MESTRADO

Controlo de Qualidade

Especialidade Água e Alimentos

Dissertação do 2º ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre

Avaliação de marcadores moleculares para aplicação de PCR em tempo real na quantificação de sésamo como alimento alergénico.

Daniela da Silva Mendes

M

2020

Avaliação de marcadores moleculares para aplicação de PCR em tempo real na quantificação de sésamo como alimento alergénico.

Dissertação do 2º ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em Controlo de Qualidade

Daniela da Silva Mendes

2020

Trabalho realizado sob a orientação de:

Doutora Joana Sofia Barros da Costa

Professora Doutora Maria Beatriz Prior Pinto Oliveira

Porto

Outubro 2020

É autorizada a reprodução integral desta dissertação apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.

(Doutora Joana Sofia Barros da Costa)

(Professora Doutora Maria Beatriz Prior Pinto Oliveira)

Agradecimentos

Deixo o meu grande agradecimento à Doutora Joana Costa pela orientação, por todo o acompanhamento, pela paciência e todos os conselhos dados para meu crescimento profissional aos quais foram e serão fundamentais no futuro.

Agradeço à Professora Doutora Beatriz Oliveira pela atenção e apoio demonstrado.

Agradeço à Doutora Isabel Mafra por me ter feito parte do grupo de investigação, pelo acompanhamento e pelos sábios conselhos.

À Caterina e Liliana um bem-haja por toda a ajuda, apoio laboratorial, pela boa disposição e bom ambiente no laboratório.

Gostaria de agradecer aos projetos AlleRiskAssess – PTDC/BAA-AGR/31720/2017 e UIDB 50006/2020 com suporte financeiro pela Fundação para a Ciência e Tenologia (FCT), os quais financiaram o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à Dra Idacira Ibarra e à Dra Vanessa por todo o apoio ao longo desta fase; por me ajudarem no "*movimento"* por que estagnados não é a solução.

Agradeço às minhas irmãs Brazim, Sónia, Vânia e Cátia pelo apoio incondicional e carinho. Às minhas irmãs Claúdia e Sofia agradeço pelos ensinamentos, pelo positivismo, pela cultura e pelas "*discórdias"* (devo reconhecer que eram para meu bem).

Ás minhas manas Nádia, Marta, Clarinha, Teresinha e Cátia pelo apoio, carinho e pelas risadas.

Aos meus pais, irmão e restante família obrigada pelo carinho e compreensão nos momentos que mais precisei.

"Quando existe harmonia entre a mente, o coração e a vontade, nada é impossível."
Rig Veda.

Muito Grata!!

Resumo

O sésamo (*Sesamum indicum*) é um alimento com propriedades benéficas para a saúde humana, pelo que o seu consumo e utilização na indústria alimentar tem vindo a aumentar. Contudo, o sésamo é classificado com um alimento alergénico, cujo consumo, ainda que em quantidades residuais, pode desencadear reações imunológicas adversas em indivíduos sensibilizados/alérgicos. De forma a proteger a população alérgica, foi criada legislação específica que determina a obrigatoriedade de declarar sésamo (e outros ingredientes potencialmente alergénicos) no rótulo dos alimentos processados. Para a melhor gestão da presença de alimentos alergénicos em produtos processados, tanto pela indústria como pelas autoridades reguladoras, é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos capazes de quantificar sésamo (e outros ingredientes alergénicos) em quantidades vestigiais.

Este trabalho teve como foco o desenvolvimento de métodos de PCR qualitativa e PCR em tempo real para a identificação e quantificação de sésamo em alimentos processados. Com este objetivo foram selecionados genes que codificam diferentes proteínas (albumina 2S, vicilina, citocromo c oxidase e peroxirredoxina 2E-1) como potenciais marcadores moleculares para a deteção de sésamo.

Para tal, procedeu-se à preparação de misturas modelo com quantidades conhecidas de sésamo em massa de biscoito (10%-0,000001% (m/m), *n*=13), assim como a preparação de amostras de validação (2,5%-0,002% (m/m), *n*=6). Para avaliar o efeito do processamento na performance dos métodos propostos, as misturas modelo foram também processadas a 180ºC para mimetizar a preparação de biscoitos de sésamo. As amostras foram extraídas através do *NucleoSpin*® food kit, com determinação da pureza e rendimento dos extratos de DNA. Foram desenhados 5 pares de *primers* (2 conjuntos com alvo em genes unicópia e 3 conjuntos com alvo em genes multicópia) com recurso a ferramentas de bioinformática e análise *in silico* para atestar a especificidade dos *primers*. Estes foram utilizados para o desenvolvimento de diferentes sistemas de PCR qualitativa, seguindo-se a análise de reatividade cruzada com espécies animais e de plantas para determinar a especificidade dos métodos propostos. Dois métodos de PCR em tempo real com recurso ao corante EvaGreen ou a uma sonda de hidrólise foram propostos como potenciais métodos de quantificação do sésamo em matrizes alimentares.

Os resultados obtidos atestaram que dos 5 pares de *primers* desenhados, apenas o par CtcSes-F2/R2 não reagiu com as 57 espécies testadas, sendo este o par escolhido para o desenvolvimento dos métodos de PCR qualitativa e PCR em tempo real. A PCR qualitativa permitiu determinar um LOD absoluto de 10 pg de DNA genómico e um LOD relativo de 50 mg/kg de sésamo em misturas modelo de massa de biscoito (não processados) e em

biscoitos (processados). A PCR em tempo real com corante universal *EvaGreen* não foi específica para LOD inferiores a 100 pg, uma vez que a análise de *melting* identificou a formação de produtos de PCR diferentes do produto inicial abaixo do referido valor, pelo que esta técnica foi descartada. O método de PCR em tempo real com recurso a sonda de hidrólise provou ser o melhor método para a quantificação de sésamo, apresentando parâmetros de eficiência de PCR e coeficientes de correlação próximos de 100% e 0,98, respetivamente. Com este método de PCR em tempo real foi possível quantificar sésamo até 1 pg (LOD absoluto) e 50 mg/kg (LOD relativo) em massa de biscoito e biscoito processado. A performance do método não parece ser afetada pelo processamento, o que é uma vantagem clara em relação a métodos proteicos como por exemplo os ELISA. O método foi validado com amostras cegas, cujos resultados estão dentro dos critérios de validação definidos para este tipo de metodologia.

Palavras – chave: Genes unicópia, genes multicópia, PCR qualitativa, PCR em tempo real, alergénios, *Sesamum indicum.*

Abstract

The sesame (*Sesamum indicum*) is a food with health benefits to humans, so its consumption and use in the food industry has been increasing. However, sesame is classified as an allergenic food, the consumption of which, even in residual amounts, can trigger adverse immunological reactions in sensitized/allergic individuals. In order to protect the allergic population, specific legislation was created that requires the mandatory declaration of sesame (and other potentially allergenic ingredients) on the label of pre-packaged processed foods. For a better management of the presence of allergenic foods in processed products, both by the food industry and by the regulatory authorities, it is necessary to develop analytical methods capable of quantifying sesame (and other allergenic ingredients) at trace quantities.

Therefore, this work was focused on the development of qualitative PCR and real-time PCR methods for the identification and quantification of sesame in processed foods. For this purpose, distinct genes encoding for different proteins (2S albumin, vicilin, cytochrome c oxidase and peroxiredoxin 2E-1) were selected as potential molecular markers for sesame identification.

For this purpose, the preparation of model mixtures with known quantities of sesame in biscuit dough (10%-0.000001% (w/w), *n*=13) was carried out, as well as the preparation of validation samples (2.5%-0.002% (w/w), *n*=6). To evaluate the effect of processing on the performance of the proposed methods, the model mixtures were also processed at 180ºC to mimic the preparation of sesame biscuits. The samples were extracted using the NucleoSpin® food kit, followed by the determination of the purity and yield of the DNA extracts. Five pairs of primers were designed, namely 2 sets of primers targeting unicopy genes and 3 sets targeting multicopy genes. The primers were further *in silico* analysed using bioinformatic tools to confirm the specificity of the primers. Qualitative PCR systems were optimised for each primer set, followed by the analysis of cross-reactivity with animal and plant species to verify the specificity of the proposed methods. Two methods of real-time PCR using EvaGreen dye or a hydrolysis probe were proposed to quantify sesame in food matrices.

The obtained results indicated that only the pair CtcSes-F2/R2 did not react with the 57 species tested, which allowed this primer pair to be used in the development of qualitative PCR and real-time PCR methods. Using qualitative PCR, it was possible to determine an absolute LOD of 10 pg of genomic DNA and a relative LOD of 50 mg/kg of sesame in model mixtures of biscuit dough (unprocessed) and in biscuits (processed). Real-time PCR with universal EvaGreen dye was not specific for quantifying sesame at levels below 100 pg, since the melting curve analysis identified the formation of PCR products other than the

initial product, so this technique was not further applied. The real-time PCR method using a hydrolysis probe proved to be the best method for quantifying sesame, with PCR efficiency and correlation coefficient parameters close to 100% and 0.98, respectively. With this real-time PCR system, it was possible to quantify sesame down to 1 pg (absolute LOD) and 50 mg/kg (relative LOD) in biscuit dough and biscuit. The performance of the method was not affected by processing, which is a clear advantage over protein methods such as ELISA. The method was validated with blind samples, whose results are within the acceptance validation criteria defined for this type of methodology.

Keywords: Unicopy genes, multicopy genes, qualitative PCR, Real time PCR, allergens, *Sesamum indicum.*

Índice Geral

Agradecimentos v
Resumo vi
Abstract viii
Índice Geral x
Índice de Figuras xii
Índice de Tabelas xv
Lista de Abreviaturas xvi
1 Introdução 1
1.1 Alergia alimentar 2
1.2 Alergia ao sésamo: diagnóstico e sintomatologia 4
1.3 Prevalência de alergia do sésamo 5
1.4 Caracterização de alergénios do sésamo 5
1.4.1 Ses i 1 e Ses i 2 6
1.4.2 Ses i 3, Ses i 6 e Ses i 7 8
1.4.3 Ses i 4 e Ses i 5 9
1.4.4 Ses i 8 9
1.5 Fenómenos de reatividade cruzada 10
1.6 Efeito do processamento alimentar na alergenicidade do sésamo 11
1.7 Deteção/quantificação do sésamo em alimentos 12
1.8 Métodos proteicos 13
1.8.1 ELISA 13
1.8.2 Plataformas de espectrometria de massa (MS) 14
1.9 Métodos baseados na análise de DNA 15
1.9.1 PCR qualitativa 15
1.9.2 PCR em tempo real 17
1.9.3 Biossensores 19
2 Objetivo do trabalho 20
3 Metodologia 23
3.1 Preparação das misturas modelo de sésamo em massa de biscoito 23
3.2 Espécies utilizadas para a avaliação de reatividade cruzada 25
3.3 Métodos de extração de DNA 25
3.3.1 Nucleospin® Food kit 26
3.3.2 Nucleospin® Plant II kit 27
3.4 Quantificação e avaliação da pureza de DNA 27
3.5 Desenvolvimento da PCR qualitativa 28
3.5.1 Desenho de primers específicos e análise in silico 28
3.5.2 PCR Qualitativa 29

3.6 Sequenciação 30
3.7 PCR em tempo real 31
3.7.1 PCR em tempo real com corante Evagreen 31
3.7.2 PCR em tempo real com sonda de hidrólise (TaqMan) 31
4 Resultados e Discussão 33
4.1 Análise de pureza e quantificação de DNA 33
4.2 Otimização de PCR qualitativa para deteção de sésamo branco e preto 35
4.2.1 SesCtc-F3/R3 36
4.2.2 SesPox-F1/R1 36
4.2.3 Ses2-F/R 37
4.2.4 Ses7-F/R 38
4.2.5 SesCtc-F2/R2 39
4.3 Verificação da amplificação dos extratos de DNA 41
4.4 Avaliação de reatividade cruzada dos pares de *primers* em estudo 42
4.5 Deteção absoluta e relativa do sésamo por PCR qualitativa 46
4.6 Resultados sequenciação 47
4.7 PCR em tempo real 48
4.7.1 PCR em tempo real com corante EvaGreen 48
4.7.2 PCR em tempo real com sonda de hidrólise (TaqMan) 50
4.7.3 Validação do método com amostras cegas 52
5 Conclusão 55
6 Referências 57

Índice de Figuras

Figura 1 – Misturas modelo de sésamo em massa de biscoito processada (10% - 0,00001%, n = 13). 24

Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* SesCtc-F3/R3 e 3 mM de Mg^{2+} das diluições seriadas (1/10) do extrato de DNA de sésamo branco e sésamo preto a diferentes temperaturas: 60ºC, 62ºC e 64ºC. Legenda: M – Marcador molecular 100 bp (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1- 50 ng/µL; 2- 5 ng/µL; 3 – 0,5 ng/µL; 4- 0,05 ng/µL; 5- 0,005 ng/µL; 6- 0,0005 ng/µL; CN – controlo negativo. 36

Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* SesPOX-F1/R1 e 3 mM de Mg^{2+} das diluições seriadas (1/10) do extrato de DNA de sésamo branco e sésamo preto a diferentes temperaturas: 58ºC, 60ºC e 62ºC. Legenda: M – Marcador molecular 100 bp (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1- 50 ng/µL; 2- 5 ng/µL; 3 – 0,5 ng/µL; 4- 0,05 ng/µL; 5- 0,005 ng/µL; 6- 0,0005 ng/µL; CN – controlo negativo. 37

Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Ses2-F/R e 3 mM de Mg^{2+} das diluições seriadas (1/10) do extrato de DNA de sésamo branco e sésamo preto a diferentes temperaturas: 61ºC, 63ºC e 65ºC. Legenda: M – Marcador molecular 100 bp (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1- 50 ng/µL; 2- 5 ng/µL; 3 – 0,5 ng/µL; 4- 0,05 ng/µL; 5- 0,005 ng/µL; 6- 0,0005 ng/µL; CN – controlo negativo. 38

Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Ses7-F/R e 3 mM de Mg^{2+} das diluições seriadas (1/10) do extrato de DNA de sésamo branco e sésamo preto a diferentes temperaturas: 61ºC, 63ºC e 65ºC. Legenda: M – Marcador molecular 100 bp (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1- 50 ng/µL; 2- 5 ng/µL; 3- 0,5 ng/µL; 4- 0,05 ng/µL; 5- 0,005 ng/µL; 6- 0,0005 ng/µL; CN – controlo negativo. 39

Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* SesCtc-F2/R2 e 3 mM de Mg^{2+} das diluições seriadas (1/10) do extrato de DNA de sésamo branco e sésamo preto a diferentes temperaturas: 59ºC, 61ºC e 63ºC. Legenda: M – Marcador molecular 100 bp (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1- 50 ng/µL; 2- 5 ng/µL; 3- 0,5 ng/µL; 4- 0,05 ng/µL; 5- 0,005 ng/µL; 6- 0,0005 ng/µL; CN – controlo negativo. 40

Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* SesCtc-F2/R2 e 3 mM de Mg^{2+} das diluições seriadas (1/10) do extrato de DNA de sésamo branco e sésamo preto a diferentes temperaturas: 60ºC e 62ºC. Legenda: M – Marcador molecular 100 bp (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1- 5 ng/µL; 2- 0,5 ng/µL; 3- 0,05 ng/µL; 4- 0,005 ng/µL; 5- 0,0005 ng/µL; CN – controlo negativo. 40

Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* 18SRG-F/R. Legenda: M- Marcador molecular 100 bp (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1- mandioca; 2- cereja ; 3- laranja ; 4- nectarina; 5- pêssego; 6- noz do brasil; 7- noz pecan; 8- caju ; 9- macadâmia; 10- pinhão ; 11- amêndoa ; 12- pistácio; 13- amendoim; 14- avelã; 15- favas; 16- tomate; 17- aveia; 18-

cevada; 19- centeio; 20- girassol; 21- colza; 22- abóbora; 23- arroz; 24- trigo; 25- soja; 26- mostarda oriental; 27- mostarda preta; 28- chia; 29- linhaça; 30- trigo sarraceno; 31- massa; 32- batata; 33- milho; 34- sésamo branco; 35- sésamo preto; 36 - javali; 37- pato; 38- perdiz; 39- lebre; 40 -codorniz; 41- faisão; 42- veado; 43- coelho ; 44- galinha; 45- peru; 46- borrego ; 47- cabrito; 48- avestruz; 49- vaca; 50- cavalo; 51- porco; 52- bacalhau; 53- pescada; 54- robalo; 55- carapau; 56- abrótea; 57- red fish; 58- maruca; 59- cavala; 60- *L. albus*; 61- *L. luteus*; 62- *L. angustifolius*; CN- controlo negativo. 41

Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* SES2-F/R. Legenda: M- Marcador molecular 100 bp (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1- mandioca; 2- poço vazio; 3- laranja; 4- nectarina; 5 - pêssego; 6- noz do Brasil; 7- noz pecan; 8- caju ; 9- macadâmia; 10- pinhão ; 11- amêndoa ; 12- pistácio; 13- amendoim; 14- avelã; 15- favas; 16- tomate; 17- aveia; 18- cevada; 19- centeio; 20- girassol; 21- colza; 22- abóbora; 23- arroz; 24- trigo; 25- soja; 26- mostarda oriental; 27- mostarda preta; 28- chia; 29- linhaça; 30- trigo sarraceno; 31- massa; 32- batata; 33- milho; 34- sésamo branco; 35- sésamo preto; 36- javali; 37- pato; 38- perdiz; 39- lebre; 40- codorniz; 41- faisão; 42- veado; 43- coelho ; 44- galinha; 45- perú; 46- borrego; 47- cabrito; 48- avestruz; 49- vaca; 50- cavalo; 51- porco; 52- poço vazio; 53- pescada; 54- robalo; 55- carapau; 56- abrótea; 57- red fish; 58- maruca; 59- cavala; 60- *L. albus*; 61- *L. luteus*; 62- *L. angustifolius*; CN- controlo negativo. 43

Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* SesCtc-F2/ R2. Legenda: M- Marcador molecular 100 bp (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1- Mandioca; 2- poço vazio; 3- laranja; 4- nectarina; 5- pêssego; 6- noz do Brasil; 7- noz pecan; 8- caju; 9- macadâmia; 10- pinhão; 11- amêndoa; 12- pistácio; 13- amendoim; 14- avelã; 15- favas; 16- tomate; 17- aveia; 18- cevada; 19- centeio; 20- girassol; 21- colza; 22- abóbora; 23- arroz; 24- trigo; 25- soja; 26- mostarda oriental; 27- mostarda preta; 28- chia; 29- linhaça; 30- trigo sarraceno; 31- massa; 32- batata; 33- milho; 34- sésamo branco; 35- sésamo preto; 36- javali; 37- pato; 38- perdiz; 39- lebre; 40- codorniz; 41- faisão; 42- veado; 43- coelho ; 44- galinha; 45- perú; 46- borrego; 47- cabrito; 48- avestruz; 49- vaca; 50- cavalo; 51- porco; 52- poço vazio; 53- pescada; 54- robalo; 55- carapau; 56- abrótea; 57- red fish; 58- maruca; 59- cavala; 60- *L. albus*; 61- *L. luteus*; 62- *L. angustifolius*; CN- controlo negativo. 44

Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* SesCtc-F2/R2. Legenda: M- Marcador molecular 100 bp (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1- 5 ng/µL; 2- 0,5 ng/µL; 3- 0,05 ng/µL; 4- 0,005 ng/µL; 5- 0,0005 ng/µL; 6- 0,00005 ng/µL; 7- 0,000005 ng/µL; CN- controlo negativo. 46

Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* SesCtc-F2/R2 em misturas modelo de sésamo em massa de biscoito (A) e biscoito (B). Legenda: M- Marcador molecular 100 bp (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1- 100%; 2- 10%; 3- 5%; 4- 1%; 5- 0,5%; 6- 0,1%; 7- 0,05%; 8- 0,01%; 9- 0,005%; 10- 0,001%, 11-0,0005%; 12- 0,0001%; 13- 0,00005%, 14- 0,00001%; 15- 0% de sésamo em matriz; CN- controlo negativo. 47

Figura 13 - Alinhamento do produto de sequenciação do sésamo branco e do sésamo preto com a sequência consensos retirados do NCBI (número de acesso XM011075905.2). Na figura estão representadas as zonas de emparelhamento dos *primers* e da sonda. 47

Figura 14 - Curvas de amplificação (A), respetiva curva de calibração (B) e curvas de *melting* (C) obtidas por PCR em tempo real da diluição seriada 1/10 (10 ng-1 pg) do extrato de DNA de sésamo branco com os *primers* SesCtc-F2/R2 e corante universal EvaGreen. 49

Figura 15 - Curvas de amplificação (A) e respetiva curva de calibração (B) obtidas por PCR em tempo real com os *primers* SesCtc-F2/R2 e sonda SesCtc-P utilizando as diluições seriadas (1/10) de DNA de sésamo branco (100 ng-0.1 pg) (*n*=4 réplicas de amplificação). 51

Figura 16 - Curvas de amplificação (A) e respetiva curva de calibração (B) obtidas por PCR em tempo real com os *primers* SesCtc-F2/R2 e sonda SesCtc-P utilizando as diluições seriadas (1/10) de DNA de sésamo preto (10 ng-0.1 pg) (*n*=4 réplicas de amplificação). 51

Figura 17 - Curvas de amplificação (A, B) e respetiva curva de calibração (C, D) obtidas por PCR em tempo real com os *primers* SesCtc-F2/R2 e sonda SesCtc-P utilizando as misturas modelo de sésamo em massa de biscoito (A, C) e em biscoitos (B, D) (10-0,001%) (*n*=2 réplicas de amplificação). As curvas a azul correspondem à curva de calibração e as vermelhas às amostras de validação. 52

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Informação sobre os 8 alergénios registados na ALLERGOME (2020) e na Organização Mundial de Saúde e União de sociedades Internacionais de Imunologia (WHO/IUIS) (2020). 6

Tabela 2 - Exemplos de kits ELISA comerciais para a quantificação de sésamo em alimentos. ... 14

Tabela 3 – Métodos de PCR em tempo-real para quantificação de sésamo em diferentes matrizes alimentares. 19

Tabela 4 – Proporções de sésamo e de massa de biscoito utilizadas na preparação das misturas modelo e amostras de validação (amostras cegas). 24

Tabela 5 – Espécies utilizadas para testar eventuais reatividades cruzadas com os *primers* desenhados (*n*= 60 espécies de plantas e animais). 25

Tabela 6 – *Primers* e sonda utilizados em PCR qualitativa e PCR em tempo real. 29

Tabela 7 – Quantidade de reagentes otimizadas para cada par de *primers* no desenvolvimento da técnica de PCR qualitativa. 30

Tabela 8 – Condições de tempo/temperatura otimizadas para a PCR qualitativa dos diferentes pares de *primers.* 30

Tabela 9 –Condições de temperaturas utilizadas nas amplificações por PCR em tempo real com *EvaGreen* e com sonda. 31

Tabela 10 – Pureza e concentração dos extratos de DNA das misturas modelo de sésamo em massa de biscoito não processado e processado, respetivamente. 33

Tabela 11 – Pureza e concentração dos extratos de DNA das amostras de validação de sésamo em massa de biscoito (não processado) e em biscoito (processado), respetivamente. 34

Tabela 12 – Pureza e concentração dos extratos de DNA das espécies de plantas e animais usadas nos ensaios de reatividade cruzada. 34

Tabela 13 - Resumo dos testes de reatividade cruzada dos diferentes *primers* 45

Tabela 14 - Estimativa do conteúdo em sésamo nas amostras cegas de massa de biscoitos (amostras não processadas) com análise da precisão e exatidão do método. 53

Tabela 15 - Estimativa do conteúdo em sésamo nas amostras cegas de biscoitos (amostras processadas) com análise da precisão e exatidão do método. 53

Lista de Abreviaturas

DBPCFC – double-blind placebo-controlled food challenge (desafia alimentar em formato duplamente cego e controlado por placebo),
EUA – Estados Unidos da América,
FAO – Food and Agriculture Organization (Organização para a Alimentação e Agricultura),
HIC – Cromatografia Hidrofóbica de Interação
IgE – imunoglobulina E,
ITS – Internal transcribed spacer,
MHC – Major histocompatibility complex (complexo principal de histocompatibilidade),
NCBI – National Center Biotechnology Information,
LC-MS – Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa
LOD – limite de deteção,
LOQ – limite de quantificação,
Mg^{2+} – Magnésio,
OFC – Oral Food Challenges,
Pb – Pares de bases,
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase,
WHO – World Health Organization (OMS – Organização Mundial de Saúde)

Componente Teórica

1 Introdução

O sésamo pertence à família Pedaliaceae e apresenta uma grande variedade de espécies, sendo o *Sesamum indicum* a espécie que é utilizada para consumo humano (Ashri 1998; Bedigian, 2003; Robbelen et al., 1989). Pensa-se que seja uma das sementes oleaginosas mais antigas conhecida pela humanidade, com origem no sul da Índia (Bedigian, 2003). Atualmente, o sésamo tem uma distribuição em locais tropicais e subtropicais bem como em regiões temperadas, em particular, na Índia, China, América do Sul e África (Anilakumar et al., 2010). Considerada uma espécie de elevado valor comercial, estima-se que a produção mundial de sementes de sésamo em 2018 foi de 6.015.573 toneladas. A Ásia e a África são os principais continentes produtores de sementes de sésamo, assegurando cerca de 96.9% da sua produção mundial (FAOSTAT, 2020).

Na indústria alimentar as sementes de sésamo são normalmente descascadas podendo ser submetidas a um processamento de torra antes de serem consumidas, o que promove um melhoramento das suas propriedades funcionais, libertando mais sabor e cor, com a finalidade de melhorar a sua qualidade sensorial (Kahyaoglu e Kaya 2006; Mushtaq et al., 2020). O sésamo é muito utilizado em receitas orientais tais como o tahini, halva ou no húmus nas culturas ocidentais (Anilakumar et al. 2010; Mushtaq et al., 2020). É possível encontrar esta semente em produtos de panificação e de pastelaria, tais como pão, palitos de pão, bolachas, *crackers,* chocolates, doces e gelados, assim como a utilização do óleo de sésamo na confeção de doces e na produção de margarina (Mushtaq et al., 2020). O óleo de sésamo é usado também na indústria alimentar, sendo utilizado como condimento ou óleo de fritura. O óleo de sésamo pode ter outras aplicações, nomeadamente nas indústrias de produção de vernizes, produção de biodiesel e inseticidas (Anilakumar et al., 2010).

Nutricionalmente, o óleo de sésamo é rico em antioxidantes, como o sesamol e o sesaminol, os quais são formados a partir dos compostos fenólicos sesamina e sesamolina, respetivamente. São considerados benéficos para a saúde humana, por demonstrarem propriedades anti-inflamatórias, anti-ateroscleróticas, efeitos na redução da pressão arterial e da hiperglicemia, bem como ação de melhoramento do perfil lipídico no plasma e redução do stress oxidativo (Anilakumar et al., 2010).

As sementes são uma excelente fonte de aminoácidos essenciais e minerais como cobre, cálcio, fósforo, ferro, magnésio, manganês e zinco (Elleuch et al., 2011). Para além destes compostos, o sésamo é rico em ácido fólico, vitamina B1, vitamina E e niacina, sendo considerado como um suplemento proteico (Orruño e Morgan, 2007). Devido a estas propriedades nutricionais, o consumo de sementes de sésamo tem vindo a aumentar,

estando correlacionado com vários benefícios para a saúde e bem-estar, sendo considerado um alimento dietético.

Apesar das suas propriedades nutricionais e vantagens para a saúde da maioria da população, o sésamo é considerado um alimento alergénico, representando um risco concreto para os indivíduos sensibilizados ou alérgicos ao sésamo. Estima-se que a alergia alimentar possa afetar cerca de 6 a 8% das crianças e de 2 a 3% dos adultos nos países desenvolvidos. Com o intuito de proteger a saúde dos consumidores, a Organização para a Alimentação e Agricultura (FAO - Food and Agriculture Organization) e a Organização Mundial da Saúde (WHO - World Health Organization), definiram orientações e diretrizes para a primeira lista de alergénios alimentares, subdividida em 8 grupos, os quais deveriam ser obrigatoriamente declarados nos rótulos dos alimentos pré-embalados (Codex Alimentarius CXS, 1- 1985). De um modo geral, estas diretrizes têm sido implementadas a nível mundial, embora apresentando algumas diferenças dependendo do país ou região mundial. Na União Europeia, foi definido o regulamento (UE) nº 1169/2011 que estabelece um conjunto de 14 grupos de alimentos potencialmente alergénicos, nomeadamente cereais contendo glúten, leite, ovos, frutos de casca rija, amendoim, soja, peixe, crustáceos, moluscos, aipo, tremoço, sésamo, mostarda e sulfitos, cuja rotulagem é obrigatória em alimentos embalados, independentemente da sua quantidade (Regulamento (UE) nº 1169/2011). Os estados membros da União Europeia são os países que possuem uma legislação mais apertada, considerando a obrigatoriedade de rotular 14 grupos de alimentos, enquanto os EUA e o Japão têm normas menos restritas exigindo a declaração de menos grupos de alimentos alergénicos (8 e 6 respetivamente) (Gendel, 2012).

1.1 Alergia alimentar

Segundo Boyce et al., (2010), a alergia alimentar é definida como um efeito adverso à saúde desencadeado por uma resposta imunológica que ocorre de forma reprodutível à exposição de um determinado alimento. Em teoria qualquer alimento pode ser alergénico, no entanto cerca de 90% das reações alérgicas reportadas são causadas por alimentos pertencentes a 8 grupos (cereais contendo glúten, leite, ovos, crustáceos, peixe, soja, amendoim e frutos de casca rija). Os alimentos são constituídos por proteínas complexas que podem desencadear uma reação imunológica adversa em indivíduos sensibilizados ou alérgicos. O que torna uma proteína num alergénio é ainda uma incógnita, no entanto sabe-se que as proteínas alergénicas partilham algumas propriedades físico-químicas, nomeadamente a presença de modificações pós-translacionais (glicosilação, fosforilação),

elevada integridade estrutural (estabilidade ao calor) e elevada resistência à fragmentação (resistência à atividade proteolítica da digestão) (Costa et al., 2020).

Quando uma proteína é absorvida pela mucosa intestinal, esta pode ser identificada como um antigénio levando o organismo de um individuo sensibilizado ou alérgico a ativar mecanismos imunológicos, nomeadamente respostas que podem ser mediadas por mecanismos celulares, por anticorpos do tipo imunoglobulina E (IgE), por anticorpos do tipo não-IgE ou até mesmo pela conjugação de vários mecanismos (Boyce et al., 2010). Após o alergénio ser absorvido pelo epitélio intestinal, as células dendríticas da mucosa estendem as dendrites para o lúmen intestinal. Na mucosa, as células dendríticas internalizam e processam as proteínas e péptidos e ativam as células T, apresentando os antigénios (alergénios) às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II. A ativação de diferentes subconjuntos de células dendríticas e a expressão de moléculas co-estimulantes (exemplo CD28, CD80 e CD86) são importantes na determinação da resposta imunitária (Sampson et al., 2018). Posteriormente, os linfócitos Th2 e respetivos mediadores levam à proliferação das células B, promovendo a produção de IgE. Quando as IgE se ligam aos alergénios vão mediar as reações imunológicas imediatas por ativação/desgranulação dos mastócitos e basófilos, sendo as IgE consideradas como um marcador de sensibilização alérgica quando acima de um valor de base de 0,35 kUA/mL.

A elicitação é a fase subsequente à sensibilização, embora esta possa nunca chegar a acontecer. Quando os epítopos presentes nos alergénios alimentares se ligam às IgE específicas, e por sua vez o complexo (alergénio-IgE) se liga aos recetores FcεRI na superfície das células efetoras (mastócitos); ocorre a libertação de histamina e outros mediadores de resposta inflamatória (interleucinas, citoquinas). Este processo corresponde à fase de elicitação. Estes mediadores específicos são responsáveis por elicitar sintomas clínicos agudos do tipo 1 (reações alérgicas imediatas) e podem afetar vários órgãos e tecidos, tais como o sistema cutâneo, respiratório, circulatório e/ou gastrointestinal.

A alergia a um alimento pode variar devido a diversos fatores, nomeadamente, o género (mulher/homem), a idade, a história clínica, a hereditariedade e a presença de outras patologias (nomeadamente asma), sendo estes indicadores determinantes para o desenvolvimento da alergia alimentar. Fatores ambientais, geográficos e culturais podem também ser determinantes no desenvolvimento da alergia alimentar. A severidade de uma reação alérgica é difícil de prever, sendo altamente dependente de fatores como a fisiologia de cada indivíduo sensibilizado/alérgico, a quantidade de alimento ingerido, o tipo e forma de processamento a que o alimento é submetido, assim como as possíveis interações com outros constituintes do alimento (lípidos, carboidratos) (Boyce et al., 2010). Para além

destes fatores, outros como velocidade de absorção de alimentos e a ingestão de alimentos perto do exercício físico podem afetar negativamente a gravidade de uma reação alérgica (Burks et al., 2012).

