P09#1.4	09/06/2021	Sashimi de Atum; Nabo; Beterraba; Gengibre; Wasabi
10	4	P10#1	P10#1.1 a P10#1.4	14/05/2021	Sashimi de Atum; Alface; Cebolinho; Sementes de Sésamo
		P10#2	P10#2.1 a P10#2.4		
		P10#3	P10#3.1 a P10#3.4		
		P10#4	P10#4.1 a P10#4.4	15/06/2021	Sashimi de Atum; Alface; Cenoura
11	1	P11#1	P11#1.1 a P11#1.4	09/06/2021	Sashimi de Atum; Cebolinho; Alho francês; Lima e Laranja; Petúnia Azul
12	4	P12#1	P12#1.1 a P12#1.4	12/05/2021	Sashimi de Atum; Pepino; Nabo; Gengibre; Wasabi
		P12#2	P12#2.1 a P12#2.4		
		P12#3	P12#3.1 a P12#3.4		
		P12#4	P12#4.1 a P12#4.4	15/06/2021	
13	3	P13#1	P13#1.1 a P13#1.4	21/05/2021	Sashimi de Atum; Alface
		P13#2	P13#2.1 a P13#2.4		
		P13#3	P13#3.1 a P13#3.4		

6.2. Análise por Observação Visual Direta e método de Candling com luz Ultravioleta

A detecção dos parasitas *Anisakis* e *Diphyllobothrium latum* foi realizada através da observação direta com auxílio da prensagem do pescado acoplado com o método de *Candling* com luz Ultravioleta, conforme referenciado por Karl & Leinemann (1993), Torres & Puga (2011) e Williams, Hernandez-Jover, & Shamsi (2020). É crucial referir que o método utilizado foi adaptado, não havendo possibilidade de adquirir todos os equipamentos descritos, utilizaram-se equipamentos similares.

As amostras foram pesadas, sujeitas a medições de comprimento, largura e espessura, registando-se estes valores. Posteriormente, as amostras foram prensadas até possuírem 3-4 milímetros (mm) de espessura conforme referenciado por Karl & Leinemann (1993). Este procedimento foi realizado com um copo de vidro esterilizado com álcool etílico a 70% (Figura 12). De seguida, foi realizada uma observação visual direta da amostra e, posteriormente, para confirmação, a amostra foi sujeita ao método de “*Candling*”, sendo colocada no aparelho transluminador onde, sob a luz UV, foi possível observar a presença ou ausência de larvas (Figura 13).



Figura 12. Prensagem da amostra de sashimi de atum



Figura 13. Observação da amostra prensada de sashimi de atum sob luz UV no transiluminador

Numa fase posterior, as amostras foram colocadas em tubos de *Falcon* identificados e acondicionados a temperaturas de congelação, até serem utilizadas numa posterior análise química de determinação e quantificação de nitratos e nitritos.

6.3. Análise morfológica com o auxílio de microscópio

Em termos gerais, os corpos larvares, se identificados, devem ser colocados em lâminas e observados ao microscópio ótico, analisando-se as características morfológicas. Posteriormente, colocam-se em congelação a -20°C , em 200 microlitros (μL) de álcool a 95%, para posterior identificação por biologia molecular através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciação.

6.4. Análise molecular por PCR

Na metodologia PCR, uma região parcial do gene mtDNA *cox2* de *Anisakis* foi amplificada usando o *primer* direto 210 (5'-CACCAACTCTT AAAATTATC-3') e o *primer* reverso 211 (5'-TTTCTAGTTATATAGATTGRTTYAT-3') (Nadler & Hudspeth, 2000).

A mistura de PCR foi desnaturada a 94°C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 46°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e 30 segundos, seguido de pós-amplificação a 72°C por 10 minutos (Eamsobhana, Yong, Song, Tungtrongchitr, & Roongruangchai, 2018). Os produtos de PCR obtidos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose, sob luz UV, após coloração com brometo de etídio.

6.5. Análise Estatística

Para tratamento dos dados obtidos relativos às características físicas das amostras, foi utilizado o software *IBM SPSS Statistics Version 25*. A análise estatística dos dados consistiu apenas em estatística descritiva.

7. Resultados e Discussão

Os valores das pesagens e das medições das 140 amostras estão registrados no Anexo I, juntamente com os resultados da observação visual direta e confirmação por luz Ultravioleta.

Utilizando-se o software *IBM SPSS Statistics Version 25*, analisou-se alguns dados de estatística descritiva, relativos às características físicas das amostras, resultantes da observação direta e medições.

Foi calculada a média em gramas (g) dos pesos das amostras analisadas, apresentando um valor médio de 11,2 g por peça. O valor mínimo foi de 4,02 g e o valor máximo foi de 24,49 g. Verificou-se um desvio padrão de 3,80035, ou seja, observou-se uma grande variação nos pesos de cada peça.

Relativamente à largura de cada peça, concluiu-se a existência de um padrão e desta forma foi calculada a moda. Das 140 amostras, 76 (54,3%), mais de metade das amostras, apresentaram uma largura de 3 cm. O valor de largura mínimo foi de 2 cm e o máximo de 5 cm.

Na medição do comprimento das peças, verificou-se igualmente um padrão, procedendo-se novamente ao cálculo da moda. Das 140 amostras observou-se que 44 (31,4%) apresentaram um comprimento de 5 cm e que 28 (20%) apresentaram um comprimento de 4 cm. O valor de comprimento mínimo foi de 3 cm e o máximo de 7 cm.

Cruzando os dados da largura com o comprimento observou-se que 24 das amostras mediam 3x5 cm e que 21 mediam 3x4 cm. Os outros conjuntos de medidas identificados não foram observados em muitas amostras e desta forma não foram identificadas como um padrão de tamanho.

Por último e relativamente à espessura das peças, observaram-se algumas variações na frequência, contudo conseguiu-se, também, identificar um valor padrão: 30 das amostras apresentaram 4 a 5 cm (21,4%) e 34 (24,3%) exibiram 5 a 6 cm. Registou-se, ainda, 10 amostras (7,1%) com 3 a 4 cm (mínimo) de espessura e 8 amostras (5,7%) com 10 a 11 cm (máximo) de espessura.

Relativamente às características organoléticas das amostras, a maioria dos estabelecimentos possuía *sashimi* de atum de cor avermelhada, com um cheiro não muito intenso, uma textura tenra sem muita gordura, características de pescado fresco.

Verificou-se que as amostras referentes ao estabelecimento 10 apresentavam-se com uma cor mais escura/acastanhada, maior quantidade de gordura e nervos, e um cheiro mais intenso, tanto na primeira recolha, no dia 14 de maio de 2021 (Figura 14), como na segunda efetuada um mês depois, no dia 15 de junho de 2021 (Figura 15). A sua textura era gelatinosa e oleosa e ao prensar o pescado, este desfazia-se com facilidade. As amostras do estabelecimento 9 apresentaram-se também com cor mais escura, acastanhada e um cheiro mais intenso (Figura 16).



Figura 15. Amostras estabelecimento 10 (1ª recolha)

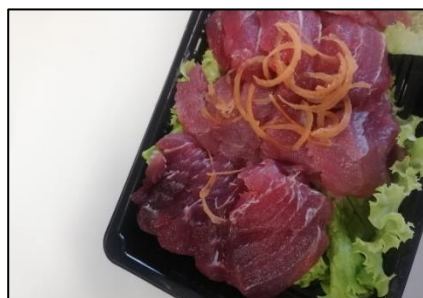


Figura 14. Amostras estabelecimento 10 (2ª recolha)



Figura 16. Amostras estabelecimento 9

Tendo em conta a deteção dos parasitas, foi elaborada uma tabela síntese (Tabela 2) que apresenta os resultados referentes à observação visual direta e à confirmação por luz Ultravioleta.

Tabela 2. Resultados da observação direta e confirmação por luz UV para deteção de parasitas

Estabelecimento	Código de Identificação (Dose/s)	Código de Identificação (Amostra)	Observação visual direta (Anisakis e D.Latum)	Confirmação por luz Ultravioleta (Anisakis e D.Latum)
1	P01#1	P01#1.1 a P01#1.4	Negativo	Negativo
	P02#1	P02#1.1 a P02#1.4		
2	P02#2	P02#2.1 a P02#2.4	Negativo	Negativo
	P02#3	P02#3.1 a P02#3.4		
	P03#1	P03#1.1 a P03#1.4		
3	P03#2	P03#2.1 a P03#2.4	Negativo	Negativo
	P03#3	P03#3.1 a P03#3.4		
	P04#1	P04#1.1 a P04#1.4		
4	P04#2	P04#2.1 a P04#2.4	Negativo	Negativo
	P04#3	P04#3.1 a P04#3.4		
	P04#4	P04#4.1 a P04#4.4		
	P05#1	P05#1.1 a P05#1.4		
5	P06#1	P06#1.1 a P06#1.4	Negativo	Negativo
	P06#2	P06#2.1 a P06#2.4		
6	P06#3	P06#3.1 a P06#3.3	Negativo	Negativo
		P06#3.4		
	P06#4	P06#4.1 a P06#4.4	Negativo	Negativo
	P07#1	P07#1.1 a P07#1.4	Negativo	Negativo
P07#2	P07#2.1 a P07#2.4			
P07#3	P07#3.1 a P07#3.4			
8	P08#1	P08#1.1 a P08#1.4	Negativo	Negativo
	P08#2	P08#2.1 a P08#2.4		
	P08#3	P08#3.1 a P08#3.4		
9	P09#1	P09#1.1 a P09#1.4	Negativo	Negativo
	P10#1	P10#1.1 a P10#1.4		
10	P10#2	P10#2.1 a P10#2.4	Negativo	Negativo
	P10#3	P10#3.1 a P10#3.4		
	P10#4	P10#4.1 a P10#4.4		
	P11#1	P11#1.1 a P11#1.4		
11	P12#1	P12#1.1 a P12#1.4	Negativo	Negativo
	P12#2	P12#2.1 a P12#2.4		
12	P12#3	P12#3.1 a P12#3.4	Negativo	Negativo
	P12#4	P12#4.1 a P12#4.4		
	P13#1	P13#1.1 a P13#1.4		
13	P13#2	P13#2.1 a P13#2.4	Negativo	Negativo
	P13#3	P13#3.1 a P13#3.4		

*Através da observação direta e confirmação sob luz Ultravioleta a deteção foi inconclusiva, não sendo possível uma confirmação exata.

Das 140 amostras, a maioria testou negativo para a presença de *Anisakis* e *Diphyllbothrium latum*, tanto na observação visual direta como na confirmação sob luz Ultravioleta. Contudo, foi observada na amostra P06#3.4 da dose P06#3, do estabelecimento 6, uma estrutura esbranquiçada com características semelhantes a uma larva com 2 cm de comprimento (Figura 17). Esta estrutura, apresentava características semelhantes às das larvas L3 de *Anisakis* presentes em pescado cru, uma dimensão de 1 a 4 cm, transparentes ou esbranquiçadas (Lopes, 2018). Contudo, sabe-se que a larva do género *Anisakis* é caracterizada por possuir estrias cuticulares transversas marcadas e que os parasitas deste género ainda não possuem lábios desenvolvidos, mas, ventralmente à boca, estão munidos de um dente larvar de forma triangular, dirigido exteriormente (Gomes T. A., 2014). Considerando as dúvidas referentes às características morfológicas, procedeu-se à análise da estrutura isolada através do método de PCR para deteção de *Anisakis*. O resultado da amplificação por PCR do gene mtDNA *cox2* de *Anisakis*, foi negativo.

A possibilidade de ser larva pleroceroide de *D. latum* também não foi descartada. De acordo com Patricio Torres & Hélèn Yera (2018), a larva pleroceroide apresenta uma cor esbranquiçada e um comprimento de 0,2 a 5 cm.

Após o isolamento do referido elemento da amostra P06#3.4, procedeu-se à sua observação ao microscópio ótico. Nesta análise, a possibilidade de ser uma larva de *D. latum* foi descartada pois as características observadas não corresponderam com o descrito, caracterizadas por possuir um escólex oval apresentando duas pseudo-botrídias, uma dorsal e outra ventral (Machado & Marques, 2014).



Figura 17. Elemento isolado da amostra P06#3.4 de sashimi de atum com 2 cm de comprimento

Concluiu-se, assim, que não houve detecção de parasitas nas amostras de *sashimi* de atum. O elemento isolado seria, potencialmente, um nervo do atum muito semelhante a um corpo larvar.

Em relação à segurança alimentar, os resultados obtidos foram excelentes, pois demonstrou-se que, nos estabelecimentos de culinária japonesa em estudo, situados no concelho de Coimbra, as amostras de *sashimi* de atum apresentavam-se livre de parasitas.

Tem havido evidências da presença do parasita *Anisakis* em vários peixes de valor comercial, tradicionalmente utilizados em receitas de pescado cru, onde se inclui o atum (Eslami, Sabokroo, & Ranjbar-Bahadori, 2011; Farjallah, et al., 2008; Ferrantelli, et al., 2014; Mladineo & Poljak, 2014; Piras, et al., 2014; Rosar, 2017; Yera, Fréalles, Dutoit, & Dupouy-Camet, 2018; Žilić & Mladineo, 2006).

Contudo, o risco da presença de parasitas no *sushi* e *sashimi* é reportado como reduzido porque o pescado antes de ser ingerido é sujeito a vários procedimentos. Numa primeira fase, o pescado, depois de capturado e antes de ser vendido, é inspecionado por autoridades competentes. Nesta etapa procede-se à remoção de parasitas existentes e/ou à proibição de venda do pescado parasitado. Numa segunda etapa, quando o peixe é vendido em superfícies comerciais ou de retalho, este é sujeito a uma prévia preparação, na qual os manipuladores de alimentos têm a capacidade de remover as larvas potencialmente existentes. Numa última etapa e no decorrer da confeção dos peixes para *sushi* e *sashimi*, como as porções são cortadas muito finas, é muito provável que as larvas potencialmente existentes sejam eliminadas pelos manipuladores de alimentos (Anantanawat, Kiermeier, McLeod, & Sumner, 2012). É crucial referir que mesmo que o risco seja considerado reduzido, há sempre a possibilidade de se ingerir pescado parasitado no decorrer do consumo de *Sushi* e *Sashimi*, pois não existem sistemas de controlo que sejam infalíveis.

Esta afirmação é confirmada pelo número de casos clínicos reportados que correlacionam as infeções parasitárias em humanos, ao consumo de pratos preparados à base de pescado cru, referenciadas nos pontos 2.1. e 3.1. do capítulo II. Os casos mais relevantes podem ser consultados nos pontos 2.2 e 3.2. do respetivo capítulo.

No decorrer da análise parasitológica, a probabilidade de ser detetada uma larva de *Anisakis* era muito baixa. De acordo com Anantanawat, Kiermeier, McLeod, & Sumner (2012), em 10.000 peças de *sushi/sashimi*, 1 contém, pelo menos, uma larva de *Anisakis*. Considerando

esta afirmação e tendo sido analisadas 140 peças, a probabilidade de se detetar uma larva de *Anisakis* seria de 1,4%, uma percentagem muito baixa.

Em Portugal, foram realizados estudos relativos à análise do risco da população portuguesa à infeção por anisakióse através da ingestão de pescado cru. Num dos estudos verificou-se que os peixes mais consumidos em *Sushi* e *Sashimi* são o salmão, a truta e o atum. Pelo descrito, estes peixes não estão associados a altos riscos de infeção por *Anisakis*, concluindo-se que o consumo de pescado cru apresenta um risco reduzido de infeção por anisakióse na população portuguesa (Golden, Caldeira, & Santos, 2022).

Os mesmos autores, confirmaram noutro estudo que o risco de infeção por anisakióse na população portuguesa, através do consumo de pescado cru, é significativamente reduzido, pois o seu consumo é baixo na dieta nacional. Contudo, salienta-se que alguns estudos demonstraram que parte da população portuguesa é alérgica a *Anisakis*, indicando a ocorrência de exposição da população a este parasita (Golden O. , Caldeira, Rangel, & Santos, 2022).

Todavia, é importante referir que até à data, em Portugal, mais concretamente em Lisboa, já foram reportados dois casos de anisakióse relacionados com o consumo de pratos japoneses elaborados à base de pescado cru (Carmo, Marques, Bispo, & Serra, 2017; Bernardo & Castro-Poças., 2018).

A possibilidade de ser detetada uma larva de *D. latum* nas amostras de atum era analogamente reduzida, pois sabe-se que este parasita não está comumente associado a peixes de água salgada, como é o caso do atum. Todavia, existem registos que evidenciam que o consumo de atum parasitado por *D. latum* poderá estar associado a surtos nos Estados Unidos da América (Machado & Marques, 2014).

Os nossos resultados foram similares aos obtidos num estudo realizado em Portugal em 2018, intitulado de “*Estudo parasitológico em sashimi comercializado no norte de Portugal*”, em que não foi detetada a presença de *Anisakis* nem *D. latum* no atum. Nessa investigação, foram analisadas 109 peças de *Sashimi*, recolhidos em *take away* de vários tipos de pescado, 45 de salmão, 31 atum, 19 robalo e 14 outros produtos de pescado (Miguéis, Ramos, Saraiva, & Esteves, 2018).

No entanto, em Portugal, a sensibilização para este tema ainda está a dar os primeiros passos, aquém de países com proximidade geográfica e cultural como Espanha e Itália, onde existe mais informação e protocolos estabelecidos (Cunha, 2017).

Neste contexto, em Portugal, no ano de 2022, foi aplicado um inquérito face à perceção do risco relativo à presença de parasitas no pescado e a maioria dos inquiridos (86%) respondeu que a transmissão de parasitas está associada ao consumo de pescado cru. Contudo, uma grande percentagem mencionou nunca ter ouvido falar do parasita *Anisakis* nem de métodos preventivos. Dos participantes que mencionaram possuir conhecimento sobre métodos preventivos, a maioria respondeu que os métodos mais importantes são “cozinhar bem o pescado” e “congelá-lo a -20°C ”. Deste estudo concluiu-se que, um número significativo dos participantes apresentava pouco ou nenhum conhecimento acerca do parasita *Anisakis*, dos riscos a eles associados e dos métodos de prevenção (Golden O. , Caldeira, Rangel, & Santos, 2022). Torna-se pertinente consciencializar a população sobre esta temática, para que os consumidores adquiram conhecimento dos riscos associados ao consumo de pescado cru e conheçam os métodos eficazes de prevenção.

Capítulo III. Fraude Alimentar: Detecção de Nitratos e Nitritos no Sashimi de Atum

I. Nitratos e Nitritos

Os nitratos são elementos presentes no meio ambiente, originando-se através de processos naturais e sintéticos, sendo o íão nitrato, a forma mais estável dos compostos oxidados de azoto (Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, 2009; *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, 2010). Estes compostos podem surgir naturalmente nas plantas, em consequência do ciclo do azoto, ou através da utilização de adubos nitrogenados que contaminam os produtos hortícolas (Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, 2009; European Food Safety Authority, 2008; Santamaria, 2006). São vulgarmente encontrados na água, solo e géneros alimentícios (Shaoting, Yongsong, & Xianyong, 2007).

Os nitratos são essenciais para o bom funcionamento e nutrição das plantas e produtos hortícolas, pois, fazem parte da constituição de moléculas essenciais para o desenvolvimento das mesmas, como é o exemplo das proteínas (Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, 2007; Tamme, et al., 2006). Dependendo de vários e diferentes fatores, bióticos e abióticos, cada tipo de planta e/ou produto hortícola apresenta um diferente potencial de acumulação de nitratos. É nas folhas que se encontra a maior concentração em nitratos. As sementes, frutos e tubérculos apresentam, na sua maioria, teores mais reduzidos (Laia, Rebelo, Serra, & Vasco, 2018).