1.2 Alergia ao sésamo: diagnóstico e sintomatologia

O diagnóstico de uma alergia alimentar é difícil de se estabelecer por não existirem marcadores moleculares específicos para esta condição. Desta forma, tal como para outras alergias alimentares, o diagnóstico de alergia ao sésamo começa pela definição do historial clínico, seguido por testes sorológicos para determinação de IgE especificas para as proteínas do sésamo e por testes cutâneos. Normalmente, a presença de IgE reativas ao sésamo acima de 0.35 kUA/mL e o aparecimento de bolhas com diâmetro acima do controlo negativo nos testes de picada são considerados bons marcadores para a definição de sensibilização ao sésamo. Para confirmação real de alergia ao sésamo, são necessários outros testes mais objetivos tais como os testes de provocação oral (OFC – oral food challenges; DBPCFC – double-blind placebo-controlled food challenge), embora estes só sejam realizados em casos de incerteza do diagnóstico. A administração de doses crescentes de sésamo de forma visível para o paciente (OFC - testes de provocação oral em formato aberto), ou escondidas numa matriz alimentar (ex: bolacha) (DBPCFC – desafio alimentar em formato duplamente cego e controlado por placebo) (invisível para o paciente e médico) são estratégias seguidas no diagnóstico de alergia ao sésamo, embora estas sejam realizadas em último recurso, uma vez que podem inadvertidamente desencadear respostas alérgicas graves durante o teste (Brough et al., 2020; Yanagida et al., 2019).

A alergia ao sésamo é mediada pelas IgE, podendo elicitar sintomas clínicos que normalmente aparecem de forma rápida (até 2,5 h depois da ingestão do alimento) e que podem variar de moderados (urticaria, rinite, broncospasmo, dores abdominais, vómitos, etc) a potencialmente fatais, como é o caso da anafilaxia (Dalal et al., 2003). Os sintomas clínicos associados ao consumo de sésamo apresentam similaridades com os sintomas desencadeados pelas alergias ao amendoim, a outras sementes ou a frutos de casca rija tal como demonstrado por Pastorello et al., (2001). Também é importante salientar que no estudo de Pumphrey et al., (2007) as reações ao sésamo consistiram em reações sistémicas que colocavam o paciente em perigo de vida com elevada probabilidade de ocorrência de choque anafilático.

As sementes de sésamo são usadas como ingrediente em vários alimentos processados, tais como os produtos de panificação e pastelaria (pão, bolachas, biscoitos, etc.). As sementes de sésamo são também muito utilizadas na preparação de alimentos

sem glúten, que por sua vez são consumidos por indivíduos celíacos (Gangur et al., 2005). Num estudo envolvendo 25 pacientes celíacos, 4 (16%) eram reativos ao sésamo, pelo que o consumo de alimentos sem glúten, mas com adição de sésamo pode representar um elevado risco de saúde para estes pacientes (Peyman et al., 2011). O mesmo foi reportado num outro estudo, onde uma paciente celíaca de 18 anos foi submetida a DBPCFC com doses crescentes de pão de sésamo, tendo desenvolvido sintomas graves (dor abdominal, tosse, dispneia) após consumo de uma pequena porção de pão de sésamo (Pjano et al., 2000).

1.3 Prevalência de alergia do sésamo

A prevalência da alergia alimentar é difícil de determinar, embora com base na informação de diferentes indicadores seja possível fazer uma estimativa. Os indicadores mais conhecidos são os questionários, os quais permitem o acesso a uma elevada quantidade de informação em pouco tempo. No entanto, os dados que são recolhidos com base em questionários devem ver analisados com cuidado, uma vez que as respostas autorreportadas são normalmente sobrevalorizadas, não refletindo de forma realista a verdadeira alergia alimentar. Além dos questionários podem ser utilizadas outras estratégias, tais como os resultados dos testes serológicos e testes por picada. Estes permitem dar uma excelente indicação da prevalência de sensibilização a um dado alimento, mas não da alergia concretamente. Para colmatar esta questão e obter resultados credíveis relativamente as prevalências de alergia alimentar, existem indicadores mais fidedignos e objetivos tais como os testes de provocação oral. Estes podem ser feitos em formato aberto, fechado ou duplamente cego, com recurso a placebo, simulando um ensaio clínico.(Zuidmeer et al., 2008). Os dados relativos à real prevalência da alergia ao sésamo são ainda bastante preliminares. A prevalência de sensibilização ao sésamo pode atingir valores na ordem dos 13% em regiões como a Ásia ou 1-9.7% na Europa (Arakali et al., 2017; Burney et al., 2010). No entanto, a prevalência de alergia clínica ao sésamo deverá ser substancialmente mais baixa, com valores a rondar os 0.12% e 0.5%, tal como estimado para países/regiões como o Canada, EUA e Europa (Ben-Shoshan et al., 2010; Lyons et al., 2019; Warren et al., 2019).

1.4 Caracterização de alergénios do sésamo

Numa perspetiva evolutiva, as proteínas alergénicas são classificadas e catalogadas em famílias dependendo da sua função bioquímica e das suas estruturas (Radauer et al., 2008). A maioria das proteínas de reserva presentes nas sementes de sésamo foram

classificadas com base da sua solubilidade, estando catalogadas nas seguintes classes: albuminas (9%), globulinas (67%), prolaminas (1%) e gluteínas (7%) (Orruño e Morgan 2011). Na realidade, as proteínas alergénicas do sésamo pertencem a 2 grandes superfamílias de proteínas: as prolaminas e as cupinas (Radauer e Breiteneder 2007). Na superfamília das prolaminas está incluída a família das albuminas 2S (Ses i 1 e Ses i 2), enquanto na superfamília das cupinas estão incluídas duas famílias, nomeadamente as vicilinas (Ses i 3) e as leguminas (Ses i 6 e Ses i 7). Existem ainda dois alergénios pertencentes à família das oleosinas (Ses i 4 e Ses i 5) e um à família das profilinas (Ses i 8).

Atualmente, são conhecidas 7 proteínas alergénicas no sésamo, as quais estão incluídas e reconhecidas como alergénios alimentares na base de dados da Organização Mundial de Saúde e da União de Sociedades Internacionais de Imunologia (WHO/IUIS 2020) (Tabela 1). Para além destas, na base de dados da ALLERGOME, (2020) está catalogada o alergénio Ses i 8, uma proteína pertencente à família das profilinas, cuja pertinência como alergénio do sésamo ainda não foi determinado.

Tabela 1 – Informação sobre os 8 alergénios registados na ALLERGOME (2020) e na Organização Mundial de Saúde e União de sociedades Internacionais de Imunologia (WHO/IUIS) (2020).

Alergénio	Peso molecular (KDa)	Classificação bioquímica	Via de exposição	Referência
Ses i 1	9	Albumina 2S	Ingestão	(Pastorello et al., 2001)
Ses i 2	7	Albumina 2S	Ingestão	(Beyer et al., 2002)
Ses i 3	45	Vicilina (globulina 7S)	Ingestão	(Beyer et al., 2002)
Ses i 4	17	Oleosina	Ingestão	(Ovadia et al., 2019)
Ses i 5	15	Oleosina	Ingestão	(Leduc et al., 2006)
Ses i 6	52	Legumina (globulina 11S)	Ingestão	(Beyer et al., 2007)
Ses i 7	57	Legumina (globulina 11S)	Ingestão	(Beyer et al., 2007)
Ses i 8	14	Profilina	Ingestão	(ALLERGOME, 2020)

1.4.1 Ses i 1 e Ses i 2

As albuminas 2S são proteínas de armazenamento muito comuns em sementes de plantas mono- e dicotiledóneas e cuja presença em alimentos (cereais, sementes, frutos de casca rija, leguminosas) parece estar relacionada com uma elevada incidência de reações alérgicas associadas ao seu consumo (Moreno e Clemente 2008). Caracterizada nos inícios dos anos 80, esta classe de proteínas foi designada por “albuminas 2S” com base na sua elevada solubilidade em água e no seu coeficiente de sedimentação após centrifugação em gradiente de sacarose (Youle e Huang 1981). As albuminas 2S pertencem à superfamília das prolaminas, sendo caracterizadas por um baixo peso

molecular (<10 kDa) e por possuírem uma estrutura compacta e rígida composta por vários resíduos de cisteína que lhes conferem grande resistência à atividade proteolítica no trato gastrointestinal (Breiteneder e Radauer 2004). Estruturalmente, as albuminas 2S são proteínas normalmente formadas por duas subunidades (dímeros) de cerca de 9 e 5 kDa, ligadas entre si por pontes dissulfureto, originando estruturas em α-hélice (Beyer et al., 2002). As albuminas 2S estão envolvidas em diversas funções biológicas, tais como na germinação da semente e na defesa da planta. Moreno e Clemente (2008) atribuíram a classificação de alergénios da classe 1, devido ao facto das albuminas 2S serem agentes sensibilizadores por via direta (ingestão). Além disso, as albuminas 2S são proteínas que conseguem preservar a sua conformação mesmo depois de serem submetidas a condições severas de processamento e digestão (por ex: pH ácido, atividade proteolítica das enzimas digestivas).

Ao longo dos anos, alguns membros desta família de proteínas têm sido descritos como alergénios comuns em alimentos, demonstrando uma elevada capacidade de se ligar às IgE específicas de pacientes alérgicos dado terem epítopos expostos nos *loops* que conectam as α-hélices (Moreno e Clemente 2008; Monaci et al. 2020). O primeiro alergénio identificado no sésamo foi uma albumina 2S, designada por Ses i 1, sendo classificada como um alergénio major do sésamo, uma vez que era IgE reativo com mais de 50% dos soros dos pacientes alérgicos ao sésamo (Pastorello et al., 2001). Posteriormente, o alergénio Ses i 2 foi identificado como a segunda albumina 2S presente no soro de pacientes que apresentaram alergia ao sésamo (Beyer et al., 2002). Deste modo, o Ses i 1 e o Ses i 2 são considerados alergénios do sésamo com elevada relevância clínica (Pastorello et al., 2001; Beyer et al., 2002).

Casos relacionados com hipersensibilidade a alimentos contendo albuminas 2S têm sido reportados com uma elevada frequência. Pacientes com reatividade a estas proteínas podem manifestar sintomas ligeiros de irritação da laringe, urticaria e asma, ou sintomas sistémicos bastante severos, tais como choques anafiláticos (Pastorello et al., 2001, Moreno e Clemente, 2008) A severidade dos sintomas poderá estar a associada à quantidade de alergénio ingerido e que é absorvido pela mucosa do intestino, assim como à sua resistência à degradação enzimática (pela pepsina, por exemplo) e ao processamento alimentar (Costa et al., 2020). Para além disso, poderá está associada à ocorrência de reatividade cruzada entre diferentes proteínas da mesma classe (Pastorello et al. 2001).

1.4.2 Ses i 3, Ses i 6 e Ses i 7

As globulinas pertencem à superfamília das cupinas. São proteínas de armazenamento (proteínas de reserva) de plantas mono e dicotiledóneas e estão classificadas de acordo com o seu coeficiente de sedimentação em globulinas 7S (vicilinas) e globulinas 11S (leguminas) (Breiteneder e Radauer 2004). Apesar de não apresentarem elevada similaridade composicional entre si, as vicilinas e as leguminas partilham alguma homologia estrutural, incluindo a capacidade de formar estruturas triméricas e hexaméricas (Shewry et al., 1995). Os dois grupos apresentam uma variação considerável nas suas estruturas, maioritariamente devido a modificações pós-translacionais, como a glicosilação (Shewry et al., 1995).

As leguminas são as proteínas de reserva mais representativas, muitas vezes sendo mesmo a fração proteica predominante (>50%). Estas proteínas têm estruturas hexaméricas com uma combinação aleatória de diferentes subunidades, as quais são formadas por polipéptidos acídicos (30 – 40 kDa) e por polipéptidos básicos (20 – 25 kDa) ligados por ligações dissulfureto (Okubo et al., 1979). O coeficiente de sedimentação das leguminas varia entre 11,0 e 13,0, dependendo do meio iónico do tampão utilizado na sua extração. No sésamo estão identificadas duas leguminas com o coeficiente de sedimentação 11,0, estando classificadas como alergénios alimentares, nomeadamente a Ses i 6 e a Ses i 7 (Tabela 1).

As vicilinas constituem a porção menor de proteína de reserva nas sementes de sésamo (Prakash e Nandi, 1978). No trabalho desenvolvido por Tai et al., (1999) obtiveram as sequências de cDNA que codificam a vicilina e identificaram o polipeptídeo correspondente ao constituinte em menor quantidade nas sementes de sésamo através da técnica de imunodetecção. A purificação das vicilinas das sementes de sésamo foram anteriormente descritas como sendo constituídas por oito polipeptídeos com pesos entre os 12,4 a 65,5 kDa e que não continham ligações dissulfureto (Orruño e Morgan 2007). As vicilinas têm estruturas triméricas com peso molecular entre os 150 a 190 kDa, sendo constituídas por 3 monómeros de 40 a 80 kDa (Breiteneder e Radauer 2004). São compostas por domínios N- e C-terminais e são estruturalmente estabilizados por interações hidrofóbicas não covalentes, por ligações de hidrogénio e por interações Van der Waals. Adicionalmente são classificadas como glicoproteínas, por possuírem locais de glicosilação (Costa et al., 2020). A vicilina do sésamo é designada por Ses i 3 e foi identificada juntamente com outros três alergénios com recurso ao uso de soro de pacientes com alergia ao sésamo (Tabela 1) (Beyer et al., 2002). No entanto, ao contrário das albuminas 2S, as vicilinas são constituintes minoritários das sementes de sésamo e contêm apenas uma cadeia polipeptídica em vez de duas subunidades ligadas por pontes dissulfureto (Beyer et al.,

2002). Existe uma elevada homologia entre os epítopos reativos da Ses i 3 e da Ara h 1 (vicilina do amendoim), o que poderá resultar em reatividade cruzada com relevância clínica em certos pacientes (Beyer et al., 2002).

1.4.3 Ses i 4 e Ses i 5

As oleosinas são uma nova classe de alergénios identificados no sésamo, o Ses i 4 e o Ses i 5, após serem reconhecidos pelas IgE específicas do soro de pacientes com alergia ao sésamo (Tabela 1) (Leduc et al., 2006). Foi descrito que pacientes desenvolveram choques anafiláticos a quantidades mínimas de óleo de sésamo (Morisset et al., 2003). Apesar das oleosinas representarem cerca de 80-90% do total de proteínas presentes nos corpos lipídicos, apenas corresponde a 1-2% de total de proteínas na semente de sésamo (Leduc et al., 2006). Devido às suas propriedades lipofílicas, as oleosinas sempre foram sub-representadas em diagnósticos que envolvem extratos maioritariamente aquosos (Schwager et al., 2015). Por isso, foi desenvolvido um novo método para a purificação de alergénios presentes na fração lipídica, permitindo o isolamento de oleosinas a partir de corpos lipídicos presentes no amendoim (Schwager et al., 2015).

Este método, baseado numa cromatografia hidrofóbica de interação (HIC), foi usado recentemente para esclarecer o papel das oleosinas na alergia ao sésamo (Ehlers et al., 2019). Neste estudo, demonstrou-se que as oleosinas foram inequivocamente reconhecidas em 17% de pacientes com alergia ao sésamo baseado da deteção por IgE e IgG específicas. No entanto, concluiu-se que as oleosinas são alergénios “minor” quando comparados com o alergénio Ses i 1 (por reagirem com menos de 50% dos soros de pacientes alérgicos ao sésamo) (Ehlers et al., 2019).

1.4.4 Ses i 8

As profilinas são proteínas citosólicas, com 12 a 15 kDa, presentes em todas as células eucarióticas (Breiteneder e Radauer, 2004). Estas proteínas participam na reorganização do citoesqueleto, funcionando como controlo do sinal de transdução entre a membrana externa e interna regulando os níveis de cálcio intracelular e a atividade do sistema dos microfilamentos (Asturias et al., 2002). As suas estruturas compreendem três α-hélices, sete cadeias-β e dez *loops* que formam dois núcleos hidrofóbicos separados por uma folha central-β de seis cadeias (Krishnan e Moens, 2009).

Além disso, estas proteínas ligam-se a monómeros de actina e regulam a polimerização dos microfilamentos de actina durante o crescimento de tubos polínicos nas plantas, em pelos radiculares ou no alongamento celular (Breiteneder e Radauer, 2004; Monaci et al.,

2020). As IgE específicas da profilina apresentaram reatividade cruzada com profilinas do pólen e vegetais (Van Ree et al., 1992). As profilinas desnaturam quando em contacto com enzimas do trato gastrointestinal ou com o calor, sendo a sua alergenicidade maximizada quando os vegetais e as frutas são consumidas na sua forma crua, com os sintomas alérgicos a serem geralmente restritos à cavidade oral (Monaci et al., 2020). As duas profilinas alergénicas conhecidas do pólen de bétula e de látex de *Hevea brasiliensis* são bastante conservadas a nível de sequência e de estrutura (Breiteneder e Radauer, 2004). No sésamo, foi identificada uma profilina com potencial alergénico, a Ses i 8, não estando ainda reconhecida como tal pela WHO/IUIS (Tabela 1).

1.5 Fenómenos de reatividade cruzada

Os fenómenos de reatividade cruzada são manifestações clínicas que ocorrem quando as IgE específicas de um dado alergénio reconhecem proteínas homologas provenientes de diferentes origens, nomeadamente de outras plantas (García e Lizaso, 2011). A probabilidade de ocorrer o fenómeno de reatividade cruzada é geralmente maior quando envolve espécies filogeneticamente próximas (Aalberse et al., 2001), no entanto também pode ocorrer entre espécies geneticamente afastadas. Nestes casos, os alergénios são habitualmente proteínas homólogas que pertencem a famílias moleculares específicas. Frequentemente, a reação alérgica é causada por proteínas que, de uma perspetiva evolutiva, são altamente conservadas e dada a sua presença generalizada foram denominados por pan-alergénios (Hauser et al., 2010). Assim, devemos ter em consideração não só a classificação taxonómica dos organismos, mas também a classificação molecular dos alergénios, já que ambos desempenham um papel fundamental nos fenómenos de reatividade cruzada (García e Lizaso, 2011).