Os níveis de nitratos diferem de acordo com o tipo de planta ou produto hortícola, assim, considerando-se os teores de nitratos neles existentes, pode-se classificá-los em 3 grupos distintos: Plantas com alto teor de nitrato ($>1000 \text{ mg kg}^{-1}$): beterraba, alface, espinafre, outros vegetais e ervas de folhas verdes; Plantas com teor médio de nitrato ($50-1000 \text{ mg kg}^{-1}$): batatas e outros vegetais; Plantas com baixo teor de nitrato ($0,5-50 \text{ mg kg}^{-1}$): bagas, frutas, cereais e vegetais de vagem (Tamme, et al., 2006).

A exposição do ser humano aos nitratos ocorre predominante via alimentar, quer seja através do consumo de água, quer seja através de alimentos vegetais contaminados. Os produtos vegetais constituem a principal fonte de nitratos na dieta humana, contribuindo com mais de 90% da ingestão de nitratos pelo homem (Tamme, et al., 2006).

Os nitritos (NO_2^-) existem como constituintes naturais de algumas plantas e produtos hortícolas, contudo, a concentração geralmente é baixa (Cheung, 2020). A presença ou o aumento do teor de nitritos nos produtos hortícolas deve-se especificamente à ação das bactérias sobre os nitratos, que os reduzem a nitritos. Este processo de redução pode ser

favorecido durante um inadequado armazenamento dos produtos, onde fatores como a temperatura, tempo de conservação e humidade relativa são determinantes (Hunt & Turner, 1994; Rath, Ximenes, & Reyes, 1994).

A ingestão dos nitritos pelo homem provém essencialmente do consumo de produtos cárneos. Os vegetais contribuem apenas com cerca de 2 a 6% da ingestão diária total de nitritos. Os produtos cárneos podem contribuir com 60 a 95% do total de nitritos ingeridos pelo homem (Dich, Järvinen, Knekt, & Penttilä, 1996; European Food Safety Authority, 2008; International Agency for Research on Cancer, 2010; Jaworska, 2004; Mendicoa, Astiasarán, & Bello, 1997; Perez, Mingo, Bosch, Peñuela, & Garcia, 1998; Vaessen & Schothorst, 1999; Wawrzyniak, Gronowska, & Gorecka, 1999).

Como aditivos, o nitrato de sódio/E251, o nitrato de potássio/E252, o nitrito de sódio/E250 e o nitrito de potássio/E249 são, na sua maioria, adicionados às carnes curadas e processadas para inibir o crescimento de microrganismos, nomeadamente o *Clostridium Botulinum*, que é a causa do botulismo, uma doença muito grave. A sua adição impede o crescimento de esporos germinados, mantém as propriedades organoléticas do alimento e confere a sua cor característica (Dennis, Key, Papworth, Pointer, & Massey, 1990; Dionex, 1998; Govari & Pexara, 2015; Kalaycioglu & Erim, 2019).

Reconhecidos como aditivos alimentares multifuncionais, os nitratos e nitritos desempenham pelo menos quatro funções importantes, sendo elas:

- Efeito cor: ação estabilizadora da cor vermelha atrativa de muitos produtos cárneos, consequência da formação do pigmento nitrosomioglobina ou nitrosohemocromo;
- Efeito sabor: ação como agente de sabor, conferindo sabores típicos e únicos dos produtos cárneos curados e maturados;
- Efeito conservante: ação bactericida ou de inibição ao crescimento de microrganismos patogénicos, nomeadamente o *Clostridium Botulinum* e outros gram-positivos;
- Efeito antioxidante: ação inibitória aos processos físico-químicos e microbiológicos que induzem à oxidação lipídica, vulgarmente conhecida como ranço (Olivo & Ribeiro, 2018).

Não se identificando, só por si, como um produto tóxico, o nitrato, quando adicionado aos alimentos, pode ser convertido em nitrito por ação de bactérias existentes na cavidade

bucal e no trato gastrointestinal do ser humano. Por sua vez, estes podem, por reação com aminas secundárias, formar as N-nitrosaminas, consideradas substâncias cancerígenas (Kalaycioğlu & Erim, 2019; International Agency for Research on Cancer, 2010).

Assim e como medida preventiva foram adotados, segundo o Regulamento (UE) n.º 1129/2011 da Comissão de 11 de novembro de 2011, limites máximos de utilização destes aditivos, consoante o tipo de género alimentício a que são adicionados.

Consequência da preocupação dos organismos responsáveis pela segurança alimentar no tocante à problemática da toxicidade por nitratos, e nitritos, existiu a necessidade de se realizar vários estudos e pareceres científicos sobre a sua presença nos vegetais e carnes curadas (Kalaycioğlu & Erim, 2016). No entanto, os estudos científicos sobre a presença de nitratos e nitritos em produtos de pesca são insuficientes.

De acordo com Hambridge (2002), o valor médio de nitratos detetável no pescado é de 5 mg/kg, sendo o valor médio de nitritos da ordem dos 0,5 mg/kg.

A adição dos nitratos e nitritos para adulteração de pescado, principalmente do atum, tem sido cada vez mais utilizada na indústria alimentar. A prática de fraude alimentar atinge sobretudo a venda de atum, um peixe cada vez mais procurado para fazer *sushi* e *sashimi*. O atum é um peixe muito perecível e a sua carne fresca apresenta uma pigmentação vermelha brilhante, transformando-se rapidamente em cor castanha durante o seu armazenamento, dependendo do processo de oxidação. Para prolongar o seu aspeto de frescor, o vermelho é estabilizado ou melhorado através de alguns procedimentos ilegais. Um desses procedimentos é a adição de nitratos e nitritos no pescado. A utilização destes aditivos não é autorizada em produtos da pesca não transformados, pois dissimula a verdadeira frescura do pescado. No entanto, os estudos científicos sobre a presença de nitratos e nitritos em produtos de pesca são insuficientes. (Niederer, Lang, Roux, Stebler, & Hohl, 2019; Smaldone, et al., 2017; Correia, 2018).

Em 2016, a Comissão Europeia (CE) reportou que o atum destinado para conservas tinha sido tratado com extratos vegetais contendo uma alta concentração de nitritos com o intuito de alterar a cor do pescado indicador da sua frescura. A adição de nitritos ao pescado não é autorizada e viola as especificações de aditivos alimentares previstos no Regulamento (CE) n.º 231/2012 (Directorate-General for Health and Food Safety, 2018).

Esta prática fraudulenta provocou, em 2017, centenas de intoxicações alimentares em países da UE, incluindo Portugal, uma vez que o peixe se apresentava impróprio para consumo devido aos seus elevados níveis de histamina, camuflados pela adição destes aditivos (Atlas da Saúde, 2017).

2. Toxicidade dos Nitratos e Nitritos

A toxicidade humana dos nitratos e dos nitritos está relacionada com vários fatores e não só com fatores intrínsecos à matriz alimentar ingerida, mas também com a idade, o estilo de vida e os hábitos alimentares (Iamarino, et al., 2015).

Os nitratos não são, por si só, tóxicos, resultando a toxicidade dos seus metabolitos e produtos de reação, como os nitritos e as N-nitrosaminas, entre outros compostos N-nitroso que são tóxicos e carcinogénicos (Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, 2009; European Commission, 1997; European Food Safety Authority, 2008; International Agency for Research on Cancer, 2010).

Cerca de 5% dos nitratos ingeridos pelos seres humanos são reduzidos a nitritos ao nível da cavidade bucal, por bactérias saprófitas da língua, como também ao nível do trato gastrointestinal (Assembly of Life Science, 1981; Correia, Barroso, Barroso, Oliveira, & Delerue-Matos., 2010; Council of Europe, 1993, International Agency for Research on Cancer, 2010, Tamme, et al., 2006). Estima-se que 83%-85% da exposição humana aos nitritos ocorre principalmente pela conversão endógena do nitrato a nitrito (European Food Safety Authority, 2008).

No organismo humano, mais concretamente no estômago, os nitritos, em condições de pH ácido, podem ser transformados em Óxido Nítrico (NO) (International Agency for Research on Cancer, 2010; Omar, Artime, & Webb, 2012) ou em outros agentes de nitrosação que, por sua vez, vão reagir com aminas secundárias ou alquilamidas, através de reações de nitrosação (nitrosação endógena), no qual se formam os compostos do tipo N-nitrosos, nomeadamente as nitrosaminas e as nitrosamidas, que, como supracitado, são reconhecidamente carcinogénicas (Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, 2009; Carlsson, Wiklund, Engstrand, Weitzberg, & Lundberg, 2001; Shaoting, Yongsong, & Xianyong, 2007). Estas reações de nitrosação podem ser inibidas pela adição de ácido ascórbico ou outros antioxidantes (International Agency for Research on Cancer, 2010).

Desta forma, o consumo de géneros alimentícios e água com teores excessivos de nitratos e nitritos, enquanto precursores de compostos carcinogénicos, é encarado como um problema para a saúde humana, uma vez que os nitritos reagem com as aminas secundários e formam as nitrosaminas com potencial carcinogénico (Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, 2007).

A *International Agency for Research on Cancer* (IARC), classificou a N-nitrosodietilamina (NDEA) e a N-nitrosodimetilamina (NDMA) como provavelmente carcinogénicas para os humanos (Grupo 2A) e as N-nitrosopiperidina (NPIP), N-nitrosopirrolidina (NPYR) e N-nitrosomorfolina (NMOR), como possivelmente carcinogénicas para o homem (Grupo 2B) (International Agency for Research on Cancer, 2010).

Consequentemente, há uma grande preocupação com os limites de nitritos autorizados ao abrigo do Regulamento (CE) n° 1333/2008, dado o aumento do risco de formação de nitrosaminas. Estudos epidemiológicos recentes referem a ligação entre a exposição humana a nitrosaminas e o desenvolvimento de várias formas de cancro, como o cancro gástrico e colorretal.

Outro risco decorrente da redução do nitrato em nitrito no organismo humano, é a metahemoglobinémia. O ião nitrito é capaz de oxidar o ião Ferro (Fe) presente na hemoglobina dos glóbulos vermelhos, propiciando a formação da metahemoglobina, a qual não possui a capacidade de transportar oxigénio para as diferentes células do corpo humano (Furlan, et al., 2020). Este processo pode resultar em metemoglobinémia que resulta da oxidação da hemoglobina (Hb) a metahemoglobina (metHb) através dos nitritos, deixando esta de estar funcional na atividade de transporte do oxigénio para os tecidos (Kalaycıoğlu & Erim, 2019). Quando a proporção de metHb atinge cerca de 20% face aos níveis de referência de Hb (de acordo com o sexo e a idade), começam a ser visíveis sintomas clínicos, tais como, cianose, fraqueza, aumento da frequência cardíaca e hipoxia. A depressão do sistema nervoso central pode ainda ser traduzida a partir de cefaleias, tonturas, fadiga e náuseas. Em casos mais agravados podem ocorrer convulsões, coma e morte por asfixia (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2011; Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, 2009; Bradberry, 2012; Fewtrell, 2004; Greer & Shannon, 2005).

Neste seguimento, no ano de 1997 o *Scientific Committee on Food* (SCF), estipulou uma dose diária admissível (ADI) de 3,7 mg/kg peso corporal/dia para os nitratos e 0,06 mg/kg peso

corporal/dia para os nitritos (European Commission, 1997; European Food Safety Authority, 2008). Estes valores de ADI foram calculados com base nos níveis de efeitos não observados (NOEL), determinados experimentalmente através de ensaios de toxicidade crónica e sub-crónica em animais (European Food Safety Authority, 2008). Foi aplicado um fator de segurança de 500 no caso dos nitratos, e de 100 no caso dos nitritos (European Commission, 1997). Complementarmente, em 2002 a *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) reestabeleceu uma ADI de 0,07 mg/kg peso corporal/dia para os nitritos, mantendo a ADI dos nitratos (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2002).

É de realçar que em junho de 2017, a *European Food Safety Authority* (EFSA) publicou dois pareceres científicos sobre a reavaliação da adição de nitritos e nitratos aos alimentos. Esta reavaliação foi feita a pedido da CE. Foi solicitado à EFSA que fossem reavaliados até 2020 todos os aditivos alimentares autorizados antes de 20 de janeiro de 2009.

Desta reavaliação concluiu-se que os níveis de segurança existentes para nitritos e nitratos, intencionalmente adicionados à carne e outros géneros alimentícios, são suficientemente seguros para os consumidores. A exposição dos consumidores aos nitritos e nitratos como aditivos alimentares está dentro dos níveis de segurança para todos os grupos populacionais, exceto para as crianças cuja dieta é elevada em géneros alimentícios contendo estes aditivos, onde consideram existir um ligeiro aumento desses valores. Contudo, se considerarmos todas as fontes dietéticas de nitritos e nitratos, os níveis de segurança podem ser excedidos para todos os grupos etários (European Food Safety Authority, 2017; European Food Safety Authority, 2017).

Atualmente, existem opiniões divergentes relativamente à toxicidade destes compostos. Existem estudos que relacionam o consumo de carnes vermelhas e/ou carnes processadas com doenças crónicas, como é o exemplo do cancro colorretal, diabetes tipo II e doença arterial coronária (International Agency for Research on Cancer, 2010).

Todavia, outros estudos indicam que os nitratos e os nitritos ajudam a regular a função cardiovascular, imunológica e a neuro-transmissão (Bryan & Ivy, 2015; De Smet & Vossen, 2016).

3. Enquadramento Legal de Aditivos Alimentares (Nitratos e Nitritos)

De acordo com o Regulamento (CE) n. o 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de dezembro de 2008, relativo aos aditivos alimentares, um aditivo alimentar é definido como “*qualquer substância não consumida habitualmente como género alimentício em si mesma e habitualmente não utilizada como ingrediente característico dos géneros alimentícios, com ou sem valor nutritivo, e cuja adição intencional, aos géneros alimentícios, com um objetivo tecnológico na fase de fabrico, transformação, preparação, tratamento, embalagem, transporte ou armazenagem, tenha por efeito ou possa legitimamente considerar-se como tendo por efeito, que ela própria ou os seus derivados se tornem direta ou indiretamente um componente desses géneros alimentícios*”.

Na UE, inicialmente, cada Estado-Membro (EM) tinha a sua própria legislação relativa à utilização de aditivos alimentares. Após várias tentativas, a harmonização da legislação dos vários EM foi possível na UE, com a Diretiva 89/107/CEE do Conselho, de 21 de dezembro de 1988, relativa à aproximação das legislações dos EM respeitantes aos aditivos que podem ser utilizados nos géneros destinados à alimentação humana, sendo mais tarde alterada pela Diretiva 94/34/CEE do Parlamento e do Conselho, de 30 de junho (Branen, Davidson, Salminen, & Thorngate III, 2001; Costa J. C., 2015).

Estas diretivas regulamentam os aditivos alimentares que podem ser utilizados na UE, assim como definem os princípios gerais que regulam o processo de aprovação de um novo aditivo alimentar. Esta Diretiva foi complementada por outras três Diretivas do Parlamento Europeu e do Conselho: a Diretiva 94/35/CE, de 30 de junho de 1994, relativa aos edulcorantes para utilização nos géneros alimentícios a Diretiva 94/36/CE, de 30 de junho de 1994, relativa aos corantes para utilização nos géneros alimentícios e a Diretiva 95/2/CE, de 20 de fevereiro de 1995, relativa aos aditivos alimentares com exceção dos corantes e dos edulcorantes (Costa J. C., 2015).

Em 2006, surgiu a Diretiva 2006/52/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 5 de Julho de 2006, que altera, em vários aspetos, a Diretiva 95/2/CE relativa aos aditivos alimentares com exceção dos corantes e dos edulcorantes, e a Diretiva 94/35/CE relativa aos edulcorantes para utilização nos géneros alimentares, no seu ponto 5 e com base no parecer da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA), emitido em 26 de novembro de 2003, efetuou alterações a autorizações, no sentido de manter o teor de nitrosaminas o

mais baixo possível, reduzindo o teor de nitritos e de nitratos adicionados aos alimentos, continuando a manter a segurança microbiológica dos produtos alimentares (Branen, Davidson, Salminen, & Thorngate III, 2001; Costa J. C., 2015; Porto, 2010; Sanchez, 2015).

Em 2008, a UE reuniu todas estas diretivas num só diploma legal, o Regulamento (CE) n.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro, relativo aos aditivos alimentares. Este novo Regulamento inclui todos os aditivos alimentares autorizados, as respetivas condições de utilização e rotulagem e simplifica o processo de autorização de aditivos (Branen, Davidson, Salminen, & Thorngate III, 2001; Costa J. C., 2015; Porto, 2010; Sanchez, 2015).

O Regulamento (UE) n.º 1129/2011 da Comissão, de 11 de novembro de 2011, vem alterar o anexo II do Regulamento (CE) n.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, onde consta a lista dos aditivos autorizados para utilização na UE e as respetivas condições de utilização (Regulamento (UE) N.º 1129/2011 da Comissão de 11 de Novembro de 2011, 2011).

Posteriormente o Regulamento (UE) N.º 1130/2011 da Comissão de 11 de novembro de 2011, veio alterar o anexo III do Regulamento (CE) n.º 1333/2008 relativo aos aditivos alimentares, mediante o estabelecimento de uma lista da União de aditivos alimentares autorizados para utilização nos aditivos, enzimas e aromas alimentares e nutrientes (Regulamento (UE) N.º 1130/2011 da Comissão de 11 de Novembro de 2011, 2011).

Por fim foi elaborado o Regulamento (UE) n.º 231/2012 da Comissão de 9 de março de 2012 que estabelece especificações para os aditivos alimentares enumerados nos anexos II e III do Regulamento (CE) n.º 1333/2008 (Direção Geral de Alimentação e Veterinária, 2022).

De acordo com a Parte E “Aditivos alimentares autorizados e condições de utilização nas categorias de géneros alimentícios” presente no Regulamento (CE) n.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de dezembro de 2008, verifica-se que na categoria “Peixe e produtos da pesca”, os nitratos podem ser utilizados como aditivo “unicamente em conservas de arenque e espadilha em vinagre” num teor máximo de 500 mg/Kg ou mg/l.

Desta forma, a adição de nitratos e nitritos em “Peixe e produtos de pesca” em condições distintas, não é autorizada pelo Regulamento (CE) n.º 1333/2008.

4. Fraude Alimentar

De acordo com a CE, a Fraude Alimentar é definida como “qualquer ação intencional suspeita de empresas ou indivíduos com o objetivo de fraudar os compradores e obter vantagens indevidas dos mesmos, em violação das regras referidas no artigo 1.º, n.º 2, do Regulamento (UE) 2017/625” (European Commission, n.d.).

Segundo a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) “a Fraude Alimentar é cometida quando alimentos são colocados ilegalmente no mercado com a intenção de enganar o consumidor, geralmente para obter ganhos financeiros. (...), na Fraude Alimentar os fatores determinantes são as infrações económicas que visam o lucro. (...) a Fraude Alimentar ocorre quando há um potencial de lucro económico elevado e um baixo risco de ser detetado” (Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, n.d.).

Em 2014, a *Global Food Safety Initiative* (GFSI) definiu a Fraude Alimentar como o “engano dos consumidores usando géneros alimentícios, ingredientes e embalagens para ganho económico, incluindo a substituição, melhorias não aprovadas, *misbranding*, falsificação, bens roubados ou outros”. Em 2018 redefiniu a sua definição, mencionando que a Fraude Alimentar é “um termo coletivo que abrange a substituição, adição, adulteração ou deturpação deliberada e intencional de géneros alimentícios, ingredientes alimentares ou embalagens de alimentos, rotulagem, informações sobre produtos ou declarações falsas ou enganosas feitas sobre um produto para ganho económico que possa afetar a saúde do consumidor” (Global Food Safety Initiative, 2018).

Apesar de não existir uma definição harmonizada ao nível da UE de Fraude Alimentar, é amplamente aceite que a mesma está associada a infrações à legislação alimentar, cometidas intencionalmente, com vista à obtenção de lucro defraudando o consumidor, podendo-se inclusive inferir do disposto no artigo 8.º do Regulamento (CE) n.º 178/2002, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 28 de janeiro, que as práticas fraudulentas ou enganosas e a adulteração de géneros alimentícios por motivação económica estão incluídas no âmbito da fraude alimentar (Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, 2018).

No que respeita à fraude alimentar e de acordo com a CE, a UE considera quatro critérios operacionais que se deverão observar para se considerar a existência de suspeita de fraude (Figura 18), nomeadamente: Violação da legislação alimentar; Intenção; Ganho económico (ganho este que não deverá ser marginal) e Deceção dos consumidores (iludir o

consumidor alterando a cor ou os rótulos de modo a mascarar a verdadeira qualidade e/ou natureza do género alimentício, podendo inclusive as práticas fraudulentas aparecer na forma de risco de saúde como seja a não indicação de alergénios) (Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, 2018).



Figura 18. Critérios operacionais para deteção de Fraude Alimentar (Adaptado de Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, n.d.)

Os casos recentes de fraude alimentar atingiram maioritariamente produtos como o azeite, vinho, mel, peixe, produtos lácteos, carne e aves de capoeira. Os consumidores podem ser expostos a práticas comerciais desleais, em especial no que se refere aos produtos alimentares disponíveis nos diferentes mercados, com diferenças significativas na sua composição, mas com aparências muito idênticas entre si (Federação das Indústrias Portuguesas Agro-Alimentares, 2018).

Ao nível da economia mundial, estima-se que a fraude alimentar tenha um custo anual global de 49 biliões de dólares e que 10% dos produtos alimentares adquiridos estejam adulterados (GMA Science & Education Foundation, 2018).

Em resposta às preocupações dos consumidores com a qualidade dos alimentos, às práticas fraudulentas no domínio alimentar e à falta de conhecimento técnico e científico por parte das autoridades competentes, a CE lançou um Centro de Conhecimento sobre a Fraude Alimentar e a Qualidade dos Alimentos, gerido pelo Centro Comum de Investigação. Este centro constitui uma rede que integra peritos internos e externos da CE, que dão apoio aos responsáveis políticos da UE, e às autoridades nacionais. Permite a partilha e o acesso a conhecimentos científicos atualizados em matéria de fraude alimentar e de qualidade dos alimentos. Funciona como uma interface entre a ciência dando suporte à elaboração de políticas europeias (European Commission, 2018; Federação das Indústrias Portuguesas Agro-Alimentares, 2018).

Desta forma, o Centro de Conhecimento sobre a Fraude Alimentar e a Qualidade dos Alimentos tem como principais funções:

- coordenar as atividades de fiscalização do mercado, por exemplo, em matéria de composição e propriedades organoléticas dos alimentos fornecidos com a mesma embalagem e marca em vários mercados da UE;
- operar um sistema de alerta precoce e de informação para a fraude alimentar, por exemplo, através do acompanhamento dos meios de comunicação social e da disponibilização destas informações ao público em geral;
- fazer uma ligação entre os sistemas de informação dos EM e da CE, por exemplo, entre bases de dados que descrevem a composição de determinados produtos agroalimentares de elevado valor, como o vinho ou o azeite e gerar conhecimentos específicos a cada país, por exemplo, fazendo o levantamento das competências e infraestruturas laboratoriais nos EM (European Commission, 2018).

Relativamente às vias de transmissão e comunicação de fraudes alimentares na UE, foram criadas algumas redes que facilitam as trocas de informação entre as autoridades dos EM e restantes organismos envolvidos.

O *Rapid Alert System for Food and Feed* (RASFF) foi criado em 1979 e estabelecido pelo artigo 50º do Regulamento (CE) nº 178/2002 de 28 de janeiro, como um sistema em rede e de alerta rápido, objetivando a notificação de riscos diretos ou indiretos para a saúde humana, referentes a géneros alimentícios ou a alimentos para animais. Este sistema permite que a informação seja partilhada eficientemente entre os seus membros (autoridades nacionais de segurança alimentar dos EM da UE, CE, EFSA, ESA, Noruega, Liechtenstein, Islândia e Suíça), fornecendo um serviço 24 horas por dia. Assegura que as notificações urgentes sejam enviadas, recebidas e respondidas eficiente e coletivamente (Direção Geral de Alimentação e Veterinária, 2021; Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, n.d.).

A CE é responsável pela gestão dessa rede, sendo o ponto de contacto em Portugal, a Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), no Gabinete de Trocas Intracomunitárias (GTI) (Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, n.d.).

As notificações RASFF efetuadas por cada EM, segundo o nº 2 do artigo 50º do regulamento supracitado, devem imediatamente, ser comunicadas à CE através do sistema de alerta rápido. A CE posteriormente transmite essas informações aos restantes membros da

rede, para que operem em conformidade (Direção Geral de Alimentação e Veterinária, 2021; Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, n.d.).

As situações resultantes de fraude alimentar são registadas na categoria de perigo “Adulteração/Fraude” e quanto à decisão de risco podem ser classificadas de “Não Grave”, “Grave” ou “Não decidido” (European Commission, 2017).

Em Portugal, a ASAE ao receber (via DGAV) informações respeitantes a produtos futuramente comercializados, procede à elaboração de ordens de operações, com vista à retirada dos mesmos do circuito comercial. Graças ao sistema RASFF muitos riscos de segurança alimentar foram evitados (Direção Geral de Alimentação e Veterinária, 2021; Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, n.d.).

Outro sistema é a *Food Fraud Network* (FFN), criada em 2013, após a crise de carne de cavalo. É composta pela CE, *European Union Agency for Law Enforcement Cooperation* (Europol), os órgãos de ligação designados pelos EM e, quando necessário, pela *European Union’s Judicial Cooperation Unit* (Eurojust). Nesta rede há a cooperação entre oficiais com conhecimentos sobre a cadeia agroalimentar da UE, agentes policiais e aduaneiros com poderes de investigação, juizes e procuradores administrativos de maior importância, quer a nível nacional, quer a nível da UE (Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, n.d.; European Commission, n.d.).

A FFN permite a rápida e eficiente cooperação entre os EM, nas situações de importação de alimentos, provenientes de países terceiros e trocas intracomunitárias, que violam a legislação no que respeita à fraude. Para além de constituir um fórum para discussão destes temas, os pontos de contacto nacionais, a FFN e a CE estão em contacto permanente, sendo trocadas informações em casos onde os resultados dos controlos oficiais de cada EM possam indicar a existência de uma possível violação dos requisitos legais, motivada pela perspectiva de ganho económico ou financeiro (Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, n.d.).

Neste contexto foi criado um sistema de informação, semelhante ao Sistema de alerta RASFF, o *Administrative Assistance and Cooperation system – Food Fraud* (AAC FF) (Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, n.d.). Este sistema permite que os países da UE troquem dados de forma estruturada em relação aos incumprimentos com a legislação em matéria de géneros alimentícios e alimentos para animais. Desde agosto de 2016, que são reportadas situações neste sistema que não apresentem perfis de riscos humanos ou animais, riscos para

a saúde (não abrangidos pelo RASFF) mas que apresentem suspeita de práticas fraudulentas (Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, n.d.). Desde 2017 a ASAE assegura, como ponto de contato da Rede FFN e sistema AAC FF, a troca de informações quando existe suspeita de situações de fraude alimentar (Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, n.d.).

Mais recentemente, foi estabelecido pelo Regulamento de Execução (EU) 2019/1715 de 30 de setembro de 2019, um sistema integrado designado de *Alert and Cooperation Network* (ACN), que incorpora estas três redes. Desde março de 2021, estas 3 redes trabalham em conjunto permitindo o intercâmbio de informações e a eficaz cooperação relativa aos controlos oficiais na cadeia agroalimentar entre os membros da rede. Os intercâmbios entre os pontos de contacto da ACN são realizados através de uma ferramenta informática concebida e gerida pela CE, a plataforma iRASFF (European Commission, 2021).

Analisando-se os Relatórios Anuais de Fraude da CE (2016-2021), nota-se que com o passar dos anos houve um aumento de notificações de suspeita de fraude alimentar: 157 notificações (2016); 178 notificações (2017); 234 notificações (2018); 292 notificações (2019), 349 notificações (2020) e 407 notificações (2021). No entanto, deve-se salientar que estas notificações são apenas suspeitas de fraude que exigem mais investigações por parte das autoridades competentes de cada país em causa (European Commission, 2017; European Commission, 2018; European Commission, 2019; European Commission, 2020; European Commission, 2021).

4.1. Fraude alimentar no Pescado

A fraude no pescado é cometida quando este é deliberadamente colocado no mercado, para ganho financeiro, com a intenção de enganar os consumidores. Existem muitos tipos diferentes de fraude no pescado que podem ocorrer em vários pontos da sua longa cadeia de abastecimento. O tipo mais comum de fraude no pescado envolve a rotulagem incorreta intencional e a substituição de espécies (Reilly, 2018).

A pesca ilegal, não declarada e não regulamentada contribui para o aumento das ocorrências de fraude no pescado, pois a partir da mesma, o pescado é comercializado ilegalmente e branqueado através da cadeia de comercialização de pescado legítimo. Isso leva a práticas de *marketing* enganosas em relação à origem geográfica das capturas por meio de

rotulagem incorreta, substituição de espécies, falsificação de documentação e consequentemente riscos para saúde dos consumidores (Reilly, 2018).

De acordo com o último Relatório Anual de Fraude Alimentar da CE, referente ao ano de 2021, analogamente a 2019 e 2020, a categoria do pescado e produtos derivados, continuou a ser a segunda categoria com mais pedidos de cooperação relacionadas à suspeita de fraude, com 10% de solicitações. A maioria incidia sob a suspeita de tratamentos ilegais, principalmente tratamentos de estabilização da cor no atum por uso de aditivos proibidos, incluindo nitratos e nitritos (European Commission, 2021).

4.2. Fraude Alimentar por adição de Nitratos e Nitritos em Atum

A adição ilegal de nitratos e nitritos, é um tipo de fraude muito praticada pela indústria de pescado, principalmente no atum.

No caso do atum, quando capturado e consequentemente fresco, apresenta uma cor avermelhada que, com o tempo, devido à oxidação, passa a vermelho-escuro e posteriormente a castanho. Para além da alteração da cor, há também um aumento do desenvolvimento de bactérias responsáveis pela deterioração do peixe e da produção de histamina no atum. Este tipo de fraude ao mascarar possíveis alterações, constitui um problema grave para os consumidores, uma vez que pode provocar reações alérgicas, conhecidas pela síndrome de “escombroides” que está associada ao consumo de elevadas quantidades de histamina, constituindo um quadro de intoxicação com sintomas dermatológicos, respiratórios, gastrointestinais e no pior dos cenários, se não forem administrados anti-histamínicos, levar à morte (European Commission, 2017; Cerio, Barrutia-Borque, & Gardezabal-García, 2016).

As indústrias alimentares, atualmente, praticam vários tipos de fraude alimentar, sendo uma das mais frequentes, no atum, a fraude por ocultação, que consiste na ocultação da baixa qualidade do atum que não é fresco. A adição de nitratos e nitritos, sob a forma de extratos vegetais, sais, entre outros, por injeção ou imersão provoca a alteração de cor do atum, que volta a adquirir uma cor vermelha característica do atum fresco. No entanto, os teores de histamina continuam a aumentar, uma vez que esta adição não suspende o processo natural da degradação e oxidação, o que coloca em risco a saúde do consumidor (European Commission, 2017; European Commission, n.d.; Correia, 2018).

Apesar dos esforços e campanhas lançadas, estima-se que 80% do atum fresco comercializado na UE seja fonte de práticas ilegais, e que apenas em 2016, foram tratados por este processo fraudulento, cerca de 25.000 toneladas de atum. O ganho estimado por parte das empresas prevaricadoras foi de 8 a 10 euros por cada quilograma de atum ilegalmente tratado, pelo que se calculou um lucro anual de 200 milhões de euros (European Commission, 2017).

Com a informação disponível, utilizando-se os critérios operacionais para se considerar a existência de suspeita de fraude, pode-se esquematizar na Tabela 3:

Tabela 3. Tabela Síntese Fraude Alimentar (Adaptado de European Commission, 2017)

Violação da legislação alimentar europeia	<ul style="list-style-type: none"> • Atum congelado em salmoura vendido como fresco em vez de enlatado; • Mudança de cor; • Tratamento do peixe (aditivos não autorizados).
Intenção	<ul style="list-style-type: none"> • Intencionalmente há o uso de nitritos e outros aditivos, de forma a melhorar a cor do atum; • A indústria foi avisada através de comunicados da UE para não o fazerem.
Ganho económico	<ul style="list-style-type: none"> • Estima-se que cerca de 200 milhões de euros por ano.
Esquema fraudulento/engano consumidores	<ul style="list-style-type: none"> • Atum de fraca qualidade vendido como se fosse fresco; • Risco na Saúde: Síndrome de escombroides e os nitritos podem levar à formação de doenças cancerígenas.

4.2.1. Ocorrências

Em 2015 através do *Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF)*, foram efetuadas 18 notificações de EM nas quais, através de análises laboratoriais, foram registados valores elevados de histamina presentes no atum. Destes casos notificados, verificou-se a ocorrência de reações alérgicas por síndrome de “escombroides em 59 consumidores . Em 2016 foram 12 os casos notificados no sistema RASFF com 24 consumidores afetados por esta mesma síndrome. Até meados de 2017, existiram 27 notificações com 165 consumidores afetados.

Tendo em conta estes números elevados, no decorrer do ano de 2016, a CE foi informada por alguns representantes da indústria do pescado sobre duas atividades, identificadas como fraudulentas, no setor do atum, principalmente em Espanha, França, Alemanha e Itália. A primeira prática consistia na venda de atum conservado em salmoura (-9°C) como sendo atum fresco. Note-se que o atum só pode ser vendido na forma de pescado fresco quando capturado por navios capazes de congelá-lo a -18°C até ao seu destino,

consequentemente o atum conservado em salmoura, apenas poderia ser comercializado para fabrico de conservas/enlatados (European Commission, 2017).

A segunda prática comunicada constava na alteração da cor do atum, utilizando aditivos ilegais com o propósito de alterar visualmente a cor e o aspeto do pescado, criando uma aparência fresca e avermelhada, simulando a aparência de atum fresco (European Commission, 2017).

Tendo em conta estas práticas fraudulentas, a *Directorate-General for Health and Food Safety* (DG SANTE), organização responsável pela implementação da legislação da UE em matéria de segurança e saúde alimentar, alertou os EM e a indústria do atum e estabeleceu uma lista de recomendações a serem utilizadas durante as inspeções pelas autoridades competentes (European Commission, 2017).

Foram também ministradas às autoridades responsáveis pelas inspeções, formações sobre este tema. Estas abordaram três tipos de investigações que devem ser consideradas, respetivamente, a inspeção nas indústrias de conservas, nas frotas de pesca e na comercialização dos aditivos (nitratos/nitritos) por parte de empresas da indústria do pescado.

No decorrer da inspeção feita às indústrias, nomeadamente às de conservas, é necessário averiguar as zonas de descargas e de expedição e apreender o atum com aspeto fresco e avermelhado enviando-os para análise, pois sabe-se que o atum quando é expedido com esse destino apresenta uma cor mais acastanhada devido ao seu acondicionamento em salmoura (-9°C). Os responsáveis pela inspeção nos navios de pesca, devem estar atentos à rastreabilidade e conservação do atum, verificando se o atum com aspeto fresco e avermelhado esteve acondicionado em navios com capacidade de o conservar à temperatura de congelação de -18°C. O outro tipo de inspeção consiste na fiscalização da comercialização de nitratos e nitritos, verificando quais os clientes que estão relacionados com a indústria do pescado, nomeadamente com o sector do atum e quais as quantidades adquiridas (European Commission, 2017).

Apesar dos avisos e dos esforços, em maio de 2017, em Espanha, 105 consumidores tiveram de recorrer a tratamento hospitalar por intoxicação alimentar obtida pelo consumo de histamina em atum. Neste caso, provou-se que a origem das intoxicações foram lombos de atum adquiridos como frescos, mas que na realidade não foram preservados em conformidade com as exigências da lei europeia sobre preservação de alimentos. Estes foram

adulterados através da injeção de nitratos e nitritos, acrescido da introdução de antioxidantes, ácido ascórbico (E300) e citrato de sódio (E331). Além dos consumidores espanhóis, o produto em questão foi consumido na Alemanha, Itália, França e Portugal, informação corroborada por diversas enunciações, como é o caso da publicação feita no portal Atlas da Saúde (2017).

Consoante o comunicado feito pela *Directorate-General for Health and Food Safety* (2018), relativamente a esta temática, no decorrer do ano de 2016 e 2017 a UE, respondeu com algumas ações, nomeadamente:

- Ativação imediata da *Food Fraud Network* da UE para garantir intercâmbio de informações relevantes entre as autoridades dos EM;
- Envolvimento ativo com os EM relevantes, notadamente em Espanha, onde a fraude foi descoberta, para obter o máximo de informações adicionais sobre a prática e sua escala potencial;
- Solicitação de garantias urgentes das medidas efetivas que estavam sendo implementadas a nível nacional com o intuito de pôr fim a estas práticas;
- Estabelecimento de canais de cooperação com a indústria relevante da UE e fornecimento de informações às partes interessadas relevantes;
- Formação especial para funcionários dos EM envolvidos em controlos oficiais;
- Realização de uma missão conjunta da CE/Espanha com a finalidade de investigar a questão, confirmando-se inegavelmente a existência de práticas ilegais. As autoridades espanholas comprometeram-se firmemente a tomar as medidas necessárias para acabar com essas práticas;
- A CE realizou uma auditoria em Espanha em outubro de 2017 para avaliar o funcionamento e a eficácia dos controlos oficiais no sector do atum, constatando que as autoridades espanholas competentes reagiram ativamente às conclusões da missão conjunta; O número de alertas de níveis elevados de histamina e síndrome “escombroides” (devido ao consumo de atum fresco) tinha diminuído drasticamente no RASFF desde meados de 2017;
- Previsão de realização de auditorias em 2018 nos EM relevantes, juntamente com auditorias em países não pertencentes à UE;
- Clarificação da legislação da UE sobre as diferenças entre peixe transformado e não transformado, como também sobre certos antioxidantes;

- Modificação dos certificados sanitários, com a finalidade de identificar claramente o atum destinado a ser enlatado e a capacidade de congelamento dos navios aprovados na UE.

Apesar da ação vinculada pelas organizações anteriormente referidas, foram posteriormente relatadas ocorrências de fraude no atum em vários países da UE, conforme relatórios oficiais da CE e outras organizações europeias.