Segundo diversos autores, os alergénios Ses i 1 e Ses i 2 apresentam elevadas homologias com proteínas presentes em outras espécies vegetais. Têm sido reportadas evidências de reatividade cruzada de alergénios do sésamo com proteínas homólogas de outros alimentos, nomeadamente, a avelã, a noz, a amêndoa, o centeio, o kiwi, as sementes de papoila, a noz preta, o caju, a noz de macadâmia, o pistácio e o amendoim. Contudo, apesar da elevada homologia entre alergénios de diferentes espécies, a significância clínica destas reações cruzadas permanecem pouco claras (Dalal et al., 2012). As albuminas 2S do sésamo têm homologia com outros alergénios da mesma família, tais como a Jug r 1 (38%) da avelã, a Ber e 1 (40%) da castanha do Brasil e a Ara h 2 (34%) do amendoim. A vicilina Ses i 3 apresenta uma homologia de 36% com a Ara h1 do amendoim e 41% com a Jug r 2 da avelã (Beyer et al., 2002).

Recentemente, foi demonstrada a possibilidade de proteínas das sementes de chia terem homologia com proteínas do sésamo pertencentes à família das globulinas. Devido à elevada similaridade das estruturas primárias e secundárias das vicilinas pensa-se que ocorra reatividade cruzada, nomeadamente, com a Cor a 11 da avelã; Ara h 1 do amendoim e Ses i 3 das sementes de sésamo (Beausoleil e Spergel, 2006). A ocorrência de fenómenos de reatividade cruzada foram também verificadas entre a Jug r 6 (60% de homologia) da noz com a Ses i 3 (sésamo), assim como com a Jug r 2 (40% de homologia) (Dubiela et al., 2018). Pacientes IgE-reativos às oleosinas de sésamo evidenciaram co-sensibilização com oleosinas da noz, da avelã e do amendoim, indicando uma potencial reatividade cruzada com estas espécies (Ehlers et al., 2019).

As leguminas são encontradas em várias espécies vegetais tais como: o amendoim (Ara h 3), a noz (Jug r 4), a avelã (Cor a 9) e o caju (Ana o 2) (Blankestijn et al., 2018). Pacientes sensibilizados às leguminas do sésamo e do amendoim podem sofrer reações alérgicas por reatividade cruzada com proteínas homologas na chia (Lehrer et al., 2002) . Testes *in vitro* de reatividade cruzada para a legumina Ses i 6 e a Jug r 4 foram realizados com o soro de 37 pacientes que apresentavam um historial clínico de reações alérgicas severas ao amendoim, noz e/ou sésamo (Blankestijn et al., 2018). Pacientes sensibilizados às proteínas Ara h 1 (vicilina) e Ara h 3 (legumina) do amendoim apresentaram reatividade cruzada com o sésamo (Maruyama et al., 2016).

1.6 Efeito do processamento alimentar na alergenicidade do sésamo

Existem diversas técnicas utilizadas na indústria alimentar nomeadamente os processamentos térmicos e os não térmicos. Dentro dos processamentos térmicos, podem-se destacar todos os que envolvem a aplicação de calor tais como a cozedura no forno, a fervura, a autoclavagem, a torra, entre outros. As técnicas de processamento alimentar não térmico envolvem diferentes tecnologias, nomeadamente com recurso à aplicação de pressão, de radiação (raios gama, ultravioleta, campos elétricos), de ultrassons, bem como dos processamentos químicos/enzimáticos (Costa et al., 2020). Estas técnicas têm como finalidade melhorar os atributos nutricionais, funcionais e sensoriais dos alimentos, assim como garantir/aumentar a sua preservação (Rahaman et al., 2016). No entanto, estes métodos alteram a estrutura das proteínas alimentares de diferentes formas, podendo promover modificações estruturais tais como desnaturação, agregação das proteínas e/ou de outros componentes (lípidos, carboidratos) e modificações químicas, tais como a oxidação, fenómenos de glicação (reações de Maillard) (Lepski e Brockmeyer, 2013; Toda et al., 2014) e hidrólises enzimáticas ou acídicas (Kasera et al., 2015).

Diferentes processamentos alimentares podem afetar a estrutura dos epítopos conformacionais e sequenciais das proteínas alergénicas, alterando o seu potencial alergénico. As alterações conformacionais induzidas pelo processamento podem afetar a digestibilidade do alergénio, alterando a cinética de absorção por parte da mucosa, bem como a sua apresentação ao sistema imunitário, influenciando a sua alergenicidade. Por exemplo, a agregação e a desnaturação das proteínas podem mascarar ou expor novos epítopos conformacionais (Costa et al., 2020; Rahaman, et al., 2015). No entanto, o grau de alteração estrutural e a alergenicidade depende do método de processamento utilizado, do tempo de exposição, da presença de outros ingredientes na matriz, como por exemplo o sal, açúcar entre outros (Verma et al., 2012).

Existem diferentes tipos de processamento térmico (fritura, torra, fervura, branqueamento e micro-ondas) aplicados ao sésamo. A utilização da torra e fervura pode alterar as estruturas das proteínas do sésamo, podendo mascarar ou formar novos epítopos conformacionais e promover a diminuição ou o aumento, respetivamente da alergenicidade do sésamo (Achouri e Boye, 2013). O alergénio Ses i 1 tem uma elevada resistência térmica a 100 ºC, tanto a pH ácido como neutro, sendo também muito resistente aos processos digestivos (Moreno et al., 2005). Também a pressão a que os alimentos são submetidos pode aumentar ou diminuir a alergenicidade, tendo-se concluído que a aplicação de elevadas pressões contribui para diminuir a alergenicidade do sésamo (Achouri e Boye, 2013).

Outros fatores, como o pH e a forca iónica presentes na matriz, também podem influenciar a alergenicidade dos alimentos. Através de utilização do método ELISA, demonstrou-se haver diferenças nos resultados de imunoreatividade do sésamo em função de parâmetros de pH e pressão, tendo-se observado um efeito dominante do pH. Assim, concluiu-se que o efeito da pressão em função de diferentes valores de pH diminuiu a alergenicidade do sésamo. A solubilidade dos componentes de elevado peso molecular aumenta com concentrações crescentes de sal (0,6-1 M) e que as mudanças conformacionais que ocorrem devido à introdução de sal poderiam potencialmente impedir os epítopos reativos das proteínas do sésamo de reagir com os anticorpos IgG (Achouri e Boye, 2013). É também relevante referir que o efeito da radiação gama (<10 kGy) foi aplicado a leguminas e esta tecnologia não surtiu qualquer alteração na imunoreatividade das proteínas Ses i 6 e Ses i 7 (Zoumpoulakis et al., 2012).

1.7 Deteção/quantificação do sésamo em alimentos

De acordo com a legislação vigente na União Europeia (Regulamento (UE) nº 1169/2011), existe a obrigatoriedade da rotulagem do sésamo em alimentos processados

pré-embalados, por este ser classificado como alimento alergénico e ser um dos 14 grupos de alimentos listados na legislação. De facto, a informação veiculada na embalagem dos alimentos processados pré-embalados é a única forma que os consumidores alérgicos têm de selecionarem os produtos que podem consumir. A informação dos rótulos deve ser clara e verdadeira, de forma a permitir uma escolha informada por parte destes consumidores. O controlo da rotulagem é de vital importância, pois permite garantir a veracidade do produto e impedir possíveis reações imunológicas adversas em consumidores alérgicos (Holzhauser et al., 2020). Com o objetivo de proteger a saúde dos consumidores alérgicos e auxiliar a indústria alimentar e as agências regulatórias a controlar a presença de alergénios alimentares, é de máxima importância o desenvolvimento de técnicas analíticas com elevada especificidade e sensibilidade. Estas permitem auxiliar uma melhor gestão da presença de alimentos alergénicos por partes dos diferentes organismos (indústria alimentar, agências reguladoras, etc.) e a fornecer informação detalhada de potenciais contaminações com outros alimentos alergénicos que possam ser suscetíveis de desencadear possíveis reações adversas em consumidores sensibilizados/alérgicos.

Quantidades vestigiais tais como 0,1 mg de proteína de sésamo podem ser suficientes para desencadear uma reação imunológica adversa num individuo alérgico, pelo que a presença não intencional de sésamo em produtos processados (devido a contaminação cruzada durante produção) podem representar um elevado risco para a saúde destes consumidores (Bureau 2019)

Presentemente, existem dois grandes grupos de técnicas disponíveis para a análise de alergénios alimentares, nomeadamente os métodos baseados na análise de proteínas e os métodos baseados na análise de DNA.

1.8 Métodos proteicos

1.8.1 ELISA

Entre as abordagens analíticas baseadas no reconhecimento de anticorpos, o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) tem sido a metodologia mais amplamente utilizada nas análises de rotina na deteção de alergénios devido à sua elevada precisão, sensibilidade (1-25 ppm), fácil utilização e com potencial para padronização (Jayasena et al., 2015). A afinidade e especificidade dos anticorpos selecionados em relação ao analito afetam a sensibilidade, especificidade e robustez do método. Apesar de os anticorpos monoclonais reconhecerem epítopos específicos, os anticorpos policlonais são os mais utilizados na deteção de alergénios, porque podem ligar-se a diferentes tipos de epítopos da mesma proteína alergénica e podem tolerar pequenas alterações na natureza dos

antigénios (Costa, et al. 2017a). Os pontos cruciais na aplicação do método ELISA são o método de extração e a solução padrão utilizados na calibração.

A solubilidade da proteína de alimentos crus pode diferir substancialmente do seu estado nativo ou mesmo, ocorrer agregação, desnaturação ou modificação química quando submetido a efeitos de processamento (Verhoeckx et al., 2015). Neste caso, deve-se ter em consideração a seleção do kit para que seja adequado e escolher preferencialmente tampões alcalinos para a extração de proteínas quando temos matrizes difíceis de analisar (Azarnia et al., 2013). O processamento pode alterar a eficiência dos anticorpos no reconhecimento de epítopos devido ao efeito de camuflagem dos epítopos alvo (exemplo desnaturação) ou a modificações químicas, prejudicando a deteção, a sensibilidade e confiança do método (Verhoeckx et al., 2015).

Nos últimos anos, verificou-se o desenvolvimento de métodos ELISA mais sensíveis para análise em matrizes processadas, bem como o desenvolvimento métodos mais eficientes para a extração de diferentes proteínas alergénicas. Comercialmente existem vários kits ELISA para a quantificação de sésamo em variadas matrizes (ex. produtos de panificação e pastelaria), apresentando sensibilidades muito baixas (0,2-0,3 ppm). Na Tabela 2 estão listados alguns dos kits ELISA comerciais para a quantificação de sésamo em alimentos. Como exemplo de métodos ELISA não comerciais, Redl et al., (2010) propuseram um método ELISA em formato sandwich para a quantificação de sésamo torrado e sésamo não processado. O método permitiu a quantificação de sésamo com elevada sensibilidade variando entre 0,6 e os 1,4 mg/kg de proteína de sésamo em diferentes matrizes (pão, tostas e snacks).

Tabela 2 - Exemplos de kits ELISA comerciais para a quantificação de sésamo em alimentos.

Marca kit	Sensibilidade (LOD)	Proteína alvo/anticorpo	Matrizes a analisar
Sesame ELISA Kit (ELISAkits.co.uk)	0.2 ppm	Proteínas do sésamo	Produtos de panificação, gelados, sopas, molhos, salsichas
AgraQuant® Sesame (Key Diagnostics, Gymea, Australia)	0.2 ppm	Proteínas do sésamo	Alimentos crus e processados, amostras de água e ambientais.
AgraQuant® Sesame test kit (RomerLabs, Diagnostic GmbH, Tulln, Austria)	0.2 ppm	Proteínas do sésamo	Alimentos crus e processados, amostras de água e ambientais.
Biofront technologies Sesame ELISA – 96 wells	0.3 ppm	Proteínas de sésamo	Alimentos e amostras ambientais
Demeditec - Sesame ELISA DESESE01	0.2 ppm	Proteínas de sésamo	Alimentos
Eurofins Technologies SENSISpec ELISA Sesame 48 wells	2 – 30 ppm	Proteínas de sésamo	Produtos de panificação, gelados, sopas, molhos, salsichas

1.8.2 Plataformas de espectrometria de massa (MS)

Os métodos baseados em espectrometria de massa (MS) têm sido desenvolvidos para a deteção e identificação de alergénios presentes em alimentos. O trabalho experimental

para análise baseada em MS inclui a extração e purificação de proteínas de alimentos potencialmente contaminados, seguida de digestão tríptica e deteção dos péptidos proteotípicos por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS) sob condições instrumentais adequadas. Cada etapa de trabalho necessita de uma otimização apropriada com a finalidade de garantir o melhor desempenho em termos de sensibilidade, especificidade e robustez (Monaci et al., 2020).

A identificação de marcadores é uma das etapas mais importantes, porque o método analítico geral será afetado pelo análise e seleção dos péptidos (seletividade, especificidade e estabilidade) das proteínas de interesse. Diferentes propostas foram feitas sugerindo a necessidade de critérios gerais de seleção para péptidos marcadores, para promover a harmonização de estratégias no desenvolvimento de métodos baseados no MS. Adicionalmente, deve-se ter em atenção a otimização da extração e purificação das proteínas, especialmente se o método for otimizado para matrizes complexas e processadas. Nestes casos, existem dois fatores a considerar, nomeadamente o rendimento da extração é mais baixo e as modificações amino-acídicas.

Tal como referido previamente, um dos maiores problemas de deteção de alergénios é o processamento dos alimentos que geralmente afeta a estrutura ou solubilidade do alergénio quando sujeitos ao calor ou processos químicos (van Hengel, 2007). Estas alterações da estrutura da proteína poderão afetar a deteção final do alergénio em causa por ensaios imunológicos. Para ultrapassar estas dificuldades, os métodos baseados em MS podem ser muito úteis, uma vez que são muito sensíveis e baseiam-se na análise de fragmentos proteicos.

Para a quantificação especifica de sésamo em alimentos, Ma et al. (2020) propuseram um método de LC-MS/MS para a quantificação do alergénio Ses i 2, obtendo sensibilidades na ordem dos 20 mg de Ses i 2 por kg de bolachas processadas e não processadas.

1.9 Métodos baseados na análise de DNA

1.9.1 PCR qualitativa

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é considerada uma técnica fundamental na obtenção de quantidades maiores de DNA através da duplicação de sequências presentes, e pode ter diversas utilidades tais como a genotipagem, clonagem, mutagénese, entre outras. A técnica de PCR consiste nos mecanismos de replicação *in vitro* em que são necessárias componentes para a síntese de novas moléculas de DNA. Incluem-se na mistura da PCR: água, pares de bases azotadas (adenina, guanina, citosina e timina - dNTP) para a formulação de sequências de DNA alvo, enzima Taq polimerase, Mg^{2+} que

funciona como cofator da enzima, um par de *primers* complementar à zona alvo e tampão para promover as condições ideais da reação. Para cada ensaio é necessário recorrer a um programa de temperaturas que é constituído por três fases: desnaturação (separação das cadeias de DNA a 94ºC-96ºC); hibridização (ligação dos *primers* à zona complementar na cadeia de DNA simples (sentido 5' – 3') a 50ºC-65ºC) e por fim a extensão (replicação da cadeia alvo que ocorre à temperatura ótima de 72ºC). Este processo pode ser repetido entre 25 a 40 ciclos, com a produção de fragmentos alvo que podem ser verificados posteriormente por eletroforese em gel de agarose.

Esta técnica é também utilizada para fins de deteção e identificação de alergénios de diferentes espécies. A PCR tem vindo a ser amplamente utilizada com alvo em genes unicópia que codificam proteínas alergénicas (Kang 2019). No trabalho de Houhoula et al., (2015) a PCR qualitativa foi usada para a deteção de vestígios de sésamo em vários alimentos, através da amplificação de um fragmento do gene que codifica a proteína Ses i 1, apresentando sensibilidade adequada (50 mg/kg) para a deteção de sésamo em alimentos processados. Para além da utilização de genes unicópia, existem trabalhos desenvolvidos para a deteção de sésamo através de genes multicópia ou regiões ITS (*Internal transcribed spacer*) (região de DNA situada entre a subunidade pequena e grande do RNA ribossomal). Estes genes são úteis na identificação de vestígios de sésamo nos alimentos, uma vez que estão presentes num grande número de cópias quando comparado com o DNA nuclear, possibilitando o desenvolvimento de sistema de PCR com elevada especificidade e sensibilidade (Maruyama et al., 2016; Cheng et al., 2016).