Em 2018, e de acordo com um relatório publicado pela *Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes* (DGCCRF), uma das práticas fraudulentas detetadas em França relacionadas com os produtos de pesca foi a utilização de aditivos não autorizados, como nitratos e nitritos juntamente com ácido ascórbico para dar ao atum uma cor vermelha (European Commission, 2018).

Uma outra ocorrência, descrita por Helms (2018), ocorreu na Alemanha, em 2018, onde grandes quantidades de atum foram confiscadas pois a sua cor natural havia sido alterada pela adição de substâncias proibidas, como os nitratos e nitritos. Neste caso, o pescado encontravam-se já em estado de oxidação avançado com elevados teores de histamina, sendo prejudicial para a saúde humana.

Em 2020, as Autoridades de Segurança Alimentar na Bélgica ao longo de setembro a dezembro apreenderam quase 80 toneladas de atum não conforme, sendo 90% dos produtos importados da Ásia. Foram analisadas algumas amostras e deparou-se que grande parte das mesmas não se apresentavam conformes relativamente à presença de nitratos e nitritos, evidenciando-se o tratamento ilegal a fim de preservar a aparência de fresca dada pela cor vermelha no atum (Clark, 2021).

De acordo com o *Annual Report 2021 - Alert and Cooperation Network*, as suspeitas sobre tratamentos ilegais no atum persistiram em 2021, conforme relatado por denunciante. Note-se que 39% das notificações de fraude relativas a produtos da pesca, envolveram suspeitas de tratamento ilegal de atum (monóxido de carbono, nitratos e nitritos), abuso de aditivos (antioxidantes como o E300 e E331) e deficiências de rotulagem (European Commission, 2021).

No ano de 2021, em Itália, pelo menos 12 pessoas ficaram doentes após consumirem bifés de atum em restaurantes locais. Houve a suspeita de que esse atum estivesse adulterado com nitritos e nitratos (European Commission, 2021).

No desenvolvimento da presente investigação foi elaborada uma revisão de estudos científicos publicados na literatura científica, que reportam a ocorrência de nitratos e nitritos em amostras de atum, e concluiu-se que são extremamente escassos os estudos nesta área, e ainda mais diminutos os que relacionam a sua ocorrência à fraude alimentar.

A par destas conclusões, note-se, no entanto, que um estudo de mercado realizado na cidade de *Basel* (Suíça), por Niederer et al (2019), detetou a presença de níveis de Óxido Nitroso (N_2O) que variaram de 90 a 1130 $\mu g/kg$ em 7 das 13 amostras de atum analisadas originárias do Vietname, o que indicia a adição ilegal de nitratos e/ou nitritos ao atum.

4.2.2. Operações e Auditorias a nível da UE

OPSON VII

No período correspondente a dezembro de 2017 até final de março de 2018, foi executada uma operação conjunta da Europol/Interpol, liderada pela CE, relativamente ao tráfico de alimentos e bebidas falsificadas e de qualidade inferior. Nesta operação, participaram 67 países de todos os continentes e 22 companhias/associações privadas. No decorrer e incluída nesta operação, foi realizada uma ação coordenada pela UE com a cooperação da *Directorate-General for Health and Food Safety* (DG SANTE), e com o apoio da *Food Fraud Network* em 11 países europeus (França, Alemanha, Hungria, Itália, Liechtenstein, Holanda, Noruega, Portugal, Espanha, Suíça e Reino Unido), com a finalidade de detetar práticas fraudulentas respeitante ao atum. Em alguns países, as investigações ocorreram em navios de pesca e em fábricas de processamento, enquanto, noutros, foram elaborados extensos planos de amostragem ao nível de distribuição e retalho (EUROPOL; INTERPOL, 2018).

Esta foi a primeira vez que tal ação foi realizada em um produto específico. As práticas ilícitas incluíram substituição de espécies e venda fraudulenta de atum destinado a conservas, vendido como fresco. Neste caso, o atum destinado a conservas foi ilegalmente tratado com substâncias químicas que alteraram a sua cor para dar a impressão enganosa da sua qualidade. Nesta ação foram apreendidas mais de 51 toneladas de atum (EUROPOL; INTERPOL, 2018).

Auditorias DG SANTE

A CE realiza controlos com o intuito de monitorizar a aplicação e o cumprimento da legislação da UE em matéria de segurança alimentar. A responsabilidade dos controlos efetuados é atribuída à DG SANTE. Esta é responsável por desenvolver um plano multi-anual que define as prioridades para os seus controlos para os próximos 5 anos. Todos os anos, com base no plano multi-anual, é também estabelecido e publicado um programa de trabalho anual (European Commission, n.d.).

Considerando o crescente número de ocorrências de práticas fraudulentas que envolviam o atum e os altos níveis de histamina notificados, a DG SANTE realiza desde 2017 auditorias intituladas “Produtos de pesca derivados de espécies de atum” em alguns países da UE que considera relevantes, e também em países não pertencentes à UE. Considerando-se apenas os países pertencentes à UE (Espanha, França, Portugal e Itália), note-se, nos pontos abaixo mencionados, quais as conclusões das auditorias executadas, respetivamente à utilização de aditivos não autorizados para adulterar o aspeto/cor do atum.

“Produtos da pesca derivados de espécies de atum” Espanha (outubro 2017):

Não houve evidências que sustentem a utilização de aditivos não autorizados no fabrico de lombo de atum descongelado. Todas as autoridade envolvidas tomaram as medidas apropriadas para informar os operadores de negócios alimentares relativamente a esta prática ilegal, e têm sido feitas verificações com o intuito de monitorizar e evitar este tipo de não conformidade (Directorate-General for Health and Food Safety, 2017).

“Produtos da pesca derivados de espécies de atum” França (outubro – novembro 2018):

Em 2017 foram analisados produtos da pesca para determinar os teores de aditivos utilizados, e em 2018 duas atividades específicas foram executadas tendo o seu foco no atum. Segundo as autoridades, 64 amostras de lombos de atum foram recolhidas, 22 destas amostras apresentaram valores elevados de ácido ascórbico (E300) e 2 apresentaram pigmentos nitrosilados, indicando a presença de nitratos e nitritos no atum. Contudo, não foram detetados resultados não conformes para teores de histamina. Na sequência dos resultados não conformes, as autoridades emitiram um aviso, realizaram cartazes e em alguns casos aplicaram sanções administrativas (Directorate-General for Health and Food Safety, 2019).

“Produtos da pesca derivados de espécies de atum” Portugal (outubro 2018):

Em 2016, na sequência do aumento das notificações RASFF a nível da UE relacionadas com níveis elevados de histamina em produtos de atum fresco e a utilização fraudulenta de aditivos, a DGAV distribuiu informações cruciais, relativas a esta temática, a todos os coordenadores regionais, incluindo nas regiões autónomas, e à ASAE.

Em 2016 e 2017, foram testadas 10 amostras de tunídeos para pesquisa de histamina, das quais uma excedia os limites legais. Além disso, foram testadas oito amostras para pesquisa de nitratos, tendo todas como resultado «não detetados».

A equipa responsável pela auditoria constatou que, no âmbito dos controlos proativos, havia ordens de operações para navios-fábrica/navios-congeladores e para a supervisão dos estabelecimentos de produtos da pesca em terra. No âmbito dos controlos reativos, foram emitidas ordens de operações na sequência de notificações RASFF e do sistema AAC FF e na sequência de resultados não conformes no âmbito do Plano Nacional de Colheita de Amostras (PNCA) da ASAE. A mesma equipa constatou que foi emitida uma ordem de operações na sequência de uma notificação do sistema AAC FF, relativa à atividade fraudulenta no tratamento de produtos de atum descongelados, a qual incluía fotografias de lombos de atum com e sem adição de aditivos, exibindo a diferença de cor entre os dois produtos.

Na sequência da inexistência de provas que estivessem a ser utilizados aditivos destinados a alterar a cor do atum, as autoridades competentes declararam não ter conhecimento do tratamento de atum não transformado com nitritos/nitratos ou aditivos contendo teores elevados de nitratos, tais como os extratos vegetais. Nenhum dos estabelecimentos visitados utilizava qualquer tipo de aditivos (Directorate-General for Health and Food Safety, 2018).

“Produtos da pesca derivados de espécies de atum” Itália (janeiro – fevereiro 2019):

Diferenciadas substâncias (antioxidantes, nitratos e nitritos, polifosfatos, conservantes e cores) foram analisadas no atum. Relativamente às autorizadas como aditivos, não foram encontradas níveis superiores aos limites máximos regulamentados. No que diz respeito às não autorizadas nesta matriz alimentar, não foram observadas ilegalidades. (Directorate-General for Health and Food Safety, 2019).

“Produtos da pesca derivados de espécies de atum” Espanha (maio 2019):

O relatório concluiu que as autoridades competentes desenvolveram um sistema de controlo oficial apoiado em procedimentos documentados que abrangem toda a cadeia produtiva dos produtos da pesca, incluindo elementos específicos para as espécies de atum (em especial a utilização de aditivos alimentares e os navios congeladores). Este sistema de controlo visa verificar se os produtos da pesca, especificamente de atum, são produzidos em conformidade com os requisitos da UE em respeitante à higiene alimentar, aditivos e rotulagem (Directorate-General for Health and Food Safety, 2019).

Operação conduzida pela Federal Agency for the Safety of the Food Chain (FASFC)

A FASFC da Bélgica, realizou uma vasta operação ao atum entre setembro e dezembro de 2020 destinada a combater a fraude neste setor. Foram apreendidas quase 80 toneladas de atum não conforme, sendo 90% dos produtos importados da Ásia. Foram analisadas algumas amostras e deparou-se que grande parte das mesmas não se apresentavam conformes relativamente à presença de nitratos e nitritos, evidenciando-se o tratamento ilegal a fim de preservar a aparência de frescura dada pela cor vermelha no atum (Clark, 2021).

Outras Operações referentes à fraude do atum por adição de aditivos alimentares não autorizados

- Operação Nuta (2017): Sete pessoas foram investigadas;
- Operação ATYH 2 (2018): Quatro pessoas foram investigadas;
- Operação Atunali (2018): Quatro pessoas foram investigadas;
- Operação Tarantelo: Setenta e nove pessoas foram detidas (Clark, 2021).

5. *Metodologias Analíticas: revisão*

A determinação precisa de teores de nitritos e nitratos em matrizes alimentares é fundamental na área da Segurança Alimentar, nomeadamente, para avaliar a conformidade com a regulamentação estabelecida relativa aos aditivos e contaminantes alimentares (Merino, Ornemark, & Toldrá, 2017).

Nos dias de hoje é possível encontrar na literatura científica várias referências de métodos analíticos utilizados para a determinação dos nitratos e nitritos em amostras de alimentos, como por exemplo, métodos espectrofotométricos, enzimáticos, eletroquímicos e cromatográficos. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) é o método mais utilizado na análise destes compostos em géneros alimentícios pelas vantagens que apresenta (Merusi, et al, 2010; Zhang, et al., 2014).

5.1. *Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC)*

A cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) desenvolveu-se em resposta à necessidade premente de análises mais rápidas e eficientes. A UPLC fundamenta-se nos mesmos princípios de separação da HPLC, tendo como principais diferenças as colunas cromatográficas que são de dimensões reduzidas, aumentando a resolução e a detetabilidade e diminuindo o tempo das análises. A UPLC vem ganhando espaço em todas as áreas de aplicação da HPLC, devido às principais vantagens que apresenta: diminuição considerável no tempo de análise, melhor resolução e detetabilidade, economia de fase estacionária e fase móvel, pequeno volume de amostra, facilidade de transferência de um método desenvolvido por HPLC para UPLC, grande variedade de colunas e equipamentos disponíveis e menor geração de resíduos atendendo, desta forma, à química verde (Maldaner & Jardim, 2012).

5.2. *Comparação entre metodologias analíticas*

Foi realizada uma revisão das metodologias analíticas disponíveis na literatura científica para a determinação de nitratos e nitritos em pescado e produtos de pesca (incluindo o atum) como se pode verificar na Tabela 4.

Tabela 4. Métodos utilizados para determinar nitratos e nitritos em pescado e produtos de pesca

Tabela de Métodos de determinação de Nitratos e Nitritos em Alimentos					
Tipo de Método	Matriz	L.Q.		Recuperação (%)	Ref. Bibliográficas
		Nitrato	Nitrito		
ECZ	Conservas de peixe: atum, cavala e sardinha	1.82 µmol/l	2.75 µmol/l	88,7 - 104	(Kalaycıoğlu & Erim, 2016).
GC-MS	Amostras de atum	Óxido Nitroso: 30 µg/kg		-	(Niederer, Lang, Roux, Stebler, & Hohl, 2019).
HPIEC-SCD	Produtos da pesca	0.95 µg/g	0.59 µg/g	72 - 108	(Chiesa, Arioli, Pavlovic, Villa, & Panseri, 2019).
HPIEC-Q-Exactive		0.087 µg/g	0.108 µg/g	79 - 110	
HPLC-DAD + Análise colorimétrica	Amostras de atum	-	-	-	(Saez-Hernande, Antela, Mauri-Aucejo, Morales-Rubio, & Cervera, 2022)

São escassos os estudos publicados na literatura científica relativos à análise dos teores de nitratos e nitritos em pescado e produtos da pesca. Contudo, nos estudos observados, conclui-se que os métodos cromatográficos têm sido mais utilizados para analisar estes compostos.

Os métodos analíticos descritos por Niederer, et al (2019) e Saez-Hernande, et al (2022), foram desenvolvidos especificamente para detetar de uma forma eficaz, rápida e económica a adulteração no atum pela adição de nitratos e nitritos e/ou outros compostos utilizados para alterar a cor do pescado.

O método descrito por Niederer, et al (2019) por GC-MS foi desenvolvido para determinar concentrações de monóxido de carbono (CO) e óxido nitroso (N₂O) no pescado. Este último é consequente de duas etapas de redução do nitrito (NO₂⁻), nomeadamente a óxido nítrico e por fim a óxido nitroso. Concluiu-se que, a determinação de N₂O nas amostras, era indicativa da sua adulteração com nitritos. O CO e o NO₂⁻ são substâncias utilizadas para adulterar a cor do atum para que este apresente uma cor mais avermelhada, característica do atum fresco. Com esta metodologia é possível determinar estes dois compostos no decorrer da mesma análise cromatográfica. O método foi validado usando

nitrito marcado com o isótopo ^{15}N , bem como, amostras de pescado de referência, tratadas e não tratadas.

Em 2022, Saez-Hernande, et al (2022) desenvolveram uma metodologia analítica por HPLC-DAD e uma análise colorimétrica, para estudar o efeito de diferentes métodos de adulteração no atum. Foram adicionados ao atum sais de nitrito e nitrato, bem como diferentes extratos vegetais (beterraba e rabanete) e ainda ácido ascórbico. Adicionalmente, foram realizadas análises cromatográficas das concentrações de nitritos e nitratos para avaliar a sua influência na cor final do atum.

Após a adição de extratos vegetais, não se verificou quantidades significativas de nitratos no atum, enquanto que a adição de nitrito e nitrato resultou na deteção de teores elevados neste tipo de matriz alimentar. No que diz respeito à cor, os dois tratamentos foram especialmente evidentes, nomeadamente a adição de sais de nitritos e a adição de extractos de beterraba. Ambos forneceram uma cor mais avermelhada tendo em conta a amostra controlo (sem adulteração). Desta forma, concluíram que estes dois tipos de adulteração foram as que apresentaram resultados mais visíveis, escondendo o processo natural da evolução da cor no pescado. O método colorimétrico verificou que o atum apresenta uma tonalidade mais púrpura quando adulterado com extratos de beterraba.

Esta investigação comprovou que a análise colorimétrica é uma ferramenta muito útil no domínio da deteção de fraudes no atum, uma vez que permite obter dados *in situ* de forma rápida e económica.

6. Validação de um Método Analítico

Cada vez mais é exigida e reconhecida a necessidade de evidenciar a qualidade de um método analítico, embora este possa envolver a presença de possíveis erros (sistemáticos ou aleatórios) e, conseqüentemente, a eventual alteração significativa do valor do resultado final (Valentini, Sommer, & Matioli, 2007).

Segundo a Norma NP EN ISO/IEC 17025, entende-se por validação a confirmação das condições particulares relacionadas com uma específica utilização, avaliando o cumprimento dos requisitos através de exames e evidência objetiva indicada. A validação de um método analítico pode ser realizada através de uma avaliação direta ou indireta dos parâmetros

estudados e deve englobar as questões e mudanças nas quais um órgão reconhecido ainda não tenha validado (Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal, 2000).

A validação de um método analítico é o processo pelo qual é estabelecido, por meio de estudos laboratoriais, que as características de desempenho do procedimento satisfazem os requisitos para as aplicações analíticas pretendidas. Garante que o método analítico é aplicado da melhor forma possível, oferecendo a garantia de qualidade do resultado analítico (Brito, et al, 2003).

A validação consiste num processo continuado, podendo haver a necessidade de ser revalidada caso haja modificações nas características do método já normalizado e validado ou alteração da amostra analisada. Para comprovar a validação do método analítico é necessário garantir a análise de alguns critérios de desempenho (Thompson, Ellison, & Wood, 2002; Martins, 2016).

A validação da metodologia analítica referente à análise de nitratos e nitritos tem de seguir os pressupostos do Regulamento (CE) nº 1882/2006 que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de nitratos em determinados géneros alimentícios, como também os artigos 1 e 2 do Anexo III do Regulamento (CE) nº 882/2004 Do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de abril de 2004 e os respetivos critérios de desempenho.

6.1. Validação Indireta

Dependendo do método a validar, é fundamental estudar diferentes parâmetros característicos de cada método, tais como: especificidade/seletividade; sensibilidade, linearidade, limiares analíticos de deteção e quantificação e gama de trabalho; precisão, que abrange a repetibilidade, a precisão intermédia e a reprodutibilidade; exatidão e robustez; e critério da incerteza dos resultados (Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal, 2000; Coordenação Geral de Acreditação, 2010; González & Herrador, 2007).

6.1.1. Especificidade/Seletividade

A seletividade é a capacidade de um método identificar e distinguir um analito em particular numa mistura complexa sem interferência dos outros componentes. Esta característica é essencialmente função do princípio de medida utilizado, mas depende, no

entanto, do tipo de compostos a analisar (Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal, 2000).

Diz-se que um método é específico quando permite discriminar o analito relativamente a outras substâncias, eventualmente presentes na amostra a analisar, ou seja, quando oferece garantias que a grandeza medida provém apenas do analito. Assim, será necessário averiguar a possível interferência de outras substâncias eventualmente presentes na amostra, utilizando para o efeito uma amostra complexa (multi-componente) (Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal, 2000).

Para avaliar as interferências poder-se-á realizar um teste de recuperação utilizando uma série de amostras, com a mesma matriz, em que apenas varia a concentração do analito em proporções bem conhecidas e ao longo de toda a gama de trabalho. Convém que as amostras sejam analisadas em duplicado e em condições de repetibilidade (Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal, 2000).

O método instrumental é classificado como específico quando determina a separação de somente uma substância de interesse, e verifica-se apenas para a deteção por espectrometria de massa e como seletivo ao determinar a presença de várias substâncias químicas.

6.1.2. Quantificação

6.1.2.1. Sensibilidade

A sensibilidade do método analítico tem por definição determinar a capacidade de um método em distinguir pequenas diferenças de concentração do analito.

O cálculo pode ser feito conforme a derivada de primeira ordem da curva de calibração de um intervalo da concentração. Considerando a curva de calibração um modelo linear, este parâmetro permanecerá constante ao longo do intervalo de trabalho e o seu valor poderá ser determinado através do declive da reta de calibração (Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal, 2000).

A avaliação deste parâmetro é bastante importante, principalmente quando se pretende: avaliar a sua evolução ao longo do tempo; comparar a sensibilidade de vários métodos para

um mesmo analito, baseados em modelos lineares; ou comparar a sensibilidade do método para os vários analitos (Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal, 2000).

Contudo, a capacidade da sensibilidade está associada à capacidade de resposta do analito que, por sua vez, não se deve deixar confundir com o limite de deteção, este que se apresenta como a menor concentração de analito detetada (Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal, 2000; Thompson, Ellison, & Wood, 2002).

6.1.2.2. *Curva de Calibração/Linearidade*

A linearidade de um método define-se como a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito dentro de uma determinada faixa de concentração de trabalho.

Geralmente, é obtida por uma equação da reta, e a relação linear descrita pela mesma só é válida num determinado intervalo de massa ou concentração da espécie medida. Esta deve ser definida, no mínimo, por cinco ou seis pontos diferentes, não incluindo o zero/branco devido aos possíveis erros associados (Coordenação Geral de Acreditação, 2010; European Medicines Agency, 2012; Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal, 2000; Ribani, Bottoli, Colins, Jardim, & Melo, 2004).

Quando o sinal produzido é diretamente proporcional à concentração do analito, dentro da gama de trabalho, diz-se apresentar linearidade. Esta linearidade é padronizada e expressa usando o método matemático da regressão linear, de forma a ser mais acessível determinar a concentração do analito na amostra real, através da seguinte equação:

$$Y = mx + b$$

O “Y” corresponde ao sinal detetado (absorbância, área do pico, altura do pico), “x” à concentração do analito, “m” o declive da reta e “b” a interseção com o eixo, quando $x = 0$ (Rebelo, 2019).

A análise de correlação linear é uma das formas de verificar a linearidade da curva de calibração. O coeficiente de correlação (R) estabelece a interdependência entre sequências de dados entre o sinal medido e a concentração do padrão correspondente, enquanto o coeficiente de determinação (R^2) traduz a adequabilidade do modelo linear aos valores experimentais, ou seja, a variabilidade explicada pelo modelo. Quanto mais próximos de 1,0,

menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados.

6.1.2.3. *Limiares analíticos de deteção e quantificação*

Limite de Deteção (L.D.)

O limite de deteção consiste no teor mínimo medido a partir do qual é possível detetar a presença do analito com uma certeza estatística razoável. Ou seja, é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detetado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.

A existência de uma leitura inferior ao limite de deteção não significa a ausência do analito, apenas se pode considerar que a concentração do componente é inferior ao valor do limite de deteção (Brito et al, 2003; Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal, 2000).

Limite de Quantificação (L.Q.)

O limite de quantificação, define qual a menor concentração de analito que é possível quantificar, associado a uma determinada exatidão e precisão consideradas aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (Brito et al, 2003; Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal, 2000).

6.1.2.4. *Gama de Trabalho*

A gama de trabalho é o intervalo de concentrações correspondente à curva de calibração onde o analito pode ser determinado com boa linearidade, precisão e exatidão através de um método analítico. Para a realização da curva de calibração, deve-se ter em conta que é necessário a análise de pelo menos, 5 níveis de concentração dos padrões de calibração, no intervalo de concentrações onde preciso dar resposta, não contando com o zero da curva, de forma a não se associarem erros aleatórios. O limite mínimo de concentrações corresponde ao limite de quantificação, e o limite máximo corresponde, normalmente, ao limite de linearidade.

Este estudo deve ser efetuado durante a fase de aprovação/implementação do método e sempre que se prove a sua necessidade.

Pela norma ISO 8466-1, são recomendadas 10 réplicas, correspondentes aos pontos extremos da gama de concentração. De modo a averiguar a viabilidade da gama de trabalho, é realizado um teste de homogeneidade de variâncias que consiste na determinação das variâncias dos padrões das soluções de concentração inferior e superior, ou seja, o primeiro e o último da reta de calibração (Rebelo, 2019).

6.1.3. *Precisão*

Este parâmetro visa a avaliação da dispersão dos resultados obtidos em ensaios independentes repetidos para a mesma amostra ou em padrões, em determinadas condições. Assim, é possível verificar se o método tem capacidade de repetir e reproduzir os resultados obtidos em análises sobre a mesma amostra/padrão. É recomendado o uso de amostras reais, de modo a minimizar o efeito matriz que pode influenciar os resultados obtidos bem como a avaliação da precisão.

A precisão pode ser avaliada de três formas, designadas por repetibilidade e precisão intermédia, para avaliar a variabilidade intralaboratorial, e reprodutibilidade ou variabilidade interlaboratorial.

Convém referir que geralmente a precisão varia com a gama de concentrações (Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal, 2000).

6.1.3.1. *Repetibilidade*

Este critério tem por objetivo relatar a precisão de um método analítico a partir de análises realizadas sobre a mesma amostra ou padrão, realizadas no mesmo laboratório, nas mesmas condições laboratoriais, pelo mesmo analista e no mesmo dia. Sugere-se a realização de cerca de 10 medições na mesma amostra/padrão com diferentes concentrações, de forma a abranger toda a gama de trabalho (Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal, 2000; Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, 2007).

6.1.3.2. *Precisão Intermédia*

A precisão intermédia avalia a precisão do método utilizando a mesma amostra ou padrões, e utilizando o mesmo método analítico, mas variando algumas condições experimentais, como o analista, o equipamento, a marca dos reagentes utilizados, realizado no mesmo laboratório ao longo de um período curto de tempo (por exemplo, uma semana). É

conhecida como a medida mais representativa da variabilidade dos resultados experimentais, sendo a mais aconselhável a ser adotada (Coordenação Geral de Acreditação, 2010; Ribani, et al, 2004; Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal, 2000).

Para calcular este parâmetro é necessário realizar medições em replicado, duplicado ou ensaio único sobre a amostra, nas condições pré-definidas, abrangendo uma determinada gama de concentrações (Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal, 2000). Pode-se determinar a precisão intermédia de várias maneiras, consoante o ensaio e o tipo de aplicação do estudo deste parâmetro (Coordenação Geral de Acreditação, 2010; Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal, 2000).

6.1.3.3. *Reprodutibilidade*

A reprodutibilidade avalia a precisão interlaboratorial, a precisão de um método analítico realizado sob diferentes condições laboratoriais (por exemplo, reagentes, equipamento, colunas), por diferentes analistas, em diferentes laboratórios, por um período de tempo prolongado. Este parâmetro é utilizado para a validação de um método analítico realizado por vários laboratórios ou quando um laboratório necessita de verificações de cumprimento dos seus métodos por comparação de dados validados por outro(s) laboratório(s) (Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal, 2000; Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial, 2007).

6.1.4. *Exatidão*

A exatidão de um método analítico permite avaliar a proximidade entre o valor obtido pelo método de análise e o valor de referência convencionalmente aceite como verdadeiro. Este parâmetro, que está dependente de erros sistemáticos, pode ser estimado com base na realização de ensaios de recuperação, na análise de materiais de referência certificados (MRC) e na participação em ensaios interlaboratoriais.

Os ensaios de recuperação são muito importantes na análise qualitativa da resposta analítica obtida em inúmeras matrizes, devendo ser efetuados regularmente e ao longo de toda a gama de trabalho.

O conceito “recuperação” reflete a relação entre a quantidade de analito recuperada no método analítico face à quantidade real presente na amostra. A recuperação do analito pode ser avaliada com recurso à análise de amostras fortificadas com uma quantidade conhecida de

um padrão ou uma substância modificada isotopicamente que represente o comportamento do analito de interesse. As amostras são analisadas posteriormente, sendo determinada a percentagem de recuperação. O objetivo da percentagem de recuperação consiste na verificação da existência de efeitos sistemáticos introduzidos por causas desconhecidas, também conhecido por efeito de matriz (Coordenação Geral de Acreditação, 2010; Ribani, Bottoli, Colins, Jardim, & Melo, 2004).

6.1.5. *Robustez*

A robustez de um método analítico é definida como a capacidade do método produzir o mesmo resultado, mantendo o seu desempenho analítico inalterável, perante pequenas variações das condições experimentais. Assim, é considerado que um método é robusto quando é insensível a estas pequenas alterações (Brito, Junior, Polese, & Ribeiro, 2003; Coordenação Geral de Acreditação, 2010; Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal, 2000; Ribani, Bottoli, Colins, Jardim, & Melo, 2004).

Uma forma de determinar a robustez de um método é através do teste de *Youden*, o qual realiza a variação de 7 diferentes situações dentro de 8 ensaios realizados, permitindo assim, a ordenação das influências relacionadas a cada variação no resultado e a indicação do tipo de influência que cada variação sofre (Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal, 2000; Ribani, Bottoli, Colins, Jardim, & Melo, 2004).

A robustez de um método implica maior insensibilidade de fatores experimentais deliberadamente alterados, o que faz com que o método continue a conduzir a valores concordantes, apesar das alterações efetuadas. Ou seja, quanto maior a robustez de um método, maior a confiança do mesmo quanto à sua precisão intra e interlaboratorial.

7. *Material e Métodos*

7.1. *Caracterização e processamento das amostras*

As amostras utilizadas para a deteção e quantificação de nitritos e nitratos foram as mesmas que as utilizadas para a análise parasitológica.

Para que a caracterização e análise das amostras fosse eficaz, o código de identificação utilizado na análise parasitológica foi convertido para fins da análise química, considerando-se o estabelecimento e a data da recolha de cada dose. A conversão pode ser analisada na Tabela

5. Considerando o supracitado, as características organolépticas e físicas das amostras são as mesmas descritas na Tabela I do ponto 6.1. do Capítulo II desta dissertação.

Tabela 5. Tabela de Conversão de Código de Identificação das Amostras

Estabelecimento	Data de colheita	Identificação das doses para detecção parasitológica	Identificação das doses para detecção e quantificação de nitratos e nitritos
1	15/06/2021	P01#1	→ N01
2	31/05/2021	P02#1 a P02#3	→ N02
3	04/05/2021	P03#1 a P03#3	→ N03#1
	06/05/2021	P03#2 a P03#3	→ N03#2
4	19/05/2021	P04#1 a P04#3	→ N04#1
	15/06/2021	P04#4	→ N04#2
5	09/06/2021	P05#1	→ N05
6	10/05/2021	P06#1 a P06#3	→ N06#1
	15/06/2021	P06#4	→ N06#2
7	15/06/2021	P07#1 a P07#3	→ N07
8	26/05/2021	P08#1 a P08#3	→ N08
9	09/06/2021	P09#1	→ N09
10	14/05/2021	P10#1 a P10#3	→ N10#1
	15/06/2021	P10#4	→ N10#2
11	09/06/2021	P11#1	→ N11
12	12/05/2021	P12#1 a P12#3	→ N12#1
	15/06/2021	P12#4	→ N12#2
13	21/05/2021	P13#1 a P13#3	→ N13

As amostras foram trituradas e homogeneizadas no laboratório de Investigação de Bromatologia na FFUC. Para tal fim, utilizou-se uma picadora, mais comumente conhecida como “equipamento I 2 3” (Figura I9). Das 35 doses recolhidas inicialmente, homogeneizou-se as que foram recolhidas no mesmo dia e relativas ao mesmo estabelecimento, ampliando-se o valor representativo da amostra. Da junção das doses e respetiva trituração, obteve-se um total de 18 amostras finais que, posteriormente, foram colocadas a temperaturas de congelação.



Figura 19. Equipamento de trituração

Seguidamente, as amostras foram transportadas para o laboratório da ALS Global, sito em Tondela, onde foram analisadas. O transporte assegurou todas as condições para que as amostras se mantivessem a temperaturas entre os 0 e os 4°C, cumprindo com o disposto no Regulamento (CE) n°1882/2006 da Comissão de 19 de dezembro de 2006, que estabelece métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de nitratos em determinados géneros alimentícios.

O laboratório da ALS Global, localizado em Tondela, é acreditado pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC), de acordo com a Norma NP EN ISO/IEC 17025. A determinação de nitratos e nitritos em produtos cárneos, derivados e vegetais (124.1) é feita seguindo o método de ensaio da norma EN 12014-4 de 2005 (Instituto Português de Acreditação, 2022).

Para a deteção de nitratos e nitritos nas amostras em estudo foi utilizado o método de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC) com deteção de fotodiodos (PDA). A fase móvel utilizada foi desenvolvida no laboratório, utilizando-se 85 mL de solução tampão, 625 mL de Acetonitrilo, 4 L de água destilada Milli-Q e Ácido Clorídrico (HCl) (com efeito de ajuste do pH para 6,60), até se perfazer 5L. As análises foram feitas em duplicado.

Em todas as etapas, cumpriu-se com o disposto no Regulamento (CE) n° 1882/2006 Da Comissão de 19 de dezembro de 2006, referente aos métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de nitratos em determinados géneros alimentícios, como

também os artigos 1 e 2 do Anexo III do Regulamento (CE) n° 882/2004 Do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de abril de 2004 relativo aos controlos oficiais realizados para assegurar a verificação do cumprimento da legislação relativa aos alimentos para animais e aos géneros alimentícios e das normas relativas à saúde e ao bem-estar dos animais.

7.2. *Preparação das Amostras em laboratório*

No dia anterior a cada análise, procedeu-se ao descongelamento das amostras a temperaturas de refrigeração. Pesou-se 10 g de cada amostra e colocou-se em frascos estéreis. Foram também preparados, o ensaio em “branco” dos reagentes, o ensaio em “branco” da amostra e dois níveis de fortificação com os analítos em estudo.

Em cada frasco de amostra, foram adicionados 50 mL de água destilada Milli-Q a uma temperatura de 50°C a 60°C. De seguida procedeu-se à agitação durante 10 minutos e transferência para um balão volumétrico de 200 mL.

Foram adicionados 50 mL de acetonitrilo em cada amostra, e posteriormente foi aferido o volume a 200 mL com a água destilada Milli-Q.

7.3. *Extração e Filtração*

Estas soluções foram posteriormente filtradas com papel de filtro e após filtração foi retirada uma alíquota de 5 mL para recipientes esterilizados (Figura 20).

Antes da análise, as amostras foram filtradas através de um filtro de tamanho de partícula de aproximadamente 0,22 µm para os vials para posterior análise por UPLC.



Figura 20. Amostras filtradas

7.4. Preparação das soluções padrão de calibração

As soluções-padrão-trabalho foram preparadas a partir da solução padrão-mãe em três balões volumétricos de 200 mL. Estas soluções foram utilizadas para construir a curva de calibração. Foi também preparada a solução de padrão-controlo, também com água destilada Milli-Q.

Todas estas soluções foram sujeitas ao processo de filtração através do filtro com tamanho de partícula de aproximadamente 0,22 μm e ao processo de degaseificação. As soluções foram colocadas em *vials*, prontas para serem introduzidas no sistema cromatográfico.

Antes de se proceder à análise cromatográfica das amostras, procedeu-se à calibração do equipamento UPLC-PDA, realizando uma curva de calibração com as soluções-padrão.

7.5. Análise por UPLC-PDA

As amostras foram analisadas no equipamento UPLC-PDA, e foram tidos em consideração os seus critérios de desempenho e aceitação dos resultados, demonstrando-se tudo conforme.

8. Resultados e Discussão

Atendendo a que as análises foram realizadas num laboratório acreditado pelo Instituto Português de Acreditação, a metodologia analítica foi previamente validada.

Após a execução das análises conforme a norma EN 12014-4 de 2005, foram analisados os resultados das amostras (Figura 21). Tendo em conta os L.Q. do método, de 15 mg/Kg para os nitritos e de 30 mg/Kg para os nitratos, não foi detetada a sua presença nas amostras analisadas.

Ensaio/Método	Resultado	Unidade
Nitritos <i>EN 12014-4:2005</i>	<15 (L.Q.)	mg(NaNO ₂)/Kg
Nitratos <i>EN 12014-4:2005</i>	<30 (L.Q.)	mg(NaNO ₃)/kg

Figura 21. Resultado relatório deteção de Nitratos e Nitritos

Verificou-se que não houve adição de nitratos e nitritos no *sashimi* de atum e que efetivamente a cor e o aspeto de frescura das amostras correspondiam a uma realidade não adulterada.

Seria pertinente fazer uma comparação de resultados com outros estudos científicos realizados, todavia na literatura científica, são escassos os estudos científicos que abordam esta temática. O único estudo científico que efetivamente comprovou haver adulteração do atum pela adição de nitritos, foi elaborado por Niederer, et al (2019), na Suíça, no qual, através de um estudo de mercado, foram analisadas 13 amostras de atum originárias do Vietname, 7 testaram negativo e 6 testaram positivo com valores compreendidos entre 90 a 1130 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de N_2O .

Os resultados são positivos na ótica da segurança alimentar, da proteção da saúde do consumidor e, conseqüentemente, da saúde pública. Como já antes referido, a ingestão de nitratos e nitritos através dos alimentos pode oferecer riscos toxicológicos à saúde humana (Bloedow, 2012). Conforme o Regulamento (CE) nº 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de dezembro de 2008, os nitratos e nitritos não estão autorizados como aditivos alimentares neste tipo de matriz alimentar. Estes compostos, quando adicionados ao atum, adulteram a sua cor, encobrendo a sua inferior qualidade e conseqüentemente os níveis de histamina que são formados a partir da oxidação do pescado, podendo por em risco os consumidores, uma vez podem provocar reações alérgicas, conhecidas pela síndrome de “escombroides”, que entre outros sintomas, pode provocar intoxicação, problemas dermatológicos, problemas respiratórios, problemas gastrointestinais e no pior dos cenários, se não forem administrados anti-histamínicos, levar à morte (European Commission, 2017; Cerio, Barrutia-Borque, & Gardezabal-García, 2016).

O facto de os resultados serem negativos, não descarta a possibilidade de estarem presentes nas amostras quantidades residuais de nitritos e nitratos que apresentem valores inferiores aos L.Q. do método e, desta forma, não conseguirem ser quantificadas pela metodologia analítica utilizada. Sabe-se que, ainda que, os produtos de pesca não sejam geralmente conhecidos como fontes naturais de nitratos e nitritos, são seres vivos muito suscetíveis à intoxicação por estes compostos, principalmente devido à sua presença na água. (Chiesa, Arioli, Pavlovic, Villa, & Panseri, 2019; Kalaycioğlu & Erim, 2016). Desta forma e de acordo com Hambridge (2002), o valor médio de nitratos no pescado é de 5 mg/kg e quando se trata de nitrito a concentração é inferior, sendo o valor médio detetável de 0,5 mg/kg .

Tendo em conta os parâmetros organoléticos das amostras, notou-se que a maioria apresentava uma cor avermelhada indicativa, por norma, de que o atum se encontrava fresco. Numa futura investigação seria relevante realizar uma análise colorimétrica das amostras, tal como descrito por Saez-Hernande, et al (2022), desta forma, poder-se-ia determinar com maior eficácia, se a cor do atum se encontrava adulterada, tendo como referência a cor natural característica do atum. Num trabalho de investigação futuro, será também importante realizar simultaneamente a determinação dos níveis de histamina presentes no pescado (Cerio, Barrutia-Borque, & Gardeazabal-García, 2016).

Os resultados dos parâmetros organoléticos, nomeadamente a cor do pescado, da quantificação de nitritos e nitratos e de histamina, permite uma análise mais completa e rigorosa das amostras em estudo.