Através da PCR em formato multiplex, é também possível amplificar simultaneamente múltiplas regiões de DNA, adicionando vários pares de *primers* à mesma mistura, e assim detetar a presença de diferentes alergénios na mesma amostra. A fim de aumentar a sensibilidade de deteção, a análise dos produtos de PCR em multiplex pode ser feita por eletroforese capilar (eliminado o passo de análise por eletroforese em gel de agarose), possibilitando, por exemplo, uma deteção mais eficiente de 10 alergénios alimentares, de entre os quais a albumina 2S do sésamo (Cheng et al., 2016). Existem fatores que podem interferir com a PCR, tais como a presença de inibidores na reação (como no caso de componentes existentes nos alimentos, tais como gorduras, açúcares, entre outros (Costa, et al., 2017b). Para colmatar esta questão, a utilização de um gene de referência 18S rRNA é um bom sistema de controlo para avaliar a presença de DNA amplificável e a presença de inibidores da PCR (Kang 2019).

1.9.2 PCR em tempo real

Os métodos baseados em PCR em tempo real fornecem uma estimativa precisa e fiável do DNA alvo de um ingrediente alimentar, permitindo validar, por comparação com a rotulagem, se os valores se encontram em conformidade com o esperado. A PCR em tempo real tem inúmeras vantagens em relação a outras técnicas, nomeadamente a rápida execução, aplicação para análise de rotina e boa relação custo/tempo de análise. Esta baseia-se na aquisição de um sinal analítico (fluorescência) em cada ciclo de amplificação que é proporcional ao logaritmo da concentração inicial de DNA.

A PCR em tempo real tem sido amplamente aplicada para a deteção de ingredientes alergénicos em alimentos processados, usando sondas de hidrólise marcadas (tipo *TaqMan*) ou corantes que intercalam os ácidos nucleicos, tais como os corantes *SybrGreen* ou *EvaGreen* (Costa et al., 2017a). O uso de sondas de hidrólise específicas permite aumentar a especificidade do método de PCR em tempo real, uma vez que a sonda funciona como um 3º *primer* que tem de emparelhar corretamente na zona de interesse, que por ação da *Taq* polimerase inicia a amplificação de uma nova cadeia complementar à região alvo. Durante a amplificação, a atividade de 5' exonuclease da *Taq* polimerase permite clivar a sonda hibridizada e separar o *quencher* do fluoróforo, levando à emissão de fluorescência cujo sinal é quantificado ao final de cada ciclo de amplificação. Quanto aos corantes, estes ligam-se intercaladamente às moléculas de ácidos nucleicos de cadeia duplas, resultando na emissão de fluorescência que é quantificada no final de cada ciclo de amplificação. A especificidade dos produtos de PCR é posteriormente avaliada por uma análise de desnaturação dos fragmentos amplificados (análise de *melting*) (Costa,et.al. 2017a) .

A PCR em tempo real é uma técnica de quantificação absoluta de DNA, sendo necessário usar uma curva de calibração com amostras de referência (misturas modelo) que pode ser obtida através de concentrações conhecidas do alergénio em estudo em diferentes matrizes modelo (Costa, et al., 2017a). Como sugerido por Platteau et al. (2011), o DNA deve ser extraído com o mesmo protocolo usado para as amostras e analisado simultaneamente. Assim, a quantidade detetada do ingrediente alergénico pode ser associada à sua concentração relativa no alimento. Contudo, deve-se recorrer a uma matriz apropriada para quantificar o alergénio, garantido a homogeneidade das amostras a serem analisadas e a sua representatividade. Por norma, os alimentos alergénicos estão presentes em diversos produtos alimentares, pelo que seria muito difícil selecionar uma matriz alimentar comum para ser utilizada na construção da curva de calibração (Platteau et al., 2011). Para contornar esta questão, é frequente o recurso a misturas modelo que são constituídas por uma matriz contendo quantidades conhecidas do alimento alergénico.

Todavia, para a construção de uma curva de calibração adequada, deve ter-se em consideração a seleção de uma matriz apropriada, a seleção da natureza alergénica do ingrediente utilizado e se a matriz a utilizar é processada ou crua. O efeito de matriz é considerado um interferente na precisão do método de PCR em tempo real (Villa et al., 2018). Demonstrou-se também que matrizes processadas influenciam a deteção e quantificação do alimento alergénico (Costa, et al., 2017b). Para além dos efeitos anteriormente descritos, o processamento em alimentos podem influenciar substancialmente a integridade do analito de interesse e a sua capacidade de extração (Bauer et al., 2003).

São conhecidos diversos marcadores moleculares multicópia que podem ser utilizados na determinação de alergénios tais como os genes *rbcl*, *matk*, *cytb*, ou até mesmo regiões ITS (Brezná e Piknová, 2013), tanto em espécies animais como vegetais. López-Calleja et al., (2015) utilizaram o ITS1 como região multicópia alvo para o desenvolvimento de um método de PCR em tempo real em formato duplex para quantificar sésamo em sementes de linhaça com elevada sensibilidade (1,3 mg/kg) (López-Calleja et al., 2015). Os métodos de PCR em tempo real com alvo em genes multicópia permitem melhores sensibilidades quando comparados com os genes unicópia. Em contrapartida, os genes unicópia com alvo em regiões que codificam alergénios têm sido reportados como menos sensíveis (10−50 mg/kg) mas com melhor correlação com a expressão da proteína (Prado et al., 2016). Existem diversos exemplos na literatura que evidenciam a utilização de genes unicópia na quantificação do sésamo, sobretudo, dos genes que codificam a proteína albumina 2S (Tabela 3).

Brzezinski, (2007) desenvolveu um método de deteção de DNA em alimentos processados utilizando o gene que codifica a albumina 2S no sésamo. Conseguiu determinar valores diversos em diversas matrizes, desde chocolates, bolachas, *tahini*, granola, húmus e barras energéticas. Com a formulação de uma sonda *de* hidrólise conseguiu obter uma sensibilidade de 50 mg/kg de sésamo em matriz. Um outro exemplo com alvo no gene que codifica a proteína albumina 2S é o trabalho de Mustorp, et al. (2008) que desenvolveu sondas específicas para cada espécie (sésamo, mostarda e aipo) para determinação de vestígios destes ingredientes alergénicos em diversos alimentos processados (hambúrgueres vegetarianos, molhos, farinhas e carne picada), conseguindo obter um LOD de 5 mg/kg de sésamo em matriz. Dois sistemas de PCR duplex com alvo no gene da albumina 2S para deteção de sésamo e noz em bolachas foram propostos: um com corante universal SybrGreen e outro com sonda de hidrólise. Os sistemas permitiram LOD na ordem 50 mg/kg com a vantagem de deteção/identificação em simultâneo de 2 espécies diferentes em matrizes processadas (Schöringhumer et al., 2009).

Tabela 3 – Métodos de PCR em tempo-real para quantificação de sésamo em diferentes matrizes alimentares.

Gene	Método	Corante/ sonda	LOD	Matrizes		Reatividade cruzada	Referência
Ses i 1 AF240005	Simples	Taqman	1 mg/kg	Húmus, tahini, granola, frutos, bolachas, barras de cereais	Misturas modelo processadas de sésamo em trigo	Não reportado	(Brzezinski, 2007)
Ses i 1 AF240005	Simples	Taqman	5 mg/kg	Hamburgers vegetarianos, molhos, farinhas, carne picada	Sem informação	Sem reatividade cruzada reportada	(Mustorp et al., 2008)
Ses i 1 AF240005	PCR duplex	SybrGreen /taqman	1 mg/kg	Cereais, bolachas, cereais com chocolate, muesli, iogurte com muesli, bolachas de coco, manteiga de amendoim, pão	Sem informação	Sem reatividade cruzada reportada	(Schöringhu mer et al., 2009)
ITS AF169853	PCR duplex	Taqman	1,3 mg/kg	Chocolates, bombons, biscoitos, cereais, barras de nozes, sorvete, creme de chocolate, iogurte, bebida, pão, refeição pré-cozida, torrão e bolo de arroz	Misturas binárias sésamo em linhaça	Sem reatividade cruzada reportada	(López-Calleja et al., 2015)
Ses i 1 AF240005	PCR Multiplex	Taqman	~0.005%	Gelado de pistácio, pistácio tostado, creme de noz, pesto, cuscuz, tostas integrais, pão, iogurte, waffle de baunilha, biscoitos de cereais	Sem informação	Sem reatividade cruzada reportada	(Torricelli, et al, 2020)
Não especifica	Multiplex PCR	Sybrgreen	0,5 pg de DNA	Biscoitos de amêndoas, biscoitos com chocolate, noz, chocolates, bolachas com sésamo.	Misturas binárias sésamo em farinha trigo	Sem reatividade cruzada reportada	(Pafundo et al., 2010)
Ses i 1 AF240005	Multiplex PCR	Sybrgreen/ Taqman	0,1 ng de DNA	Biscoito, chocolates diversos e molhos diversos	Sem informação	Sem reatividade cruzada reportada	(Zhang et al., 2018)

Torricelli, et al., (2020) desenvolveu um sistema de PCR com alvo no gene da albumina 2S do sésamo e pistácio e no gene da vicilina da noz de macadâmia para desenvolver um método de deteção simultânea de múltiplos genes. Em amostras comerciais, a PCR permitiu ter sensibilidades de 0.005% para o sésamo; 0.004% para o pistácio; 0.006% para a noz de macadâmia. Pafundo, et al, (2010), desenvolveu um método multiplex para a deteção de diversas espécies consideradas alergénicas (amêndoa, noz, caju, amendoim, avelã e sésamo). O método permitiu a deteção de 5 pg de DNA para a amêndoa, avelã e amendoim, e 0,5 pg para sésamo, noz e caju em amostras comerciais. Nos mesmos termos descritos anteriormente, Zhang, et., (2018), propuseram um sistema PCR triplex cujo LOD foi de 0.005% de sésamo em amostras comerciais. López-Calleja et al., (2015) utilizaram uma região multicópia para o sésamo (ITS1) para o desenvolvimento de uma PCR multiplex obtendo um LOD de 1,3 mg/kg de sésamo em amostras comerciais.

1.9.3 Biossensores

Considerada uma técnica emergente, os biossensores têm vindo a ser aplicados na deteção de alergénios. Os biossensores têm a capacidade de monitorizar especificamente a interação em tempo real através da imobilização da molécula alvo. Esta pode ser um

fragmento de DNA ou uma proteína ligada a uma superfície de um chip e é medida quantitativamente através da interação entre uma ou mais moléculas. Os biossensores podem ser categorizados pelo modo de transdução. Podem ser óticos, piezoelétricos e eletroquímicos (Dumitru et al., 2016).

O biossensor ótico combina as propriedades eletro-óticas e a aplicação tecnologia microeletrónica na deteção de alergénios (Pilolli et al., 2013). Estes medem as alterações provocadas pelos analitos quando se ligam ao sensor do chip, dando origem ao complexo recetor-alvo. Este tipo de técnica requer menos tratamento à amostra o que proporciona uma maior eficiência para matrizes alimentares complexas e usa a colorimetria ou fluorescência na deteção. Neste tipo de ensaios podem utilizar em moléculas de DNA ou proteínas dependendo do analito a analisar (Neethirajan et al., 2018).

As sequências de DNA dos alergénios de sésamo podem ser detetadas através da tecnologia de nanopartículas. Esta abordagem combina a utilização de sequências de DNA e a utilização de espectroscopia confocal (Vial et al., 2017). Na deteção do alergénio de sésamo são utilizadas 2 cores monocromáticas e sondas que contém nanopartículas de ouro e prata. Quando o DNA alvo é apresentado à sonda com informação complementar ocorre o reconhecimento e emissão de sinal analítico (Vial et al., 2017). Este corresponde à quantidade do alergénio presente na amostra/alimento. O biossensor é sensível e altamente específico permitindo identificar diferenças de um só par de base com o DNA alvo ou de vários pares de bases, ou até mesmo na ocorrência de deleções e *mismatch*. As dispersões dos sinais são mais fortes que a florescência proveniente dos análogos, tornando o método rápido de quantificar, altamente sensível e de fácil utilização. Este método permite níveis de deteção muito baixos, entre os 5 pM e 1,5 nM, sendo que o limite deteção mais baixo de 1 pM (Vial et al., 2017).

2 Objetivo do trabalho

Tendo em conta a relevância que a alergia ao sésamo tem vindo a demonstrar, este trabalho visou o desenvolvimento de métodos de PCR qualitativa e PCR em tempo real para a deteção/quantificação de sésamo como alimento alergénico. Como objetivos específicos, pretenderam-se explorar diferentes genes unicópia (que codificavam alergénios) e multicópia (genes mitocondriais, cloroplastídicos) como potenciais novos marcadores moleculares para a deteção e identificação de sésamo como espécie. Para tal, foram exploradas diferentes ferramentas de bioinformática. Através da análise *in silico* foi possível obter informações de possíveis reatividades cruzadas do sésamo com outras espécies presentes na base de dados do NCBI, permitindo a seleção de regiões mais

específicas para o sésamo. Após seleção de genes específicos para sésamo, foram desenhados *primers* que foram posteriormente testados experimentalmente com espécies de plantas e animais para eliminação de potencias reatividades cuzadas. Foram ainda exploradas diferentes abordagens de PCR em tempo real, nomeadamente com recurso a corante universal e com o uso de sonda de hidrólise.

Neste trabalho foram preparadas misturas modelo de massa de biscoito com diferentes quantidades de sésamo (10%-0,00001% de sésamo (m/m), *n*=13) para permitir o desenvolvimento de um método quantitativo baseado em PCR em tempo real, o qual foi validado com um conjunto de amostras cegas. O efeito do processamento foi também avaliado recorrendo a misturas modelo termicamente processadas (biscoitos de sésamo). Esta abordagem permitiu verificar qual o melhor método a ser desenvolvido com o intuito de obter valores de limite de deteção mais baixos.

Componente Experimental

3 Metodologia

As regras de boas práticas de laboratório são de especial importância na área da biologia molecular, pelo que devem ser criteriosamente seguidas. Desta forma, todo o processo de preparação, processamento e trituração de amostras e misturas modelo foi efetuado com recurso a material quimicamente descontaminado com uma solução de hipoclorito de sódio durante 30 minutos. De igual forma, todos os passos seguintes de extração e otimização de reações de PCR foram realizados com recurso a consumíveis descartáveis esterilizados (autoclavados a 121ºC, 15 min) ou quimicamente descontaminados. Todos os reagentes utilizados são apropriados para uso em biologia molecular (livres de RNases e DNases).

3.1 Preparação das misturas modelo de sésamo em massa de biscoito

Na ausência de materiais de referência para o estudo de alergénios alimentares, foi necessária a preparação de misturas modelo que permitissem o desenvolvimento e otimização de metodologias baseadas na PCR qualitativa e na PCR em tempo real. As misturas modelo propostas correspondem a massa para biscoitos e biscoitos processados que foram preparadas por adição de quantidades conhecidas de sésamo. As amostras de referência utilizadas para este trabalho foram adquiridas no mercado local, que dentro das 2 variedades de sésamo optou-se pelo sésamo branco a ser adicionado na matriz. A matriz mimetizava biscoitos (processados e não processados) que foram utilizados como padrões de referência para o desenvolvimento de uma curva de calibração para a quantificação de sésamo. Desta forma, o sésamo branco foi triturado num moinho de lâmina dupla (Grindomix GM200, Retsch, Haan, Alemanha) no dia anterior à preparação das misturas modelo para evitar possíveis contaminações.

As misturas modelo foram preparadas com uma matriz livre de sésamo, nomeadamente usando uma massa de biscoitos de acordo com a seguinte receita: 750 g de farinha, 750 g de farinha integral, 720 g de manteiga, 12 ovos (~480 g) e 540 mL de água. Desta mistura inicial foi retirada uma porção que foi congelada imediatamente a -20ºC e outra porção que foi submetida a posterior processamento (cozedura em forno), representando as misturas modelo contendo 0% de sésamo (SES0 e SESP0) (Tabela 4). Para a primeira mistura (SES1) de 10% de sésamo em massa de biscoito foram adicionados 30 g de sésamo a 270 g de massa, sendo estas envolvidas com a ajuda de uma espátula para garantir a homogeneidade das misturas. As restantes misturas foram formuladas através de uma diluição seriada em massa até à concentração de 0.000001% (0.1 mg/kg) de sésamo em massa, totalizando 13 misturas modelo. Adicionalmente, foram preparadas um conjunto de

misturas modelo (amostras cegas ou amostras de validação) com concentrações de 2,5% a 0,002% para validação do método quantitativo de PCR em tempo real.

Todas as misturas foram divididas em 2 porções, sendo uma porção imediatamente congelada a -20ºC (misturas modelo não processadas) e outra submetida a processamento por cozedura em forno (misturas modelo processadas) (Tabela 4). As misturas modelo processadas foram submetidas a uma temperatura de 180ºC (forno) durante 20 min para simular a preparação de biscoitos. Posteriormente, os biscoitos contendo diferentes quantidades de sésamo foram triturados em moinho de lâmina dupla (Grindomix GM200, Retsch, Haan, Alemanha) e condicionados a -20ºC (Tabela 4, Figura 1).