O facto das peças de *sashimi* de atum terem vindo acompanhadas com alguns vegetais cortados em porções muito finas, tais como a alface, nabo, pepino, alho francês, agrião, cebolinho, folha de bambu, gengibre, entre outros, fez com que surgisse a hipótese de ocorrência de uma eventual contaminação por nitratos e nitritos, aquando da preparação das amostras. Como já foi referido, os vegetais, principalmente a alface, contêm naturalmente estes compostos (Hsu, Arcot, & Lee, 2009; Iammarino, Taranto, & Cristino, 2013; Miyazawa, Khatounian, & Odenath-Penha, 2001). Tendo em conta que os valores foram todos inferiores aos L.Q., a existência de uma possível contaminação, seria em escala residual, uma vez que, não foi detetada mediante a metodologia analítica utilizada.

Em síntese, os resultados obtidos são garantia da qualidade do atum fresco utilizado na confeção de *sashimi* de atum nos restaurantes de gastronomia japonesa, localizados no concelho de Coimbra, e que participaram neste estudo.

Capítulo IV. Conclusões e Considerações Finais

Numa primeira fase desta dissertação, a ideia foi efetuar uma análise parasitológica ao *sashimi* de atum comercializado nos estabelecimentos de gastronomia japonesa sediados no concelho de Coimbra. Surgiu no sentido de dar continuidade à investigação anteriormente elaborada pela orientanda no decorrer da sua licenciatura, intitulada “*Segurança Alimentar no consumo de pescado cru com valência para a produção de sushi*”. Posteriormente, surgiu a hipótese de se realizar um outro estudo nas mesmas amostras, referente à determinação de nitratos e nitritos adicionados ao atum, de extrema importância no que respeita à segurança alimentar. Desta forma, procedeu-se a um trabalho conjunto, procurando abordar duas temáticas fundamentais, nomeadamente, a contaminação parasitológica por *Anisakis* e *D. latum* e a fraude alimentar por adição de nitratos e nitritos ao atum.

Os domínios anteriormente referidos relacionam-se com as problemáticas atuais mais relatadas face ao consumo de *sashimi* e à venda do atum fresco. A contaminação parasitológica de pratos à base de pescado cru e a adição fraudulenta de nitratos e nitritos no atum, têm sido reportadas de forma corrente em vários países, incluindo Portugal, conforme referido na revisão bibliográfica.

Com a finalidade de alcançar o objetivo pretendido desta dissertação, realizou-se a análise parasitológica, com recurso às metodologias de observação visual direta, “*Candling*” e PCR, e no âmbito do controle da fraude alimentar, foi realizada a determinação de nitratos e nitritos com recurso à metodologia UPLC-PDA, de acordo com a norma EN 12014-4 de 2005.

Como resultado da análise parasitológica, concluiu-se que das 140 amostras de *sashimi* de atum analisadas, nenhuma evidenciou qualquer tipo de contaminação por *Anisakis* e *D. Latum*. Complementarmente, os resultados obtidos, relativos à determinação de nitratos e nitritos nas mesmas amostras, demonstraram não ter ocorrido a adição ilegal destes aditivos alimentares.

Os resultados deste estudo indicam que, nos estabelecimentos típicos de gastronomia japonesa, sites no concelho de Coimbra e utilizados neste estudo, o atum utilizado para confeccionar o *sashimi* encontra-se em conformidade, consoante os parâmetros analisados, não pondo em risco a saúde dos consumidores, garantindo, assim, a segurança alimentar nos domínios estudados. Refira-se que, no entanto, e por não ser alvo de estudo, o atum poderá conter qualquer outro componente microbiológico e/ou químico que seja potencialmente prejudicial à saúde humana.

No âmbito do controle da fraude alimentar, tendo como objetivo primordial avaliar a frescura deste pescado, sugere-se que numa futura investigação, esta seja complementada com uma análise colorimétrica, que permita avaliar com maior exatidão a cor das amostras e detetar a sua adulteração, juntamente com a análise dos teores de histamina, indicador da deterioração do atum. O cruzamento destes resultados permitirá uma avaliação mais completa da qualidade do atum fresco.

Em termos globais, há poucos estudos científicos publicados que fazem referência a estes temas, salientando a pertinência desta investigação. Em Portugal, os estudos que envolvem a análise de parasitas no pescado, inclusive em *sushi* e *sashimi*, têm sido pouco desenvolvidos ao longo dos anos. Em relação à investigação da presença de nitratos e nitritos no atum que faz referência à fraude alimentar pela adição fraudulenta e ilegal destes compostos, a presente investigação torna-se pioneira a nível nacional.

Sendo Portugal, até à data, considerado o maior consumidor de pescado da UE (59.91 kg/hab/ano), e o atum o pescado mais consumido *per capita* (3.10 kg/hab/ano), torna-se fundamental e premente promover e apoiar a investigação que envolva este pescado.

Apesar do pescado cru ser, há muito tempo, um alimento ingerido principalmente pela comunidade japonesa, este tem vindo a expandir-se globalmente, sendo muitas das vezes caracterizado como um alimento moderno e saudável, porém com muitas questões e mitos associados à sua segurança. Urge aprofundar e explorar estas questões para desmistificar e/ou comprovar as perceções e opiniões dos consumidores que são muito controversas pela ausência de informação atual e coerente. Todavia, torna-se um desafio constante, a elaboração de sistemas de segurança alimentar para fazer face aos riscos inerentes aos atuais hábitos de consumo alimentar por parte da sociedade em geral.

Concluindo, é imperioso dar continuidade aos trabalhos de investigação no domínio da segurança alimentar e em particular na investigação da qualidade e segurança do atum, tema desta dissertação. É também de primordial importância implementar ações de sensibilização dirigidas a diferentes públicos-alvo, designadamente aos manipuladores de alimentos, com o intuito de se conseguir um efetivo incremento de boas práticas no decorrer da inspeção, armazenamento, preparo e confeção do pescado cru, como também aos profissionais de saúde, visando uma adequada transmissão de informação e à população em geral, alertando

para os benefícios e riscos no decorrer do seu consumo, tendo sempre como objetivo último a garantia da segurança alimentar.

Finalize-se, identificando a dimensão e representatividade da amostra, como limitação à investigação dada a exigência dos recursos necessários utilizados na aquisição das amostras de *sashimi* provenientes dos estabelecimentos através da colheita efetuada por *take-away*. Efetivamente, não foi possível fazer a recolha das amostras, como pretendido inicialmente. O desejável seria, a obtenção de 3 colheitas iguais em 3 momentos diferentes para que os resultados fossem mais representativos. Considerou-se, ainda, adquirir os géneros alimentícios através de parcerias com os estabelecimentos, que, apesar de se considerar ser uma mais-valia para os mesmos, notou-se uma certa resistência e receio pelos resultados, tornando-se inviável esta proposta.

Referências Bibliográficas

- Abiyu, M., Mekonnen, G., Hailay, K., & Haftu, M. G. (2020). Prevalence of Internal Nematode Parasites of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Fish Species caught from Southwestern Part of Lake Tana, Central Gondar, Ethiopia. *J. Aquac. Res. Development*, 11(582).
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2011). *Nitrates and Nitrites*. U.S. Department of Health and Human Services.
- Aibinu, I. E., Smooker, P. M., & Lopata, A. L. (2019). Anisakis Nematodes in Fish and Shellfish- from infection to allergies. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 9, 384-393.
- Alcântara, B. M. (2009). *QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA DE SUSHI E SASHIMI SERVIDOS EM RESTAURANTES DA CIDADE DE FORTALEZA: modismo alimentar e risco à saúde*.
- Anantanawat, S., Kiermeier, A., McLeod, C., & Sumner, J. (2012). *A Semi-Quantitative Risk Assessment of Harmful Parasites in Australian Finfish*. South Australian Research & Development Institute.
- Andreoletti, O., Budka, H., Buncic, S., Collins, J. D., Griffin, J., Havelaar, A., . . . E. Vanopdenbosch. (2010). Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products. *EFSA Journal*, 8(4), 1543.
- Aquino, C. M., Rollemberg, N. d., Silva, B. A., Runtzel, C. L., Silva, N. C., & Scussel, V. M. (2019). Diferentes parasitas em produtos de pesca: Uma revisão. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, 13(2), 266 – 288.
- Assembly of Life Science. (1981). The health effects of nitrate and N-Nitroso compounds. *National Academy Press*.
- Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal. (2000). *Guia RELACRE 13 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS INTERNOS DE ENSAIO EM ANÁLISE QUÍMICA*.
- Atlas da Saúde. (29 de setembro de 2017). *Portugal afetado por fraude do atum adulterado com nitratos*. Obtido de Atlas da Saúde: <https://www.atlasdasaude.pt/publico/content/portugal-afetado-por-fraude-do-atum-adulterado-com-nitratos>
- Audicana, M. T., & Kennedy, M. W. (2008). Anisakis simplex: from Obscure Infectious Worm to Inducer of Immune Hypersensitivity. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(2), 360-379.
- Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. (2007). *Nitratos*. Obtido de Autoridade de Segurança Alimentar e Económica.
- Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. (2009). *Perfil de Risco dos principais alimentos consumidos em Portugal*.
- Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. (2018). *Práticas fraudulentas na informação ao consumidor*. Obtido de Autoridade de Segurança Alimentar e Económica: <https://www.asae.gov.pt/newsletter2/asaenews-n-115-dezembro-2018/praticas-fraudulentas-na-informacao-ao-consumidor.aspx>
- Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. (2018). *Pratos à base de Pescado Cru*. Obtido de <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/conselhos->
- Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. (n.d.). *AAC-FF System*. Obtido de Autoridade de Segurança Alimentar e Económica: <https://www.asae.gov.pt/inspecao-fiscalizacao/sistemas-de-alerta-e-troca-de-informacao/aacsystem.aspx>

- Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. (n.d.). *Anisakis*. Obtido de Autoridade de Segurança Alimentar e Económica: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/anisakis.aspx>
- Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. (n.d.). *Diphyllobothrium latum*. Obtido de Autoridade de Segurança Alimentar e Económica: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-biologicos/diphyllobothrium.aspx>
- Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. (n.d.). *O que é a Fraude Alimentar?* Obtido em 24 de 5 de 2022, de Autoridade de Segurança Alimentar e Económica: <https://www.asae.gov.pt/inspecao-fiscalizacao/fraude-alimentar/o-que-e-a-fraude-alimentar.aspx>
- Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. (n.d.). *Perigos de Origem Alimentar*. Obtido de Autoridade de Segurança Alimentar e Económica: <https://www.asae.gov.pt/cientifico-laboratorial/area-tecnico-cientifica/perigos-de-origem-alimentar.aspx>
- Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. (n.d.). *RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed)*. Obtido de Autoridade de Segurança Alimentar e Económica: <https://www.asae.gov.pt/inspecao-fiscalizacao/sistemas-de-alerta-e-troca-de-informacao/rasff.aspx>
- Barber, K., & Takemura, H. (2008). *Sushi – Taste and Technique*. DK Publishing (Dorling Kindersley).
- Bataier, M. N., Tozzetti, D. S., & Neves, M. F. (2009). ANISAQUIOSE. *Revista Científica eletrônica de Medicina Veterinária*(12).
- Bernardo, S., & Castro-Poças., F. (2018). Gastric anisakiasis. *Gastrointestinal Endoscopy*, 88, 766–767.
- Beveridge, M., Phillips, M., Dugan, P., & Brummet, R. (2010). *Barriers to aquaculture development as a pathway to poverty alleviation and food security*. Advancing the Aquaculture Agenda.
- Bloedow, M. d. (2012). *Análise do cardápio de uma empresa de refeições coletivas em relação à oferta de nitrato de nitrito aos seus consumidores no Estado do Rio Grande do Sul*. Trabalho de conclusão de especialização.
- Bradberry, S. (2012). Methaemoglobinaemia. *Medicine*, 40(2), 59-60.
- Branen, A. L., Davidson, P. M., Salminen, S., & Ill, J. H. (2001). *Food Additives Second Edition*. Marcel Dekker, Inc.
- Brito, N., Junior, O. P., Polese, L., & Ribeiro, M. L. (2003). Validação De Métodos Analíticos: Estratégia E Discussão. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 13, 129-146.
- Bryan, N., & Ivy, J. (2015). Inorganic Nitrite and Nitrate: Evidence to Support Consideration as Dietary Nutrients. *Nutrition Research*, 35(8), 643–654.
- Buchtova, H., Dordevic, D., Duda, I., Honzlova, A., & Kulawik, P. (2019). Modeling Some Possible Handling Ways with Fish Raw Material in Home-Made Sushi Meal Preparation. *Foods*, 8(10).
- Burity, V., Franceschini, T., Valente, F., Recine, E., Leão, M., & Carvalho, M. d. (2010). *Direito Humano à Alimentação Adequada*. Brasília: Ação Brasileira pela Nutrição e Direitos Humanos (ABRANDH).
- Capuano, D. M., Okino, M. H., Mattos, H. R., & Torres, D. M. (2007). Diphyllobothriasis: a case report of a human infection in Ribeirão Preto, SP, Brazil. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 39(3), 163-164.

- Carlsson, S., Wiklund, N. P., Engstrand, L., Weitzberg, E., & Lundberg, J. O. (2001). Effects of pH, nitrite, and ascorbic acid on nonenzymatic nitric oxide generation and bacterial growth in urine. *Nitric Oxide*, 5(6), 580-586.
- Carmo, J., Marques, S., Bispo, M., & Serra, D. (2017). Anisakiasis: a growing cause of abdominal pain! *BMJCaseReports*.
- Carvalho, C. D. (2018). *Determinação Analítica de Nitratos e/ou Nitritos em Amostras do Estudo da Dieta Total (TDS) por Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC)*. Dissertação de Mestrado, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, Lisboa.
- Castellanos, J. A., & RicardoTangua, A. (2018). First reporting of Anisakis sp. in the Armed Snook fish (*Centropomus armatus*) caught and commercialized in Buenaventura, Colombia. *Infection*, 22(3), 136-140.
- Cavalcanti, P., Fíliá, M., & Crotti, D. (2004). Infestazione da botriocefalo: descrizione di un caso e problematiche diagnostiche - A case of diphyllbothriasis: description and diagnosis. *Le Infezioni in Medicina*(4), 266-269.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (s.d.). *Diphyllobothrium latum* life cycle.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2022). *About Parasites*. Obtido de <https://www.cdc.gov/parasites/about.html#infections>
- Cerio, O. G.-D., Barrutia-Borque, A., & Gardeazabal-García, J. (2016). Scombroid Poisoning: A Practical Approach. *Actas Dermosifiliogr*, 107(7), 567-571.
- Cheung, I. (2020). *The Truth about Nitrate and Nitrite in Vegetables*. Obtido de Centre for Food Safety: https://www.cfs.gov.hk/english/multimedia/multimedia_pub/multimedia_pub_fsf_172_01.html
- Chiesa, L., Arioli, F., Pavlovic, R., Villa, R., & Panseri, S. (2019). Detection of nitrate and nitrite in different seafood. *Food Chemistry*, 288, 361–367.
- Clark, M. (2021). *Almost 80 tons of tuna seized in Belgian fraud operation*. Obtido em 24 de maio de 2022, de Food Safety News.
- Codex Alimentarius. (2013). *Código Internacional de Práticas Recomendadas - Princípios Gerais de Higiene dos Alimentos* (2 ed., Vol. 1).
- Coordenação Geral de Acreditação. (2010). *Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos - DOQ CGCRE-008*.
- Cordeiro, C., & Alves, R. O. (2018). *Arigato 10 anos de sushi em Portugal*.
- Correia, A. M. (2018). *Fraude Alimentar: fatores de risco e medidas de controlo e prevenção*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.
- Correia, M., Barroso, Â., Barroso, M. F., Oliveira, M., & Delerue-Matos., C. (2010). Contribution of different vegetable types to exogenous nitrate and nitrite exposure. *Food Chemistry*, 120(4), 960-966.
- Costa, J. C. (2015). *Validação de um método de cromatografia de alta eficiência para determinação de conservantes em géneros alimentícios*. Dissertação de Mestrado, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa.
- Costa, L. M. (2013). *O Atum em Portugal de 1896 a 2011: Contributos para a sua História Ambiental, Ecológica e Económica*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Biologia Animal e Centro de Oceanografia.

- Council of Europe. (1993). *Nitrates and nitrites in foodstuffs*. Netherlands.
- Craig, N. (2012). Fish tapeworm and sushi. *Can Fam Physician*, 58(6), 654–658.
- CRMV-MG. (2018). *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia "Inspeção e Tecnologia de Pescado"* (Vol. 89). FEPMVZ .
- Cruz, A. R., Rocha, H., & Mateus, T. L. (2015). PERIGOS ALIMENTARES NO PESCADO Os perigos químicos. *Tecnolimentar*, 56-61.
- Cunha, F. d. (2017). *ANISAQUIÁSE: REVISÃO DE UMA PARASITOSE EMERGENTE CAUSADA POR ANISAKIS SPP.*
- Daschner, A. (2016). Chapter 31: Risks and possible health effects of raw fish intake. In: *Fish and fish oil in health and disease prevention*, . *Academic Press.*, 341–353.
- De Smet, S., & Vossen, E. (2016). Meat: The balance between nutrition and health. A review. *Meat Science*, 120, 145–156.
- Dennis, M. J., Key, P. E., Papworth, T., Pointer, M., & Massey, R. C. (1990). The determination of nitrate and nitrite in cured meat by HPLC/UV. *Food Additives and Contaminants*, 7(4), 455–461.
- Dich, J., Järvinen, R., Knekt, P., & Penttilä, P. L. (1996). Dietary intakes of nitrate, nitrite and NDMA in the Finnish mobile clinic health examination survey. *Food Addit. Contam.*, 13(5), 541-552.
- Dionex. (1998). Determination of Nitrate and Nitrite in Meat Using High-Performance Anion-Exchange Chromatography. *Application Note 112*.
- Direção Geral de Alimentação e Veterinária. (12 de 01 de 2021). *RASFF*. Obtido de Direção Geral de Alimentação e Veterinária: <https://www.dgav.pt/alimentos/conteudo/sistemas-de-alerta-de-seguranca-alimentar/rasff/>
- Direção Geral de Alimentação e Veterinária. (2022). *Aditivos Alimentares*. Obtido de Direção Geral de Alimentação e Veterinária: <https://www.dgav.pt/alimentos/conteudo/generos-alimenticios/garantir-a-seguranca-dos-alimentos/aditivos-enzimas-e-aromas/aditivos-alimentares/>
- Directorate-General for Health and Food Safety . (2019). *Audit Report - Fishery products derived from tuna species - Italy (Italy 2019-6747)*.
- Directorate-General for Health and Food Safety. (2017). *Audit Report - Fishery products derived from tuna species - Spain (Spain 2017-6301)*.
- Directorate-General for Health and Food Safety. (2018). *Audit Report - Fishery products derived from tuna species - Portugal (Portugal 2018-6378)*.
- Directorate-General for Health and Food Safety. (2018). *DG Health and Food Safety 25 April 2018*.
- Directorate-General for Health and Food Safety. (2019). *Audit Report - Fishery products derived from tuna species - France (France 2018-6379)*.
- Directorate-General for Health and Food Safety. (2019). *Audit Report - Fishery products derived from tuna species - Spain (Spain 2019-6678)*.
- Dupouy-Camet, J., & Peduzzi, R. (2014). HELMINTH-TREMATODE *Diphyllobothrium*. *Encyclopedia of Food Safety*, 2, 130-133.