Figura 1 – Misturas modelo de sésamo em massa de biscoito processada (10% - 0,00001%, n = 13).

Tabela 4 – Proporções de sésamo e de massa de biscoito utilizadas na preparação das misturas modelo e amostras de validação (amostras cegas).

Misturas Modelo (não processada/processada)	Concentração de Sésamo branco	Composição
SES0/SESP0	0%	200 g massa
SES1/SESP1	10%	30 g sésamo + 270 g massa
SES2/SESP2	5%	100 g SESP1 + 100 g massa
SES3/SESP3	1%	50 g SESP2 + 200 g massa
SES4/SESP4	0,50%	100 g SESP3 + 100 g massa
SES5/SESP5	0,10%	50 g SESP4 + 200 g massa
SES6/SESP6	0,05%	100 g SESP5 + 100 g massa
SES7/SESP7	0,01%	50 g SESP6 + 200 g massa
SES8/SESP8	0,005%	100 g SESP7 + 100 g massa
SES9/SESP9	0,001%	50 g SESP8 + 200 g massa
SES10/SESP10	0,0005%	100 g SESP9 + 100 g massa
SES11/SESP11	0,0001%	50 g SESP10 + 200 g massa
SES12/SESP12	0,00005%	100 g SESP11 + 100 g massa
SES13/SESP13	0,00001%	30 g SESP12 + 120 g massa
AN 170	100%	200 g sésamo
Amostras de Validação		
SES14/SESP14	2,5%	7,5 g SESP13 + 292 g massa
SES15/SESP15	1,5%	120 g SESP14 + 80 g massa
SES16/SESP16	0,8%	106,7 g SESP15 + 93,3 g massa
SES17/SESP17	0,2%	50 g SESP16 + 150 g massa
SES18/SESP18	0,08%	80 g SESP17 + 120 g massa
SES19/SESP19	0,002%	50 g SESP18 + 150 g massa

3.2 Espécies utilizadas para a avaliação de reatividade cruzada

Neste trabalho foram desenhados *primers* novos com base nas diferentes sequências disponíveis no NCBI para a deteção específica de sésamo. Para a validar a especificidade dos *primers* foi utilizado o DNA de diversas espécies de plantas e animais. Este teste serviu para verificar experimentalmente a existência de potenciais reatividades cruzadas entre os *primers* desenhados e outras espécies não alvo (Tabela 5).

Tabela 5 – Espécies utilizadas para testar eventuais reatividades cruzadas com os *primers* desenhados (*n*= 60 espécies de plantas e animais).

Código	Descrição	Código	Descrição
AN132	Mandioca	CAL02	Javali
EM73	Laranja	CAL03	Pato
AN42	Nectarina	CAL04	Perdiz
AN43	Pêssego	CAL06	Lebre
AN118	Noz do Brasil	CAL07	Codorniz
AN119	Noz Pecan	CAL25	Faisão
PC100	Caju	CAL29	Veado
AN03	Macadâmia	CAL31	Coelho
AN40	Pinhão	CAL34	Galinha
AN76	Amêndoa	CAL35	Perú
AN147	Pistácio	CAL37	Borrego
AN37	Amendoim	CAL38	Cabrito
AN99	Avelã	CAL39	Avestruz
AN38	Favas	PVP0	Vaca
AN98	Tomate	CV18	Cavalo
AN62	Aveia	CW0	Porco
AN61	Cevada	F16	Pescada
AN60	Centeio	F28	Robalo
AN56	Girassol	F30	Carapau
AN55	Colza	F31	Abrótea
AN49	Abóbora	F32	Red fish
AN46A	Arroz	F33	Maruca
AN44	Trigo	F34	Cavala
WSI0	Soja	F35	Bacalhau
PHPO	Massa	TR34	Tremoço – *Lupinus angustifolius*
WFO	Batata	TR36	Tremoço – *Lupinus luteus*
DAS 1%	Milho	TR39	Tremoço – *Lupinus angustifolius*
AN174	Chia	AN175	Mostarda Oriental
EM230	Trigo sarraceno	AN176	Linhaça
AN177	Mostarda preta	AN47A	Cereja

3.3 Métodos de extração de DNA

Para a extração de DNA das misturas modelo, espécies de plantas utilizadas para os testes de reatividade cruzada e amostras de sésamo branco e sésamo preto foram utilizados dos kits comerciais, nomeadamente o Nucleospin® Food kit e o Nucleospin® Plant

II kit, ambos da Macherey-Nagel (Düren, Alemanha), seguindo os protocolos recomendados pelo fabricante com pequenas alterações. O Nucleospin® Food kit foi utilizado na maior parte das extrações de DNA, no entanto para alguns casos particulares, nomeadamente algumas espécies de plantas foi utilizado o Nucleospin® Plant II kit.

3.3.1 Nucleospin® Food kit

Foram pesados cerca de 200 mg de cada mistura modelo para tubos de reação estéreis de 2,0 mL. Foram adicionados 700 µL de solução de lise CF pré-aquecida a 65ºC e 10 µL (10 mg/mL) de proteinase K com o intuito de promover a lise celular e destruir as proteínas existentes. Posteriormente, cada tubo foi agitado vigorosamente em vórtex e incubado durante 60 min num termobloco (Eppendorf Thermomixer Comfort, Hamburg, Alemanha) a 65ºC com agitação a 950 rpm. Durante o período de incubação, cada tubo foi agitado no vórtex a cada 15 min, de forma a otimizar o rendimento da extração. No final da incubação, foram adicionados 2 µL de RNase (2 mg/mL) a cada tubo e deixou-se a incubar à temperatura ambiente durante 5 min. Esta etapa tem o objetivo de eliminar potenciais moléculas de RNA presentes nas amostras. Seguidamente, os tubos foram centrifugados a 17.000*xg* durante 10 min a 4ºC, transferindo-se cerca de 550-600 µL de sobrenadante para novos tubos de reação estéreis de 1,5 mL. Procedeu-se a uma nova centrifugação durante 5 min nas mesmas condições.

Transferiu-se novamente o sobrenadante (aproximadamente 500 µL) para um novo de tubo de reação estéril de 2 mL, ao qual se adicionou 500 µL de solução C4 e 500 µL de etanol 100%. Este passo é importante para ajustar as condições de ligação do DNA à coluna. Todo o volume é carregado numa coluna de sílica, procedendo-se à sua centrifugação durante 1 min a 11.000*xg* descartando o sobrenadante. Atendendo a que cada coluna tem a capacidade máxima de 750 µL, são necessárias 2-3 carregamentos para fazer passar todo o volume na coluna seguido de centrifugações, de forma a concentrar todo o DNA na coluna de sílica. Cada coluna foi lavada uma vez com 400 µL de CQW, seguida de duas lavagens com C5 (700 µL e 200 µL), intercalando com duas centrifugações a 11.000*xg* de 1 min, e uma terceira centrifugação durante 2 min para que a coluna ficasse bem seca. Por fim, as colunas foram transferidas para novos tubos de reação estéreis de 1,5 mL e às quais foram adicionados 100 µL de solução de eluição pré-aquecida a uma temperatura de 70ºC. Após incubação à temperatura ambiente durante 5 min, os tubos foram novamente centrifugados a 11.000*xg* (1 min) para eluir o DNA retido na coluna. Após término da extração, os extratos foram armazenados a -20ºC até serem utilizados.

3.3.2 Nucleospin® Plant II kit

Cerca de 200 mg de cada espécie plantas e as amostras de referência (sésamo branco/ sésamo preto) foram pesados para tubos de reação estéreis de 2,0 mL. Foram adicionados 600 µL de tampão de lise PL2 (pré-aquecido a 65ºC) às amostras, agitando-se os tubos vigorosamente em vórtex para homogeneizar as misturas. Procedeu-se à incubação no termobloco (Eppendorf Thermomixer Comfort, Hamburg, Alemanha) a 65ºC com agitação a 950 rpm durante 1 h, e a cada 15 min, as amostras eram agitadas vigorosamente no vórtex para uma melhor dispersão da amostra na solução de lise. Adicionaram-se 2 µL de RNase (2 mg/mL) a cada tubo, deixando os tubos a incubar à temperatura ambiente durante 5 min. Após a adição de 75 µL de solução PL3, os tubos foram vigorosamente agitados e incubados a uma temperatura de -20ºC durante 5 min (este passo serviu para precipitar o SDS). Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 17.000*xg* (4ºC durante 15 min). Cerca de 500 µL de sobrenadante foram transferidos para as colunas de filtração (cor violeta) e centrifugados durante 2 min a 11.000*xg.* Os filtrados foram coletados para novos tubos de reação estéreis de 2 mL, aos quais foram adicionados 450 µL de tampão PC. A homogeneização das amostras foi feita por mistura cuidadosa dos componentes (inversão dos tubos de reação), de forma a promover a ligação do DNA e posterior ligação às colunas de sílica (cor verde). Considerando que a capacidade máxima das colunas de sílica é 750 µL, todo o volume de sobrenadante deve ser carregado (2-3 vezes) e centrifugado a 11.000*xg* durante 1 min, descartando-se o sobrenadante entre centrifugações. Para purificar o DNA, procedeu-se a lavagem da coluna com 400 µL a solução PW1, com 700 e 200 µL de solução PW2, sendo cada lavagem seguida de centrifugação a 11.000*xg* durante 1 min ou 2 min no caso da lavagem final. Por fim, colocaram-se as colunas em novos tubos de reação esterilizados com capacidade de 1,5 mL e adicionou-se 50 µL de tampão PE pré-aquecido a uma temperatura de 65ºC. Foram incubados durante 5 min a 65ºC e centrifugados a 11.000*xg* durante 1 min. A eluição do DNA da coluna foi repetida para obter um volume de extrato de DNA de 100 µL, procedendo-se ao armazenamento a -20ºC para posterior análise dos extratos.

3.4 Quantificação e avaliação da pureza de DNA

A pureza e o rendimento dos extratos de DNA são 2 fatores que influenciam o desenvolvimento e aplicação das metodologias subsequentes, tais como a PCR qualitativa e a PCR em tempo real. pelo que a sua avaliação é de crucial importância. Os extratos foram analisados por espectrofotometria de UV/VIS em leitor de microplacas (*Synergy™ HT* - Biotek Instruments, Winooski, EUA) com recurso a uma placa específica para a leitura

direta das absorvências de DNA/RNA/proteínas (Take3, Biotek Instruments, Winooski, EUA), a 260 nm, 280 nm e 320 nm, sendo cada um destes comprimentos de onda específico para DNA, proteínas e impurezas presentes em solução, respetivamente.

O rácio entre as absorvências obtidas a 260 nm e 280 nm (A260/A280) permite estimar a pureza dos extratos de DNA que, em condições ideais devem estar dentro do intervalo 1,8 a 2,0. No entanto, purezas entre 1,6 a 2,2 podem ser consideradas adequadas para análise. Valores acima dos intervalos descritos podem indicar a presença de RNA, ou valores abaixo de 1,8 podem indicar a presença de proteínas, compostos fenólicos ou outros contaminantes que absorvem perto dos 280 nm. Na determinação da concentração, assume-se que 1 unidade de absorvência corresponde a 50 ng/mL num percurso ótico de 1 cm. O uso do *software* de análise de dados Gen5 v2.01 (Biotek Instruments, Winooski, EUA) permite a obtenção dos valores de concentração e pureza para cada extrato de DNA. Por fim, procedeu-se à diluição dos extratos para uma concentração apropriada para análise por PCR.

3.5 Desenvolvimento da PCR qualitativa

3.5.1 Desenho de primers específicos e análise in silico

Foram utilizadas diferentes ferramentas bioinformáticas para o desenho de *primers* específicos com alvo em diversas regiões genómicas do sésamo, contemplando genes unicópia e genes multicópia. Escolheram-se 2 genes nucleares unicópia; os quais codificam as proteínas alergénicas albumina 2S (Ses i 2) e vicilina (Ses i 7) que são proteínas de reserva presentes em sésamo (*Sesamum indicum*). Foram também escolhidos 2 genes multicópia, nomeadamente o gene mitocondrial que codifica para o citocromo oxidase subunidade c e o gene cloroplastidial que codifica a proteína peroxirredoxina 2E-1. As sequências nucleotídicas destes genes foram retirados do NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) com as devidas referências (Tabela 6). Os *primers* específicos para a identificação de sésamo foram desenhados com recurso ao *software* Primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) com alterações manuais. Os critérios utilizados para a seleção dos *primers* foram o conteúdo elevado entre guanina e citosina (GC), a definição de temperatura ótima de hibridização (60-65ºC) e o comprimento do fragmento a amplificar (100-200 bp).

Posteriormente, foram verificadas as propriedades de hibridização entre os pares de *primers* e a possibilidade de auto-emparelhamento ou formação de estruturas *hairpins* através do programa OligoCalc (http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html). Por fim, validou-se a especificidade dos *primers* através da ferramenta Nucleotide BLAST

(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=%20blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) que compara todas as sequências existentes na base de dados do NCBI para avaliar possíveis homologias entre sequências de diferentes espécies.

Após desenho dos *primers*, estes foram enviados para a empresa Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Alemanha) para produção. A Tabela 6 contém as sequências dos *primers* e a sonda utilizadas neste trabalho.

Tabela 6 – *Primers* e sonda utilizados em PCR qualitativa e PCR em tempo real.

Gene	*Primers*	Sequência (3' →5')	Tamanho do fragmento (pb)	Referência/ NCBI
Ses i 2	Ses2F Ses2R	CCGCCCATAAGACGGTGGTG TCATCGACCGCATCCACTGC	126	AF091841.1
Ses i 7	Ses7F Ses7R	CGTAGTCCGAGGGAGGGGAA TGCCTGAATTGCCGAACCTTCT	135	AF240004.1
Citocromo oxidase subunidade c	SesCtc-F2 SesCtc-R2 SesCtc-P	ATCTCCATCCAGCGTTGCTGTT TTGGAAGCGTCAACCTCGGC FAM-TGAACAGTTTCTCCGCCGCCGCCC AA-BHQ1	129	XM_011075905.2
Citocromo oxidase subunidade c	SesCtc-F3 SesCtc-R3	ACCCTCAATAGATGCTCCTACC TTCCTTGCTATCTCCAGCAGCCA	139	XM_011075905.2
Peroxirredoxina 2E-1 cloroplastídico	SesPox-F1 SesPox-R1	GAGGCATCTGGTTGTTTGATTG CAGTGATCACATCCAGTTCCCA	129	XM_011103183.2
18S ribossomal RNA	18SRG-F 18SRG-R	CTGCCCTATCAACTTTCGATGGTA TTGGATGTGGTAGCCGTTTCTCA	113	(Costa et al., 2013)
Sequenciação				
Citocromo oxidase subunidade c	SesCtc-F1 SesCtc-R2	TGGGCCTGGAACTGCTTATC TTGGAAGCGTCAACCTCGGC	150	XM_011075905.2

3.5.2 PCR Qualitativa

Numa primeira fase, as reações para cada par de *primers* foram otimizadas através da PCR qualitativa. Para tal foi necessário proceder a uma mistura reacional utilizando diferentes reagentes: água para PCR (livre de RNases e DNases), dNTP (Genaxxon Bioscience, Ulm, Alemanha), tampão (67 mM Tris-HCl, pH 8.8, 16 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0,01% Tween 20), enzima Taq polimerase (SuperHot Taq DNA Polymerase™, Genaxxon Bioscience, Ulm, Alemanha), *primers* (Tabela 6), Mg^{2+} e extrato de DNA para um volume de reação final de 25 µL.

Os volumes utilizados para cada reação estão descritos na Tabela 7. Para cada reação foram otimizadas as temperaturas de amplificação para obter resultados com elevada sensibilidade e sem comprometer a especificidade (Tabela 8). As reações de PCR foram realizadas em dois termocicladores (MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) e *SimpliAmp™ Thermal Cycler* (Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific, EUA). Para cada reação foi incluído um controlo negativo (CN), constituído por água de PCR (em vez do DNA alvo) e mistura reacional de forma a controlar quaisquer possíveis contaminações ocorridas durante a PCR.

Tabela 7 – Quantidade de reagentes otimizadas para cada par de *primers* no desenvolvimento da técnica de PCR qualitativa.

Reagentes \ *Primers*	18SRG-F/R	SesCtc-F3/R3	SesPOX1-F1/R1	Ses2-F/R	Ses7-F/R	Ses Ctc-F2/R2
Água de PCR	15,6 µL	14,3 µL	14,3 µL	14,3 µL	14,3 µL	14,3 µL
Tampão (10x)	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL
$MgCl_2$ (25mM)	1,5 µL	3,0 µL	3,0 µL	3,0 µL	3,0 µL	3,0 µL
dNTP (10 mM)	2,0 µL	2,0 µL	2,0 µL	2,0 µL	2,0 µL	2,0 µL
Primer Forward (10 µM)	0,6 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL
Primer Reverse (10 µM)	0,6 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL
Taq Polimerase (5 U/µL)	0,2 µL	0,2 µL	0,2 µL	0,2 µL	0,2 µL	0,2 µL
Extrato de ADN	2,0 µL	2,0 µL	2,0 µL	2,0 µL	2,0 µL	2,0 µL
Volume Total	25 µL					

Tabela 8 – Condições de tempo/temperatura otimizadas para a PCR qualitativa dos diferentes pares de *primers.*

Etapas \ Primers		18 SRG-F/R		SesCtc-F3/R3		SesPOX1 F1/R1		Ses2F/R		Ses7F/R		SesCtcF2/R2	
Desnaturação		95ºC	5 min	95ºC	5 min	95ºC	5 min	95ºC	5 min	95ºC	5 min	95ºC	5 min
Amplificação	Desnaturação	95ºC	30 s	95ºC	30 s	95ºC	30 s	95ºC	30 s	95ºC	30 s	95ºC	30 s
	Hibridização	65ºC	30 s	60ºC	30 s	62ºC	30 s	61ºC	30 s	61ºC	30 s	62ºC	30 s
	Extensão	72ºC	30 s	72ºC	30 s	72ºC	30s	72ºC	30 s	72ºC	30 s	72ºC	30 s
Nº de ciclos		33		40		40		40		40		40	
Extensão final		72ºC	5 min	72ºC	5 min	72ºC	5 min	72ºC	5 min	72ºC	5 min	72ºC	5 min

Após as reações de PCR, os produtos de amplificação foram corridos em gel de agarose 2% corado com 1x GelRed (Biotium, Ludwigsafen, Alemanha) em tampão SGTB 1x (GRiSP Research Solutions, Porto, Portugal), sendo adicionados 4 µL de corante de carregamento a 20 µL de produto de PCR. Os géis de agarose foram submetidos a eletroforese durante 25 min a 200 V. Para visualizar os fragmentos alvo utilizou-se um sistema fotográfico Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) e a análise da imagem feita através do *software* Image Lab™ versão 5.1 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

3.6 Sequenciação

Para desenvolver um sistema de PCR em tempo real foi necessário proceder à sequenciação das amostras de sésamo branco e sésamo preto para confirmar a identidade da sequência alvo. Após confirmação do produto de PCR, procedeu-se ao desenho de uma sonda para aumentar a especificidade do método. A sequenciação foi feita com recurso ao par de *primers* SesCtc-F1/R2 (Tabela 6). Após otimização da reação de PCR, procedeu-se à amplificação do fragmento alvo e posteriormente purificou-se recorrendo a um *kit*

comercial *GRS PCR & Gel Band Purification* (GRiSP Research Solutions, Porto, Portugal) seguindo as indicações do fabricante. A sequenciação foi feita pela empresa Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Alemanha). Os electroferogramas da sequenciação foram avaliados com o software FinchTv (Geospiza, Seattle, WA, EUA) e alinhados com a ferramenta de bioinformática BioEdit (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, EUA, https://bioedit.software.informer.com/7.2/).

3.7 PCR em tempo real

3.7.1 PCR em tempo real com corante Evagreen

Neste trabalho foram desenvolvidos dois sistemas de PCR em tempo real sendo o primeiro com recurso ao corante universal *EvaGreen*. Nas reações de PCR em tempo real com *EvaGreen* utilizaram-se uma mistura reacional com o volume final de 20 µL contendo 6.8 µL de água de PCR, 10 µL de 1x corante Sso Fast *Evagreen*® supermix (Biorad Laboratories, Hercules, CA, EUA) e 0,6 µL de cada um dos *primers* SesCtc-F2/R2 (Tabela 6) e 2 µL de extrato de DNA. Foi incluído um controlo negativo, para confirmar a ausência de contaminações durante a preparação do ensaio. O programa de temperaturas utilizado está representado na Tabela 9.

Tabela 9 –Condições de temperaturas utilizadas nas amplificações por PCR em tempo real com *EvaGreen* e com sonda.

PCR em tempo real	**EvaGreen**		**Sonda**	
Etapa	**Temperatura**	**Tempo**	**Temperatura**	**Tempo**
Desnaturação	95ºC	5 min	95ºC	5 min
Desnaturação	95ºC	10 s	95ºC	10 s
Hibridação	62ºC	20 s	65ºC	40 s
Extensão	72ºC	20 s		
Nº de ciclos	50		50	
Curva de *melting*	95ºC	1 min	Não aplicável	
	65ºC	3 min		
	65-95ºC	0,2ºC/10 s		

3.7.2 PCR em tempo real com sonda de hidrólise (TaqMan)

Nas reações de PCR em tempo real com sonda de hidrólise utilizaram-se uma mistura reacional com o volume final de 20 µL contendo 6.4 µL de água de PCR, 10 µL de 1x SsoFast™ Probes Supermix (BioRad Laboratories, Hercules, CA, EUA) e 0,6 µL de cada um dos *primers* SesCtc-F2/R2, 0,4 µL da sonda SesCtc-P (Tabela 6) e 2 µL de extrato de DNA. Em ambos os métodos, as reações correram num termociclador CFX96 Real-Time PCR System (BioRad Laboratories, Hercules, CA, EUA) com o programa de temperatura

descrito na Tabela 9. Para a deteção de sinal de fluorescência foi processado pelo software Bio-Rad CFX Manager 3.1 (BioRad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

4 Resultados e Discussão

4.1 Análise de pureza e quantificação de DNA

A otimização da técnica de PCR envolveu a formulação de misturas modelo de sésamo em massa de biscoito (não processado) e sésamo em biscoito (processado). Estas foram extraídas com o kit comercial *Nucleospin*® *Food* com a adição de RNase para aumentar a pureza dos extratos de DNA e cujos resultados estão apresentados na Tabela 10. As concentrações de DNA variaram entre 10,0 e 101,4 ng/µL para as misturas modelo de sésamo em massa de biscoito (não processados) e entre 9,0-81 ng/µL para as misturas modelo de sésamo em biscoito (processados). Todos os extratos apresentaram valores de pureza ótimos (1,8-2,0), à exceção das misturas 100% massa de biscoito e biscoito (SES0, SESP0, SESP3 e SESP6), cujas purezas foram 1,5; 1,7; 1,7 e 1,7; respetivamente. O extrato de sésamo branco (AN170) apresentou uma pureza de 2,0 e uma concentração de 119,6 ng/µL.

Tabela 10 – Pureza e concentração dos extratos de DNA das misturas modelo de sésamo em massa de biscoito não processado e processado, respetivamente.

Massa de biscoito não processado (% de sésamo)	Concentração (ng/µL)	Pureza (A260/A280)	Massa de biscoito processada (% de sésamo)	Concentração (ng/µL)	Pureza (A260/A280)
SES0 (0%)	10,0	1,5	**SESP0 (0%)**	9,0	1,7
SES1 (10%)	72,8	1,9	**SESP1 (10%)**	78,8	1,9
SES2 (5%)	73,5	1,9	**SESP2 (5%)**	81,2	1,9
SES3 (1%)	59,6	1,9	**SESP3 (1%)**	69,6	1,7
SES4 (0,5%)	46,0	1,8	**SESP4 (0,5%)**	31,6	1,9
SES5 (0,1%)	44,9	1,9	**SESP5 (0,1%)**	26,6	1,8
SES6 (0,05%)	84,3	1,9	**SESP6 (0,05%)**	22,1	1,7
SES7 (0,01%)	25,1	1,9	**SESP7 0,01%)**	56,2	1,9
SES8 (0,005%)	41,2	1,9	**SESP8 (0,005%)**	24,8	1,9
SES9 (0,001%)	21,8	1,9	**SESP9 (0,001%)**	24,4	1,9
SES10 (0,0005%)	44,0	1,9	**SESP10 (0,0005%)**	23,8	1,9
SES11 (0,0001%)	101,4	1,9	**SESP11 (0,0001%)**	25,8	1,8
SES12 (0,00005%)	37,5	1,9	**SESP12 (0,00005%)**	33,4	1,9
SES13 (0,00001)	25,9	2,0	**SESP13 (0,00001)**	27,1	2,0
AN170 (100%)	119,6	2,0	**-**	-	-

As amostras de validação ou amostras cegas apresentaram rendimentos semelhantes às das misturas modelo (18,0-109,4 ng/µL) (Tabela 11). As purezas foram também consideradas ótimas, variando entre os 1,8 e os 2,0, à exceção de alguns casos pontuais,

nomeadamente os extratos SESP16, SES16 e SES18 (1,5-1,6). Segundo Costa et al. (2017a), estas purezas podem ser justificadas devido a componentes do kit de extração que não foram devidamente removidos e quando analisados ocorre uma sobre estimativa nos valores de pureza.

Tabela 11 – Pureza e concentração dos extratos de DNA das amostras de validação de sésamo em massa de biscoito (não processado) e em biscoito (processado), respetivamente.

Massa de biscoito (% de sésamo)	Concentração (ng/ µL)	Pureza (A260/ A280)	Biscoito (% de sésamo)	Concentração (ng/ µL)	Pureza (A260/ A280)
SES14 (2,5%)	48,7	1,9	**SESP14 (2,5%)**	65,6	1,8
SES15 (1,5%)	56,1	1,9	**SESP15 (1,5%)**	78,4	1,8
SES16 (0,8%)	18,2	1,5	**SESP16 (0,8%)**	109,4	1,5
SES17 (0,2%)	39,2	1,9	**SESP17 (0,2%)**	38,0	1,9
SES18 (0,08%)	24,9	1,6	**SESP18 (0,08%)**	45,2	1,8
SES19 (0,002%)	36,8	1,8	**SESP19 (0,002%)**	37,8	1,8

Além do sésamo branco, das misturas modelo e das amostras de validação, o sésamo preto e algumas espécies de plantas e animais foram também extraídas com recurso ao kit de extração *Nucleospin*® Food e *Nucleospin*® Plant II. A Tabela 12 reúne as concentrações e purezas dos diferentes extratos, sendo que algumas destas espécies já tinham extratos disponíveis no laboratório.

Tabela 12 – Pureza e concentração dos extratos de DNA das espécies de plantas e animais usadas nos ensaios de reatividade cruzada.

Código	Espécies de plantas e animais	Concentração (ng/µL)	Pureza (A260/A280)
AN132	Mandioca	159,3	2,1
EM73	Laranja	181,2	2,2
AN42	Nectarina	6,0	1,6
AN43	Pêssego	7,4	1,8
AN118	Noz do Brasil	166,7	1,9
AN119	Noz Pecan	24,5	1,5
PC100	Caju	59,95	1,7
AN03	Macadâmia	149,4	1,9
AN40	Pinhão	212,0	1,7
AN76	Amêndoa	50,4	1,7
AN147	Pistachio	543,4	1,8
AN37	Amendoim	349,5	1,8
AN99	Avelã	111,2	2,0
AN38	Favas	1856,7	2,2
AN98	Tomate	105,6	2,0
AN62	Aveia	914,0	2,1
AN61	Cevada	888,0	2,1
AN60	Centeio	1523,1	2,2
AN56	Girassol	748,6	2,0
AN55	Colza	425,6	2,0
AN49	Abóbora	354,0	2,0

AN46A	Arroz	1608,4	2,2
AN44	Trigo	631,7	2,0
AN172	Mostarda Oriental	13,9	1,9
AN173	Mostarda Preta	47,1	2,2
AN174	Chia	100,4	2,1
AN175	Linhaça	9,0	2.1
EM210	Trigo sarraceno	81,0	2.1
AN170	Sésamo Branco	119,6	2,0
AN171	Sésamo Preto	30,4	2,1
WSI0	Soja	899,8	1,7
PHPO	Massa	756,5	2,0
WFO	Puré	94,5	2,1
DAS 1%	Milho	100,0	2,0
CAL02	Javali	516,9	1,9
CAL03	Pato	600,1	2,0
CAL04	Perdiz	592,2	1,9
CAL06	Lebre	476,6	2,0
CAL07	Codorniz	817,7	2,0
CAL25	Faisão	362,7	2,0
CAL29	Veado	342,5	1,9
CAL31	Coelho	573,0	2,0
CAL34	Galinha	505,2	2,1
CAL35	Perú	100,7	2,0
CAL37	Borrego	422,9	1,9
CAL38	Cabrito	609,0	2,0
CAL39	Avestruz	389,7	2,0
PVP0	Vaca	195,0	1,8
CV18	Cavalo	171,7	1,9
CW0	Porco	211,7	1,8
F16	Pescada	46,0	1,6
F28	Robalo	165,6	2,0
F30	Carapau	72,1	2,0
F31	Abrótea	45,1	2,0
F32	Red fish	32,7	1,9
F33	Maruca	9,3	1,9
F34	Cavala	91,8	2,0
TR34	Tremoço – *Lupinus angustifolius*	869,3	2,3
TR36	Tremoço – *Lupinus luteus*	584,4	2,3
TR39	Tremoço – *Lupinus angustifolius*	396,0	2,2

4.2 Otimização de PCR qualitativa para deteção de sésamo branco e preto

De forma a desenvolver um método de PCR qualitativa com elevada sensibilidade e especificidade foram testados os *primers* da Tabela 6 utilizando as condições de reação e os programas de temperatura descritos nas Tabela 7 e Tabela 8. Existem diferentes fatores que podem condicionar o desenvolvimento e otimização da PCR, pelo que é importante testar algumas condições, nomeadamente determinar a melhor temperatura de hibridação dos *primers* e o ajuste da concentração do cofator da enzima polimerase (concentração de Mg^{2+}). Desta forma, para a otimização das reações de PCR foram testadas diferentes

temperaturas de hibridação utilizando diluições seriadas (1/10) de sésamo branco e sésamo preto, no intervalo de 50-0.0005 ng/µL (*n*=6).

4.2.1 SesCtc-F3/R3

Para a otimização da PCR com os *primers* SesCtc-F3/R3 foram testadas três temperaturas de hibridação – a 60ºC, 62ºC e 64ºC, utilizando uma concentração de 3 mM de Mg^{2+} (Figura 2). A reação permitiu a obtenção de produto de amplificação ao tamanho esperado de 139 pares de bases (pb) para o sésamo branco até uma diluição de 0,005 ng/µL, independentemente da temperatura testada. No caso do sésamo preto parece haver produto até uma concentração de 0,005 ng/µL para a temperatura de hibridação de 60ºC. No entanto, à concentração de 50 ng/µL não há banda a nenhuma das temperaturas, pelo que parece haver potenciais efeitos de inibição (possíveis interferentes presentes no tegumento do sésamo preto ou possível excesso de material genético) à concentração de sésamo preto mais elevada.

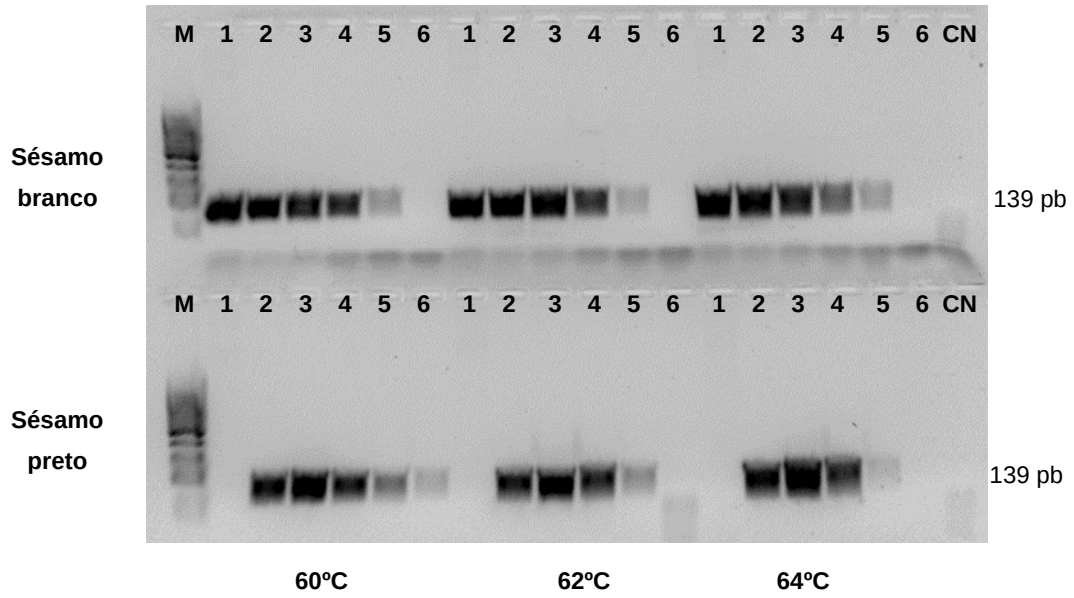


Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* SesCtc-F3/R3 e 3 mM de Mg^{2+} das diluições seriadas (1/10) do extrato de DNA de sésamo branco e sésamo preto a diferentes temperaturas: 60ºC, 62ºC e 64ºC. Legenda: M – Marcador molecular 100 bp (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1- 50 ng/µL; 2- 5 ng/µL; 3 – 0,5 ng/µL; 4- 0,05 ng/µL; 5- 0,005 ng/µL; 6- 0,0005 ng/µL; CN – controlo negativo.

4.2.2 SesPox-F1/R1

Para avaliação do par de *primers* SesPOX-F1/R1 manteve-se a concentração de 3 mM de Mg^{2+} e testaram-se as temperaturas de hibridação de 58ºC, 60ºC e 62ºC (Figura 3). A reação permitiu a amplificação de um produto de PCR com o tamanho esperado de 129

pb. Com este conjunto de *primers* (SesPOX-F1/R1) foi possível obter uma banda até à concentração de 0,0005 ng/µL para o sésamo branco para as 3 temperaturas testadas. No caso do sésamo preto, a sensibilidade foi semelhante à exceção da temperatura de 60ºC. A inibição da concentração mais elevada para o sésamo preto voltou a verificar-se, mas apenas a temperaturas de hibridação mais elevadas. Uma vez que para a especificidade dos *primers* é importante ter uma temperatura elevada, selecionou-se a temperatura de 62ºC.

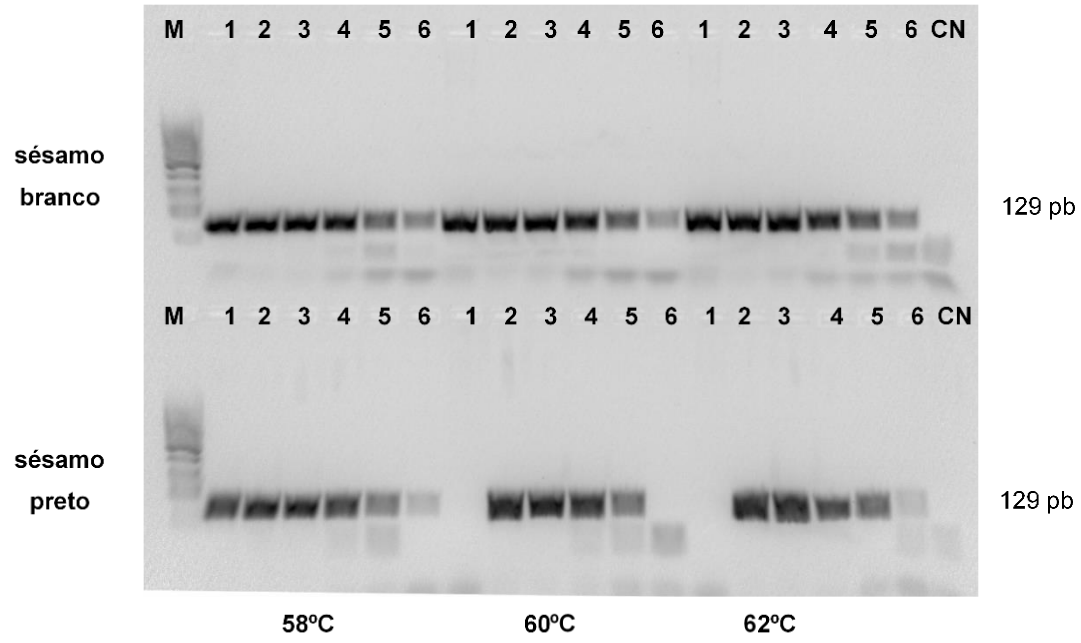


Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* SesPOX-F1/R1 e 3 mM de Mg^{2+} das diluições seriadas (1/10) do extrato de DNA de sésamo branco e sésamo preto a diferentes temperaturas: 58ºC, 60ºC e 62ºC. Legenda: M – Marcador molecular 100 bp (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1- 50 ng/µL; 2- 5 ng/µL; 3 – 0,5 ng/µL; 4- 0,05 ng/µL; 5- 0,005 ng/µL; 6- 0,0005 ng/µL; CN – controlo negativo.

4.2.3 Ses2-F/R

Para o par de *primers* Ses2-F/R foram utilizadas as mesmas condições de PCR, mas a temperaturas de hibridação diferentes: 61ºC, 63ºC e 65ºC (Figura 4). A reação permitiu a amplificação de um fragmento de 126 pb tanto para sésamo branco como para o sésamo preto. A sensibilidade melhor foi a demonstrada pelo sésamo branco a uma temperatura de 61ºC, com produto formado até uma concentração de 0,0005 ng/µL. Apesar de amplificar até uma concentração mais elevada (0.005 ng/µL) do que o sésamo branco, a amplificação do sésamo preto também gera mais produto a uma temperatura de hibridação de 61ºC, pelo que foi a temperatura selecionada para este conjunto de *primers*.

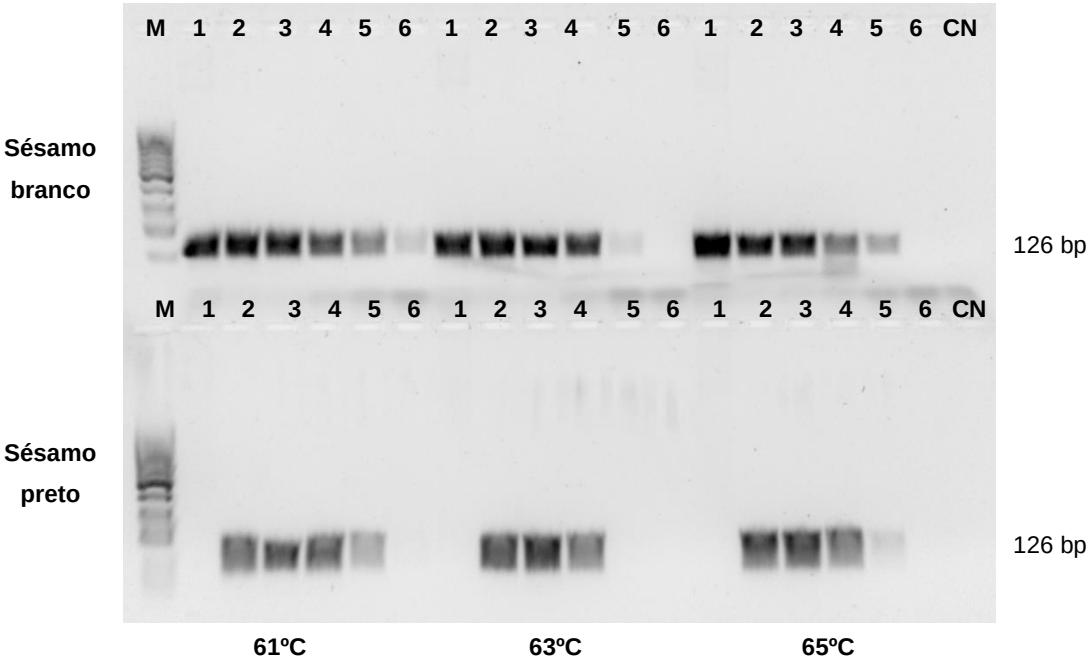


Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Ses2-F/R e 3 mM de Mg^{2+} das diluições seriadas (1/10) do extrato de DNA de sésamo branco e sésamo preto a diferentes temperaturas: 61ºC, 63ºC e 65ºC. Legenda: M – Marcador molecular 100 bp (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1- 50 ng/µL; 2- 5 ng/µL; 3 – 0,5 ng/µL; 4- 0,05 ng/µL; 5- 0,005 ng/µL; 6- 0,0005 ng/µL; CN – controlo negativo.

4.2.4 Ses7-F/R

Para o par de *primers* Ses7-F/R foram testadas as seguintes temperaturas de hibridação: 61º C, 63ºC e 65ºC (Figura 5), usando as condições descritas em (Tabela 7 e Tabela 8). O sésamo branco amplificou apenas até aos 0,5 ng µL e com o sésamo preto não foi possível obter resultados. Este conjunto de *primers* parece ter pouco especificidade para o gene que codifica o alergénio Ses i 7. Apesar de ter sido desenhado e experimentalmente testado, o uso destes *primers* não permite o desenvolvimento de um método com sensibilidade adequada. De qualquer forma, dado que há formação de produto de sésamo branco, a temperatura ótima de hibridização definida para estes *primers* foi de 61ºC.

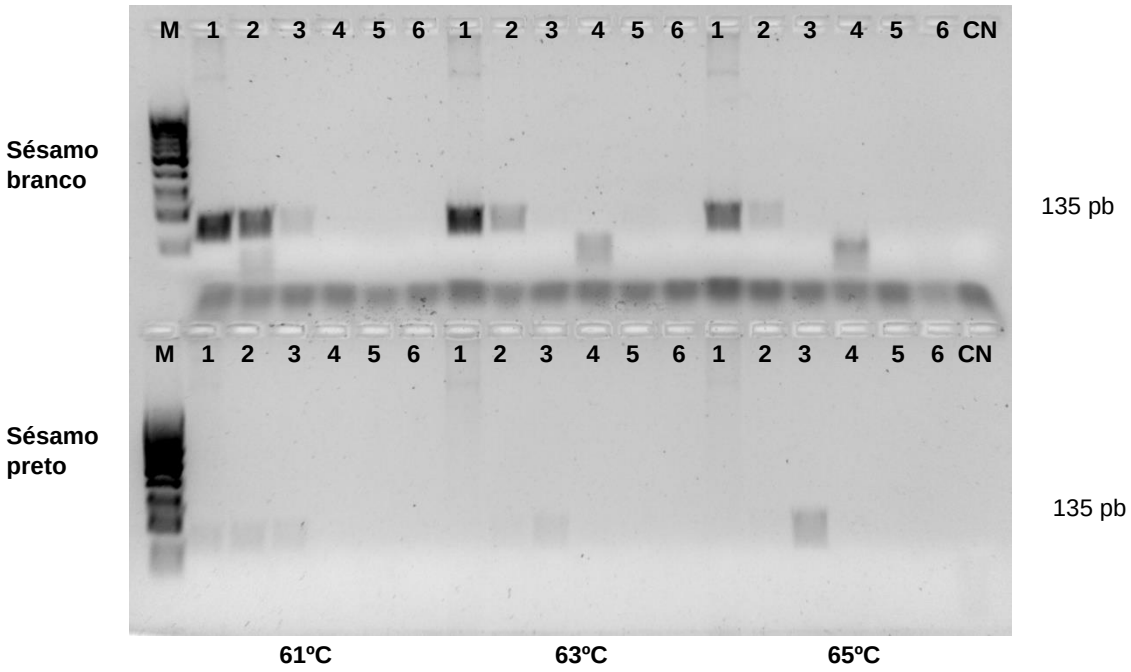


Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Ses7-F/R e 3 mM de Mg^{2+} das diluições seriadas (1/10) do extrato de DNA de sésamo branco e sésamo preto a diferentes temperaturas: 61ºC, 63ºC e 65ºC. Legenda: M – Marcador molecular 100 bp (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1- 50 ng/µL; 2- 5 ng/µL; 3- 0,5 ng/µL; 4- 0,05 ng/µL; 5- 0,005 ng/µL; 6- 0,0005 ng/µL; CN – controlo negativo.

4.2.5 SesCtc-F2/R2

Os *primers* SesCtc-F2/R2 foram testados para as temperaturas de hibridação de 59ºC, 61ºC e 63ºC, no entanto a reação apenas permitiu a amplificação de produtos de PCR com tamanho de 129 pb para a concentração mais elevada (50 ng/µL) do sésamo branco (Figura 6). Para o sésamo preto não houve formação de qualquer produto. Estes resultados não eram esperados, uma vez que os *primers* SesCtc-F3/R3 que estão desenhados na mesma região do gene apresentaram sensibilidades até 0.005 ng/µL. Desta forma, voltou-se a repetir a PCR testando apenas 2 temperaturas (60ºC e 62ºC) para confirmar os resultados anteriores (Figura 7). Neste segundo teste, a PCR parece ter decorrido de forma adequada, permitido a obtenção de fragmento de 129 pb em sésamo branco e preto até uma concentração de 0,0005 ng/µL, à temperatura de 62ºC.

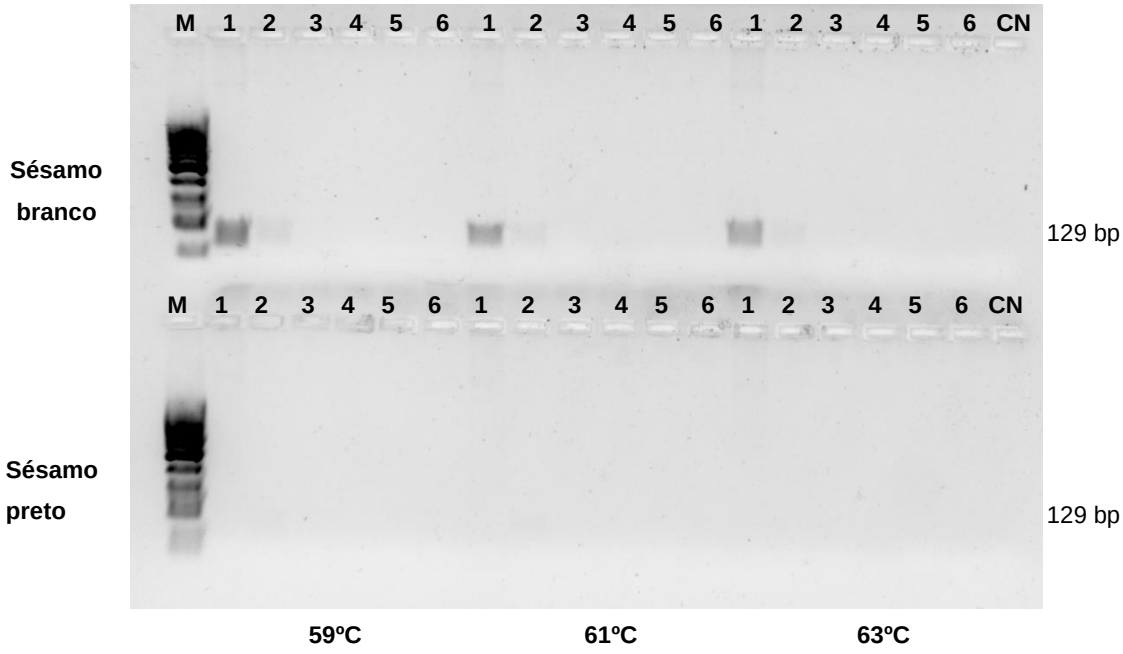


Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* SesCtc-F2/R2 e 3 mM de Mg^{2+} das diluições seriadas (1/10) do extrato de DNA de sésamo branco e sésamo preto a diferentes temperaturas: 59ºC, 61ºC e 63ºC. Legenda: M – Marcador molecular 100 bp (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1- 50 ng/µL; 2- 5 ng/µL; 3- 0,5 ng/µL; 4- 0,05 ng/µL; 5- 0,005 ng/µL; 6- 0,0005 ng/µL; CN – controlo negativo.

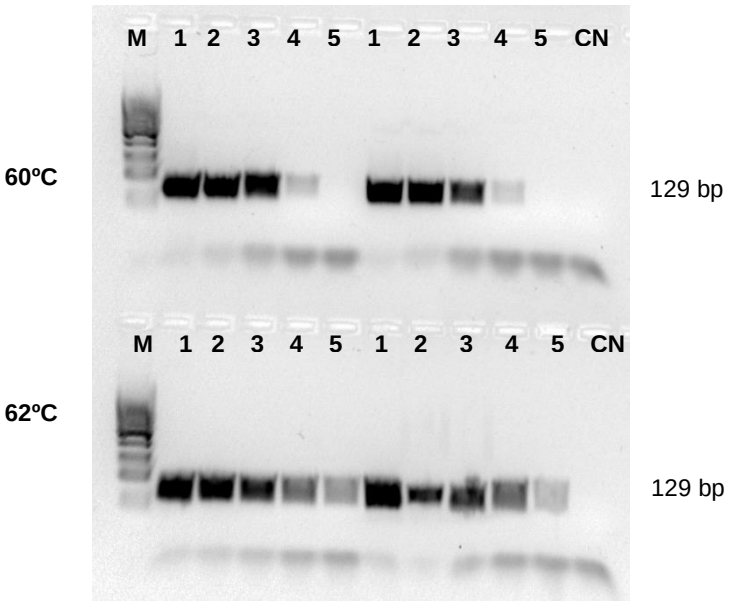


Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* SesCtc-F2/R2 e 3 mM de Mg^{2+} das diluições seriadas (1/10) do extrato de DNA de sésamo branco e sésamo preto a diferentes temperaturas: 60ºC e 62ºC. Legenda: M – Marcador molecular 100 bp (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1- 5 ng/µL; 2- 0,5 ng/µL; 3- 0,05 ng/µL; 4- 0,005 ng/µL; 5- 0,0005 ng/µL; CN – controlo negativo.

4.3 Verificação da amplificação dos extratos de DNA

Para proceder ao estudo da especificidade dos 5 pares de *primers* em estudo, foi necessário recorrer a uma PCR qualitativa com o conjunto de *primers* 18SRG-F/18SRG-R que amplificam uma região eucariota universal com alvo no gene 18S rRNA (Figura 8) (Costa et al.,2013).