- Eamsobhana, P., Yong, H., Song, S., Tungtrongchitr, A., & Roongruangchai, K. (2018). Genetic differentiation of *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) in marine fish *Priacanthus tayenus* from Gulf of Thailand. *Tropical Biomedicine*, 35(3), 669-677.
- ECsafeSEAFOOD. (2017). *GUIA DE SEGURANÇA DO PESCADO PARA OS CONSUMIDORES*.
- Eslami, A., Sabokroo, H., & Ranjbar-Bahadori, S. (2011). Infection of *Anisakis* Larvae in Long Tail Tuna (*Thunnus tonggol*) In North Persian Gulf. *Iran J Parasitol*, 6(3), 96-100.
- European Commission . (2021). *Eurobarómetro Especial 515 - EU Consumer habits regarding fishery and aquaculture products - Country Factsheets Portugal - pt*.
- European Commission. (1997). Reports of the Scientific Committee for Food. 21-28.
- European Commission. (2017). *Food Fraud Network EU-Coordinated Case - Illegal treatment of Tuna: from canning grade to Sushi grade*". Health and Food Safety.
- European Commission. (2017). *RASFF annual report 2017*. Obtido de European Commission: <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/f4adf22f-4f7c-11e9-a8ed-01aa75ed71a1/language-en/format-PDF/source-174743070>
- European Commission. (2017). *The EU Food Fraud Network and the System for Administrative Assistance & Food Fraud : Annual Report 2017*.
- European Commission. (2018). *Commission launches Knowledge Centre to boost food quality and step up the fight against food fraud*. Obtido de European Commission: https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/IP_18_1744
- European Commission. (2018). *Monthly Summary of Articles on Food Fraud and Adulteration (April)*.
- European Commission. (2018). *The EU Food Fraud Network and the System for Administrative Assistance - Food Fraud (Annual Report 2018)*.
- European Commission. (2019). *The EU Food Fraud Network and the Administrative Assistance and Cooperation System (Annual Report 2019)*.
- European Commission. (2020). *The EU Agri-Food Fraud Network and the Administrative Assistance and Cooperation System (Annual Report 2020)*.
- European Commission. (2021). *2021 Annual Report Alert and Cooperation Network*.
- European Commission. (2021). *Monthly Summary of Articles on Food Fraud and Adulteration (June)*.
- European Commission. (n.d.). *Administrative Assistance and Cooperation System*. Obtido de European Commission: https://ec.europa.eu/food/safety/agri-food-fraud/administrative-assistance-and-cooperation-system_en
- European Commission. (n.d.). *Food fraud: What does it mean?* Obtido em 24 de 5 de 2022, de European Commission: https://ec.europa.eu/food/safety/agri-food-fraud/food-fraud-what-does-it-mean_en
- European Commission. (n.d.). *Health and Food Audits and Analysis*. Obtido de European Commission: https://food.ec.europa.eu/horizontal-topics/official-controls-and-enforcement/health-and-food-audits-and-analysis_pt
- European Commission. (n.d.). *The EU Food Fraud Network*. Obtido de European Commission: https://ec.europa.eu/food/safety/agri-food-fraud/eu-food-fraud-network_en

- European Food Safety Authority. (2008). Nitrate in vegetables - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain. *The EFSA Journal*, 689, 1-79.
- European Food Safety Authority. (2014). Scientific opinion on health benefits of seafood (fish and shell fish) consumption in relation to health risks associated with exposure to methylmercury. *EFSA J.*
- European Food Safety Authority. (2017). Re-evaluation of potassium nitrite (E 249) and sodium nitrite (E 250) as food additives.
- European Food Safety Authority. (2017). Re-evaluation of sodium nitrate (E 251) and potassium nitrate (E 252) as food additives.
- European Market Observatory for Fisheries and Aquaculture Products. (2020). *The EU Fish Market 2020*.
- European Market Observatory for Fisheries and Aquaculture Products. (2021). *The EU Fish Market 2021*.
- European Medicines Agency. (2012). Guideline on bioanalytical method validation, Committee for Medicinal Products for Human Use. 1-23.
- EUROPOL; INTERPOL. (2018). *Operation OPSON VII Analysis Report*.
- Fairley, J. K., & King, C. H. (2015). Tapeworms (Cestodes). *Part III Infectious Diseases and Their Etiologic Agents*.
- Farjallah, S., Slimane, B. B., Busi, M., Paggi, L., Amor, N., Blel, H., . . . D'Amelio, S. (2008). Occurrence and molecular identification of *Anisakis* spp. from the North African coasts of Mediterranean Sea. *Parasitol Res.*, 102(3), 371-379.
- Federação das Indústrias Portuguesas Agro-Alimentares. (2018). *Comissão Combate Fraude Alimentar*. Obtido de Federação das Indústrias Portuguesas Agro-Alimentares - Consumidor: <https://www.fipa.pt/consumidor/comissao-combate-fraude-alimentar>
- Feng, C. H.-I. (2012). The Tale of Sushi: History and Regulations. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(2), 205-220.
- Ferrantelli, V., Cicero, A., Costa, A., Alongi, A., Palumbo, P., Graci, S., & Giangrosso, G. (2014). Anisakidae in fishing products sold in Sicily. *Italian Journal of Food Safety*, 3(2), 47-48.
- Ferreira, I. D. (2013). *Estudo da Presença de Anisakis sp. no Polvo – vulgar (Octopus vulgaris Cuvier, 1797) na Costa Portuguesa e Análise dos Hábitos de Consumo*. Dissertação de Mestrado.
- Fewtrell, L. (2004). Drinking- water nitrate, methemoglobinemia, and global burden of disease: a discussion. *Environmental Health Perspectives*, 112(14), 1371.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2019). *Food safety is everyone's business*. Obtido de Food and Agriculture Organization of the United Nations: <https://www.fao.org/news/story/pt/item/1196961/icode/>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2020). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action*.
- Fukita, Y., Asaki, T., & Katakura, Y. (2014). Some Like It Raw: An Unwanted Result of a Sushi Meal. *Gastroenterology*, 146.

- Furlan, V. J., Silva, K. F., Cunha, J. P., Ugalde, F. Z., Silva, D. G., & Centenaro, G. S. (2020). Determinação de nitrato e nitrito em produtos cárneos: adequação à legislação. *Magistra*, 31, 559-567.
- Gandra, E. Á., Gandra, T. K., Mello, W. S., & Godoi, H. d. (2008). (A. S. Technology, Ed.) *Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos*, 30(1), pp. 109-118.
- Geiss, J. M., Heringer, F. L., & Wenzel, J. B. (2015). Efeito antimicrobiano de Wasabi Japônica sobre bactérias patogênicas e qualidade microbiológica de amostras de sushi de salmão em estabelecimentos da cidade de Toledo – PR, Brasil. *Brazilian Journal of Food Research*, 6(3), 65 – 77.
- Global Food Safety Initiative. (2018). *TACKLING FOOD FRAUD THROUGH FOOD SAFETY MANAGEMENT SYSTEMS*. Obtido de <https://mygfsi.com/wp-content/uploads/2019/09/Food-Fraud-GFSI-Technical-Document.pdf>
- GMA Science & Education Foundation. (2018). *Food and Consumer Product Fraud: Prevention and Mitigation*.
- Golden, O., Caldeira, A. J., & Santos, M. J. (2022). Raw fish consumption in Portugal: A survey on trends in consumption and consumer characteristics. *Food Control*, 135.
- Golden, O., Caldeira, A. J., Rangel, L. F., & Santos, M. J. (2022). Seafood safety and food-borne zoonoses from fish - Examining the risk of Anisakis in the Portuguese Population and Consumer Risk Perceptions of Fish Consumption. *EFSA Journal*, 20(S1).
- Gomes, T. A. (2014). *ANISAKIS SPP.: RELEVÂNCIA DA SUA PESQUISA E IDENTIFICAÇÃO EM PEIXES*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária.
- Gomes, T. L., Quiazon, K. M., Kotake, M., Itoh, N., & Yoshinaga, T. (2020). Anisakis spp. in fishery products from Japanese waters: Updated insights on host prevalence and human infection risk factors. *Parasitology International*.
- González, A. G., & Herrador, M. Á. (2007). A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trends in Analytical Chemistry*, 26(3), 227-238.
- Govari, M., & Pexara, A. (2015). Nitrates and nitrites in meat products. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 66(3), 127–140.
- Greer, F., & Shannon, M. (2005). Infant methemoglobinemia: The role of dietary nitrate in food and water. *Pediatrics*, 116(3), 784-786.
- Gustinelli, A., Menconi, V., Prearo, M., Caffara, M., Righetti, M., Scanzio, T., . . . Fioravanti, M. L. (2016). Prevalence of *Diphyllobothrium latum* (Cestoda: Diphyllobothriidae) plerocercoids in fish species from four Italian lakes and risk for the consumers. *International Journal of Food Microbiology*, 235, 109–112.
- Hambridge, T. (2002). *WHO Food Additives Series: Nitrate and Nitrite intake assessment*. Obtido de <https://inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v50je07.htm>
- Helms, C. (2018). Sustainable and transparently processed products of yellow-fin tuna. *Internationale Fachzeitschrift für die gesamte Fischwirtschaft*.
- Hochberg, N. S., & Hamer, D. H. (2010). Anisakidosis: Perils of the Deep. *51(7)*, 806-812.
- Hsu, J., Arcot, J., & Lee, N. A. (2009). Nitrate and nitrite quantification from cured meat and vegetables and their estimated dietary intake in Australians. *Food Chemistry*, 115(1), 334–339.

- Hunt, J., & Turner, M. (1994). A survey of nitrite concentrations in retail fresh vegetables. *Food Additives & Contaminants*, 11(3), 327-332.
- Iamarino, L. Z., Oliveira, M. d., Antunes, M. M., Oliveira, M. d., Rodrigues, R. O., Zanin, C. I., . . . Lima, A. A. (2015). Nitritos e Nitratos em Produtos Cárneos Enlatados e/ou Embutidos. *Gestão em Foco*(7), 246-251.
- Iamarino, M., Taranto, A. D., & Cristino, M. (2013). Endogenous levels of nitrites and nitrates in wide consumption foodstuffs: Results of five years of official controls and monitoring. *Food Chemistry*, 140(4), 763–771.
- Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge . (n.d.). *Detalhe Alimento*. Obtido de Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge : <http://www2.insa.pt/sites/INSA/Portugues/AreasCientificas/AlimentNutricao/AplicacoesOnline/TabelaAlimentos/PesquisaOnline/Paginas/DetalheAlimento.aspx?ID=IS811>
- Instituto Nacional de Estatística. (2021). *Balança Alimentar Portuguesa 2016-2020*.
- Instituto Português de Acreditação. (2022). *Anexo Técnico de Acreditação L0224-1* .
- International Agency for Research on Cancer. (2010). Ingested Nitrate and Nitrite, and Cyanobacterial Peptide Toxins. *IARC Monographs on the Evaluation of*, 45-325.
- Jaworska, G. (2004). Content of nitrates, nitrites, and oxalates in New Zealand spinach. *Food Chemistry*, 89, 235–242.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. (2002). Evaluation of certain food additives and contaminants. Fifty-ninth report of JECFA. *WHO Technical Reports Series*, 913, 20-32.
- Kalaycıoğlu, Z., & Erim, F. B. (2016). Simultaneous Determination of Nitrate and Nitrite in Fish Products with Improved Sensitivity by Sample Stacking-Capillary Electrophoresis. *Food Analytical Methods*, 9, 706–711.
- Kalaycıoğlu, Z., & Erim, F. B. (2019). Nitrate and Nitrites in Foods: Worldwide Regional Distribution in View of Their Risks and Benefits. *J. Agric. Food Chem*, 67, 7205–7222.
- Karl, H., & Leinemann, M. (1993). A fast and quantitative detection method for nematodes in fish fillets and fishery products. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 44(5), 105-128.
- Kawarazuka, N., & Béné, C. (2011). The potential role of small fish species in improving micronutrient deficiencies in developing countries: building evidence. *Public Health Nutr.*, 14(11), 1927-1938.
- Kondo, T. (2018). Woe sushi: gastric anisakiasis. *The Lancet*, 392 , 1340.
- Kulawik, P., & Dordević, D. (2020). Sushi processing: microbiological hazards and the use of emerging technologies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(5), 1270-1283.
- Laia, R., Rebelo, A., Serra, C., & Vasco, E. (2018). Teor de nitrato em produtos hortícolas e frutos consumidos ao longo do ano em Portugal. *Boletim Epidemiológico INSA*.
- Lehel, J., Yaucat-Guendi, R., Darnay, L., Palotás, P., & Laczay, P. (2020). Possible food safety hazards of ready-to-eat raw fish containing product (sushi, sashimi) . *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-22.
- Lejeune, M. (2021). *Polymerase chain reaction testing is mainly used as a confirmatory test for detecting patient parasitic infection through DNA derived from parasite stages*. Obtido de Today's Veterinary Practice: <https://todaysveterinarypractice.com/parasitology/molecular-testing-for-parasite-detection-and-disease-diagnosis/>

- Levsen, A., & Lunestad, B. T. (2010). *Anisakis simplex* third stage larvae in Norwegian spring spawning herring (*Clupea harengus* L.), with emphasis on larval distribution in the flesh. *Vet Parasitol.*, *171*(3-4), 247-253.
- Lopes, P. P. (2018). *Anisakidae e Raphidascauridae: Pesquisa, Identificação Morfológica e Molecular em Carapau (Trachurus trachurus) capturado em águas portuguesas*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária. Obtido de <http://hdl.handle.net/10400.5/16696>
- Machado, J. M., & Marques, S. M. (2014). Difilobotríase humana pelo consumo de peixe: revisão de literatura. *PUBVET*, *8*(23).
- Machado, M. (2018). *Relevância da pesquisa do Anisakis simplex no pescado fresco e da sua capacidade de migração*. Dissertação de Mestrado, Instituto Politécnico do Porto .
- Maldaner, L., & Jardim, I. C. (2012). UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. *Scientia Chromatographica 2012*, *4*(3), 197-207.
- Marigo, J., Taniwaki, S. A., Pinto, P. L., Soares, R. M., & Catão-Dias, J. L. (2015). Identificação molecular de larva de *Pseudoterranova azarasi* em bacalhau (*Gadus* sp.) vendido para consumo humano no Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, *57*(6), 537-539.
- Martins, A. (2016). *Implementação e Validação de Métodos Analíticos*. Dissertação de Mestrado.
- Mendicoa, J., Astiasarán, I., & Bello, J. (1997). Nitrate and nitrite levels in fresh and frozen broccoli. Effect of freezing and cooking. *Food Chemistry*, *58*(1-2), 39-42.
- Merino, L., Ornemark, U., & Toldrá, F. (2017). Analysis of Nitrite and Nitrate in Foods: Overview of Chemical, Regulatory and Analytical Aspects. *Adv Food Nutr Res.*, *81*, 65-107.
- Merusi, C., Corradini, C., Cavazza, A., Borromei, C., & Salvadeo, P. (2010). Determination of nitrates, nitrites and oxalates in food products by capillary electrophoresis with pH-dependent electroosmotic flow reversal. *Food Chemistry*, *120*(2), 615–620.
- Mezzari, A., & Wiebbelling, A. M. (2008). Diphyllbothriasis in Southern Brazil. *Clinical Microbiology Newsletter*, *30*(4), 28-29.
- Miguéis, S., Ramos, P., Saraiva, C., & Esteves, A. (2018). Estudo parasitológico em sashimi comercializado no norte de Portugal.
- Miyazawa, M., Khatounian, C., & Odenath-Penha, L. (2001). Teor de nitrato nas folhas de alface produzida em cultivo convencional, orgânico e hidropônico. *Agroecologia*, *23*.
- Mladineo, I., & Poljak, V. (2014). Ecology and Genetic Structure of Zoonotic *Anisakis* spp. from Adriatic Commercial Fish Species. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(4), 1281–1290.
- Mol, S., Uçok Alakavuk, D., & Ulusoy, S. (2014). Effects of modified atmosphere packaging on some quality attributes of a ready-to-eat salmon sushi. *IJFS*, *13*(2), 394-406.
- Nadler, S., & Hudspeth, D. (2000). Phylogeny of the Ascaridoidea (Nematoda: Ascaridida) based on three genes and morphology: hypotheses of structural and sequence evolution. *Journal of Parasitology*(86), 380-393.
- Niederer, M., Lang, S., Roux, B., Stebler, T., & Hohl, C. (2019). Identification of nitrite treated tuna fish meat via the determination of nitrous oxide by head space-gas chromatography/mass spectrometry [version 2; peer review: 2 approved] . *F1000Research*, *8*(711).

- Olivo, R., & Ribeiro, L. G. (2018). NOVOS CONCEITOS SOBRE NITRATOS E NITRITOS. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research*, 24(3), 115-125.
- Omar, S. A., Artime, E., & Webb, A. J. (2012). A comparison of organic and inorganic nitrates/nitrites. *Nitric Oxide*, 26(4), 229-240.
- Pascual, C. Y., Crespo, J. F., Martin, S. S., Ornia, N., Ortega, N., Caballero, T., . . . Martin-Esteban, M. (1997). Cross-reactivity between IgE-binding proteins from *Anisakis*, German cockroach, and chironomids. *Allergy*, 52(5), 514-520.
- Patrocínio, I. D. (2009). *A Segurança Alimentar no consumo de Pescado Cru com Valência para a Produção de Sushi*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.
- Pereira, A. C. (2016). *Deteção dos protozoários Giardia lamblia e Cryptosporidium sp. em saladas pré-embaladas*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Perez, M., Mingo, S., Bosch, N., Peñuela, M., & Garcia, M. (1998). Las verduras congeladas como fuente atenuada de nitratos y nitritos. *Alimentacion, Equipos y Tecnologia Enerofebrero*, 159-162.
- Piras, M. C., Tedde, T., Garippa, G., Virgilio, S., Sanna, D., Farjallah, S., & Merella, P. (2014). Molecular and epidemiological data on *Anisakis* spp. (Nematoda: Anisakidae) in commercial fish caught off northern Sardinia (western Mediterranean Sea). *Veterinary Parasitology*, 203, 237-240.
- Porto, A. A. (2010). *Contributo para a estimativa da prevalência da ingestão de edulcorantes intensos num grupo de jovens estudantes em Portugal Continental*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Lisboa, Faculdade de Farmácia.
- Prado, B. G., Iwatani, J. E., Pereira, M. R., Boiago, A. P., & Toledo, L. P. (2014). Pontos críticos de controle na qualidade higiênico-sanitária do preparo de sushis e sashimis no município de São Vicente, São Paulo. 21(1), pp. 359-372.
- Ramos, P. (2011). *Anisakis* spp. em bacalhau, sushi e sashimi: risco de infecção parasitária e alergia. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*(110), (577-580) 87-97.
- Rath, S., Ximenes, M., & Reyes, F. (1994). Teor de nitrato e nitrito em vegetais cultivados no distrito federal: um estudo preliminar. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 54(2), 126-130.
- Rebelo, A. C. (2019). *Determinação analítica de nitratos em amostras do estudo da dieta total (TDS) e contributo para a avaliação da exposição da população a nitratos*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.
- Regulamento (CE) n. o 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de dezembro de 2008 . (2008). *Relativo aos aditivos alimentares*. Jornal Oficial da União Europeia.
- Regulamento (CE) n.o 2074/2005 da Comissão de 5 de dezembro de 2005. (2005). *Medidas de execução para determinados produtos ao abrigo do Regulamento (CE) n.o 853/2004 e para a organização de controlos oficiais ao abrigo dos Regulamentos (CE) n.o 854/2004 e n.o 882/2004*. Jornal Oficial da União Europeia.
- Regulamento (CE) n.o 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de abril de 2004. (2004). *Regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal*. Jornal Oficial da União Europeia.

- Regulamento (UE) N.º 1129/2011 da Comissão de 11 de Novembro de 2011. (2011). *Altera o anexo II do Regulamento (CE) n.º 1333/2008 mediante o estabelecimento de uma lista da União de aditivos alimentares*. Jornal Oficial da União Europeia.
- Regulamento (UE) N.º 1130/2011 da Comissão de 11 de Novembro de 2011. (2011). *Altera o anexo III do Regulamento (CE) n.º 1333/2008 relativo aos aditivos alimentares, mediante o estabelecimento de uma lista da União de aditivos alimentares autorizados para utilização nos aditivos, enzimas e aromas alimentares e nutrientes*. Jornal Oficial da União Europeia.
- Reilly, A. (2018). *Overview of food fraud in the fisheries sector* .
- Ribani, M., Bottoli, C. B., Colins, C. H., Jardim, I. C., & Melo, L. F. (2004). Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *27(5)*, 771-780.
- Rosar, M. D. (2017). *OCORRÊNCIAS DE PARASITAS NO PESCADO: RELATO DE CASO*.
- Saez-Hernande, R., Antela, K., Mauri-Aucejo, A., Morales-Rubio, A., & Cervera, L. (2022). Smartphone-based colorimetric study of adulterated tuna samples. *Food Chemistry*, 389.
- Sampaio, J. L., Andrade, V. P., Lucas, M. d., Fung, L., Gagliardi, S. M., Santos, S. R., . . . Dick, T. (2005). Diphyllbothriasis, Brazil. *Emerg Infect Dis*, *11(10)*, 1598–1600.
- Sanchez, M. C. (2015). *Food Law and Regulation for Non-Lawyers. A US Perspective*. Springer.
- Santamaria, P. (2006). Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation. *J Sci Food Agric*, 10-7.
- Santos, A. A., & Quadros, T. D. (2017). *ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE SUSHI E SASHIMI COMERCIALIZADOS EM RESTAURANTES NA CIDADE DE PONTA GROSSA-PR*.
- Santos, F., & Faro, L. d. (2005). The first confirmed case of *Diphyllbothrium latum* in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, *100(6)*, 585-586.
- Santos, M. J., Castro, R., Cavaleiro, F., Rangel, L., & Palm, H. W. (2017). Comparison of anisakid infection levels between two species of Atlantic mackerel (*Scomber colias* and *S. scombrus*) off the Atlantic Portuguese coast. *Scientia Marina*, *81(2)*, 179-185.
- Setyobudi, E., Jeon, C.-H., Lee, C.-H., Seong, K.-B., & Kim, J.-H. (2011). Occurrence and identification of *Anisakis* spp. (Nematoda: Anisakidae) isolated from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) in Korea. *Parasitol Res*, *108(3)*, 585-592.
- Shaoting, D., Yongsong, Z., & Xianyong, L. (2007). Accumulation of nitrate in vegetables and its possible implications to human health. *Scientia Agricultura Sinica*, *40(9)*, 2007-2014.
- Silva, D. D., & Yamao, M. (2006). A yen for sushi: an analysis of demographic and behavioural patterns of sushi consumption in Japan. *Journal of Foodservice*, *17(2)*, 63-76.
- Smaldone, G., Marrone, R., Cozzolino, G., Vollano, L., Anastasio, A., & Bernardi, C. E. (2017). Colour changes in thawed Tuna treated with vegetable extracts vacuum packaged and stored at refrigeration temperature. *Convegno Sisvet : atti*, 196.
- Société Générale de Surveillance. (2017). *OS PERIGOS MAIS RELEVANTES DO PESCADO PARA A SAÚDE PÚBLICA*. Obtido de Société Générale de Surveillance: <https://www.sgs.pt/pt-pt/news/2017/11/os-perigos-pescado>
- Souza, T. J., Silva, J. d., Filho, C. R., & Santos, J. G. (2015). Microrganismos de interesse sanitário em sushis. *Rev Inst Adolfo Lutz*, *74(3)*, 274-9.

- Speciale, A., Trombetta, D., Saija, A., Panebianco, A., Giarratana, F., Ziino, G., . . . Gangemi, S. (2017). Exposure to Anisakis extracts can induce inflammation on in vitro cultured human colonic cells. *Parasitol Res*, 116(9), 2471-2477.
- Tamme, T., Reinik, M. M., Roasto, M., Juhkam, K., Tenno, T., & Kiis, A. (2006). Nitrates and nitrites in vegetables and vegetable-based products and their intakes by the Estonian population. *Food Additives & Contaminants*, 23(4), 355–361.
- Tavares, L. E., Luque, J. L., & Bomfim, T. C. (2005). Human diphyllobothriasis: reports from Rio de Janeiro, Brazil. *Revista brasileira de parasitologia veterinaria*, 14(2), 85-87.
- Thompson, M., Ellison, S. L., & Wood, R. (2002). Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. *Pure Applied Chemistry*, 74(5), 835-855.
- Tokiwa, T., Kobayashi, Y., Ike, K., Morishima, Y., & Sugiyama, H. (2018). Detection of Anisakid Larvae in Marinated Mackerel Sushi in Tokyo, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 71, 88-89.
- Torres, P., & Puga, S. (2011). Comparative efficacy of candling and glass plate compression for detection of diphyllobothriosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) musculature. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*, 30(3), 831-837.
- Torres, P., & Yera, H. (2018). GLOBAL WATER PATHOGEN PROJECT: PART THREE. SPECIFIC EXCRETED PATHOGENS: ENVIRONMENTAL AND EPIDEMIOLOGY ASPECTS. *DIPHYLLOBOTHRIDAE*. doi:<https://doi.org/10.14321/waterpathogens.38>
- Vaessen, H., & Schothorst, R. (1999). The oral nitrate and nitrite intake in the Netherlands: evaluation of the results obtained by HPIC analysis of duplicate 24-hour diet samples collected in 1994. *Food Addit. Contam.*, 16(5), 181-188.
- Valentini, S. R., Sommer, W. A., & Matioli, G. (2007). VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS. *Arq Mudi*, 11(2), 26-31.
- Vieira, N., Carvalho, I., & Brito, C. (2009). Occurrence and relative abundance of common dolphins in three sites of the Portuguese shore .
- Villazanakretzer, D. L., Napolitano, P. G., Cummings, K. F., & Magann, E. F. (2016). Fish Parasites: A Growing Concern During Pregnancy. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 71(4), 253–259.
- Wawrzyniak, A., Gronowska, S., & Gorecka, K. (1999). The evaluation of nitrates and nitrites food intake among Polish households in 1991-1995. *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.*, 50(3), 269-287.
- Wicht, B., Yanagida, T., Scholz, T., Ito, A., Jiménez, J. A., & Brabec, J. (2010). Multiplex PCR for Differential Identification of Broad Tapeworms (Cestoda: Diphyllobothrium) Infecting Humans. *Journal Of Clinical Microbiology*, 48(9), 3111–3116.
- Williams, M., Hernandez-Jover, M., & Shamsi, S. (2020). A Critical Appraisal of Global Testing Protocols for Zoonotic Parasites in Imported Seafood Applied to Seafood Safety in Australia. *Foods*, 9(448).
- World Health Organization. (n.d.). *Foodborne diseases*. Obtido de World Health Organization: https://www.who.int/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab_1
- Yamada, T., & Ohwada, S. (2020). Case of gastric anisakiasis with no symptoms. *Clin Case Rep*(8), 1833-1834. doi:<https://doi.org/10.1002/ccr3.2948>

- Yemmen, C., & Gargouri, M. (2022). Potential hazards associated with the consumption of Scombridae fish: Infection and toxicity from raw material and processing. *Journal of Applied Microbiology*(132), 4077–4096.
- Yera, H., Fréalle, É., Dutoit, E., & Dupouy-Camet, J. (2018). A national retrospective survey of anisakidosis in France (2010-2014): decreasing incidence, female predominance, and emerging allergic potential. *Parasite*, 25(23).
- Zhang, Y., Tian, X., Guo, Y., Li, H., Yu, A., Deng, Z., . . . Zhang, S. (2014). Analysis of Nitrites and Nitrates in Hams and Sausages by Open-Tubular Capillary Electrochromatography with a Nanolatex-Coated Capillary Column. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(15), 3400–3404.
- Žilić, J., & Mladineo, I. (2006). Učestalost nalaza nametnika *Anisakis simplex* (Anisakidae, Nematoda) u plavoperajnoj tuni (*Thunnus thynnus*) iz kaveznog uzgoja. *MESO: Prvi hrvatski časopis o mesu*, 8(4).

Anexos

Anexo I

Estabelecimento	Doses	Código Identificação por amostra	Data de recolha	Peso (g)	Peso por dose (g)	Comprimento x Largura (cm)	Espessura (mm)	Observação Direta (Positiva/Negativa)		Observação sob luz UV (Positivo/Negativo)	
								Anisakis	D.Latum	Anisakis	D.latum
1	P01#1	P01#1.1	15/06/2021	6,21	24,55	4,5x2,5	3/4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P01#1.2	15/06/2021	7,29		4x2,5	4/5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P01#1.3	15/06/2021	5,24		3x3	4/5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P01#1.4	15/06/2021	5,81		4x3	3/4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2	P02#1	P02#1.1	31/05/2021	18,59	81,92	6,5x5	5/6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P02#1.2	31/05/2021	19,08		6,5x5	5/6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P02#1.3	31/05/2021	22,92		7x5	5/6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P02#1.4	31/05/2021	21,33		7x5	5/6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	P02#2	P02#2.1	31/05/2021	20,55	78,02	6,5x5	5/6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P02#2.2	31/05/2021	24,46		6,5x5	7/8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P02#2.3	31/05/2021	15,98		6,5x4	4/5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P02#2.4	31/05/2021	17,03		6,5x4,5	4/5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	P02#3	P02#3.1	31/05/2021	14,94	68,92	6,5x4	4/5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P02#3.2	31/05/2021	19,46		6x5	7/8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P02#3.3	31/05/2021	16,37		6x5	6/7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P02#3.4	31/05/2021	18,15		6x4,5	4/5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3	P03#1	P03#1.1	04/05/2021	11,12	48,12	5x3,5	4/5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P03#1.2	04/05/2021	11,94		5x3,5	4/5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P03#1.3	04/05/2021	13,00		5x3,5	4/5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P03#1.4	04/05/2021	12,06		5x3,5	4/5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	P03#2	P03#2.1	06/05/2021	11,44	49,12	6x3	4/5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P03#2.2	06/05/2021	12,28		6x3	4/5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P03#2.3	06/05/2021	12,22		6x3,5	5/6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P03#2.4	06/05/2021	13,18		5x3,5	6/7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

	P03#3	P03#3.1	06/05/2021	10,09	43,26	5,5x3	5/6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P03#3.2	06/05/2021	10,61		5,5x3	5/6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P03#3.3	06/05/2021	10,76		5x3	5/6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P03#3.4	06/05/2021	11,80		5,5x3	5/6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
4	P04#1	P04#1.1	19/05/2021	7,69	27,34	4,5x2,5	4/5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P04#1.2	19/05/2021	5,98		4,5x2,5	3/4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P04#1.3	19/05/2021	6,48		4,5x2	4/5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P04#1.4	19/05/2021	7,19		4x3	4/5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	P04#2	P04#2.1	19/05/2021	6,44	28,02	4x3	4/5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P04#2.2	19/05/2021	7,77		4,5x3	4/5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P04#2.3	19/05/2021	6,82		4,5x2,5	4/5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P04#2.4	19/05/2021	6,99		4x3	4/5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	P04#3	P04#3.1	19/05/2021	6,50	29,37	4,5x3	3/4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P04#3.2	19/05/2021	8,00		5x2	5/6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P04#3.3	19/05/2021	6,69		4x3	5/6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P04#3.4	19/05/2021	8,18		4x3	5/6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	P04#4	P04#4.1	15/06/2021	9,20	36,23	5x3	6/7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P04#4.2	15/06/2021	8,32		4x2	6/7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P04#4.3	15/06/2021	9,63		5x3	6/7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P04#4.4	15/06/2021	9,08		4,5x3	6/7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
5	P05#1	P05#1.1	09/06/2021	4,12	17,82	4x3	3/4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P05#1.2	09/06/2021	4,02		4,5x3	3/4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P05#1.3	09/06/2021	4,16		4,5x3	3/4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P05#1.4	09/06/2021	5,52		4,5x3,5	3/4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
6	P06#1	P06#1.1	10/05/2021	6,80	28,03	4x3	3/4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P06#1.2	10/05/2021	6,87		3,5x3	3/4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P06#1.3	10/05/2021	7,05		4x3	5/6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P06#1.4	10/05/2021	7,31		4,5x3	4/5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	P06#2	P06#2.1	10/05/2021	8,97	29,69	4x3	5/6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P06#2.2	10/05/2021	9,51		3,5x3,5	6/7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P06#2.3	10/05/2021	6,23		3,5x3	4/5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P06#2.4	10/05/2021	4,98		3,5x2	4/5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

7	P06#3	P06#3.1	10/05/2021	4,79	25,74	3,5x2,5	4/5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P06#3.2	10/05/2021	5,33		3,5x2,5	4/5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P06#3.3	10/05/2021	7,64		4x2,5	5/6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P06#3.4	10/05/2021	7,98		4x3	5/6	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo
	P06#4	P06#4.1	15/06/2021	8,56	35,79	3x3	7/8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P06#4.2	15/06/2021	6,98		3x2,5	7/8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P06#4.3	15/06/2021	9,59		3x2,5	8/9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P06#4.4	15/06/2021	10,66		3x3	8/9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
7	P07#1	P07#1.1	28/05/2021	10,83	49,07	5x3	6/7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P07#1.2	28/05/2021	13,15		4,5x3	7/8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P07#1.3	28/05/2021	14,16		5x3,5	7/8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P07#1.4	28/05/2021	10,93		5x3,5	6/7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	P07#2	P07#2.1	28/05/2021	11,88	52,62	5x3	6/7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P07#2.2	28/05/2021	14,47		5,5x3	8/9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P07#2.3	28/05/2021	12,40		5x3	8/9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P07#2.4	28/05/2021	13,87		5x3	8/9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	P07#3	P07#3.1	28/05/2021	13,66	46,87	5x3,5	7/8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P07#3.2	28/05/2021	9,08		5x3	4/5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P07#3.3	28/05/2021	12,63		5x4	6/7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P07#3.4	28/05/2021	11,50		5x3	6/7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
8	P08#1	P08#1.1	26/05/2021	13,5	54,84	6x3,5	6/7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P08#1.2	26/05/2021	14,39		6x3,5	6/7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P08#1.3	26/05/2021	14,98		6x3	7/8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P08#1.4	26/05/2021	11,97		6x3	5/6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	P08#2	P08#2.1	26/05/2021	11,96	57,96	6x3	5/6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P08#2.2	26/05/2021	14,02		6x3	6/7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P08#2.3	26/05/2021	15,77		6x3,5	8/9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P08#2.4	26/05/2021	16,21		6x3,5	10/11	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	P08#3	P08#3.1	26/05/2021	12,50	48,09	6x3,5	5/6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P08#3.2	26/05/2021	11,27		5,5x3	6/7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P08#3.3	26/05/2021	12,81		6x3	5/6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P08#3.4	26/05/2021	11,51		6x3	5/6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

9	P09#1	P09#1.1	09/06/2021	15,79	57,11	5,5x2,5	8/9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P09#1.2	09/06/2021	13,09		5,5x3	7/8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P09#1.3	09/06/2021	13,73		5,5x2	8/9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P09#1.4	09/06/2021	14,50		5,5x2,5	8/9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
10	P10#1	P10#1.1	14/05/2021	9,59	51,18	5x2,5	10/11	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P10#1.2	14/05/2021	11,80		5x3,5	7/8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P10#1.3	14/05/2021	16,71		5x4	7/8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P10#1.4	14/05/2021	13,08		6x2,5	6/7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	P10#2	P10#2.1	14/05/2021	13,59	51,34	5x4	5/6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P10#2.2	14/05/2021	12,03		5x4	5/6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P10#2.3	14/05/2021	12,19		5x4	5/6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P10#2.4	14/05/2021	13,53		5x4	5/6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	P10#3	P10#3.1	14/05/2021	16,19	59,96	5x4	7/8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P10#3.2	14/05/2021	18,30		6x4	10/11	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P10#3.3	14/05/2021	13,44		5,5x3,5	10/11	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P10#3.4	14/05/2021	12,03		5x2,5	9/10	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	P10#4	P10#4.1	15/06/2021	11,71	45,46	5x4	10/11	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P10#4.2	15/06/2021	12,38		5x4	10/11	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P10#4.3	15/06/2021	10,84		4x3	10/11	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P10#4.4	15/06/2021	10,53		4x3	10/11	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
11	P11#1	P11#1.1	09/06/2021	10,98	39,72	5x4	5/6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P11#1.2	09/06/2021	10,37		4x4	5/6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P11#1.3	09/06/2021	9,48		4,5x4	5/6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P11#1.4	09/06/2021	8,89		5x4	4/5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
12	P12#1	P12#1.1	12/05/2021	10,97	47,33	5x3	5/6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P12#1.2	12/05/2021	11,81		5x3	7/8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P12#1.3	12/05/2021	12,08		5x3	7/8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P12#1.4	12/05/2021	12,47		5x3	7/8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	P12#2	P12#2.1	12/05/2021	11,92	47,43	5x3	7/8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P12#2.2	12/05/2021	10,68		5x3	6/7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P12#2.3	12/05/2021	12,08		5x3	7/8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P12#2.4	12/05/2021	12,75		5x3	8/9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

	P12#3	P12#3.1	12/05/2021	9,27	41,01	4,5x3	5/6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P12#3.2	12/05/2021	10,60		5x3	6/7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P12#3.3	12/05/2021	10,20		4,5x3	6/7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P12#3.4	12/05/2021	10,94		4,5x3	6/7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	P12#4	P12#4.1	15/06/2021	12,95	47,14	4,5x3	8/9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P12#4.2	15/06/2021	10,49		5x3	6/7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P12#4.3	15/06/2021	12,24		5x3	8/9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P12#4.4	15/06/2021	11,46		5x3	8/9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
13	P13#1	P13#1.1	21/05/2021	8,75	33,72	4x3	4/5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P13#1.2	21/05/2021	9,39		4x3	4/5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P13#1.3	21/05/2021	7,87		4x3	4/5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P13#1.4	21/05/2021	7,71		4x3	4/5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	P13#2	P13#2.1	21/05/2021	11,28	43,61	4x3	6/7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P13#2.2	21/05/2021	11,44		4x3	9/10	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P13#2.3	21/05/2021	10,76		4,5x3	5/6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P13#2.4	21/05/2021	10,13		4x3	5/6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	P13#3	P13#3.1	21/05/2021	9,86	40,38	4x3	7/8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P13#3.2	21/05/2021	10,31		4x3	7/8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P13#3.3	21/05/2021	9,72		4x3	7/8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
		P13#3.4	21/05/2021	10,49		4x3	5/6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo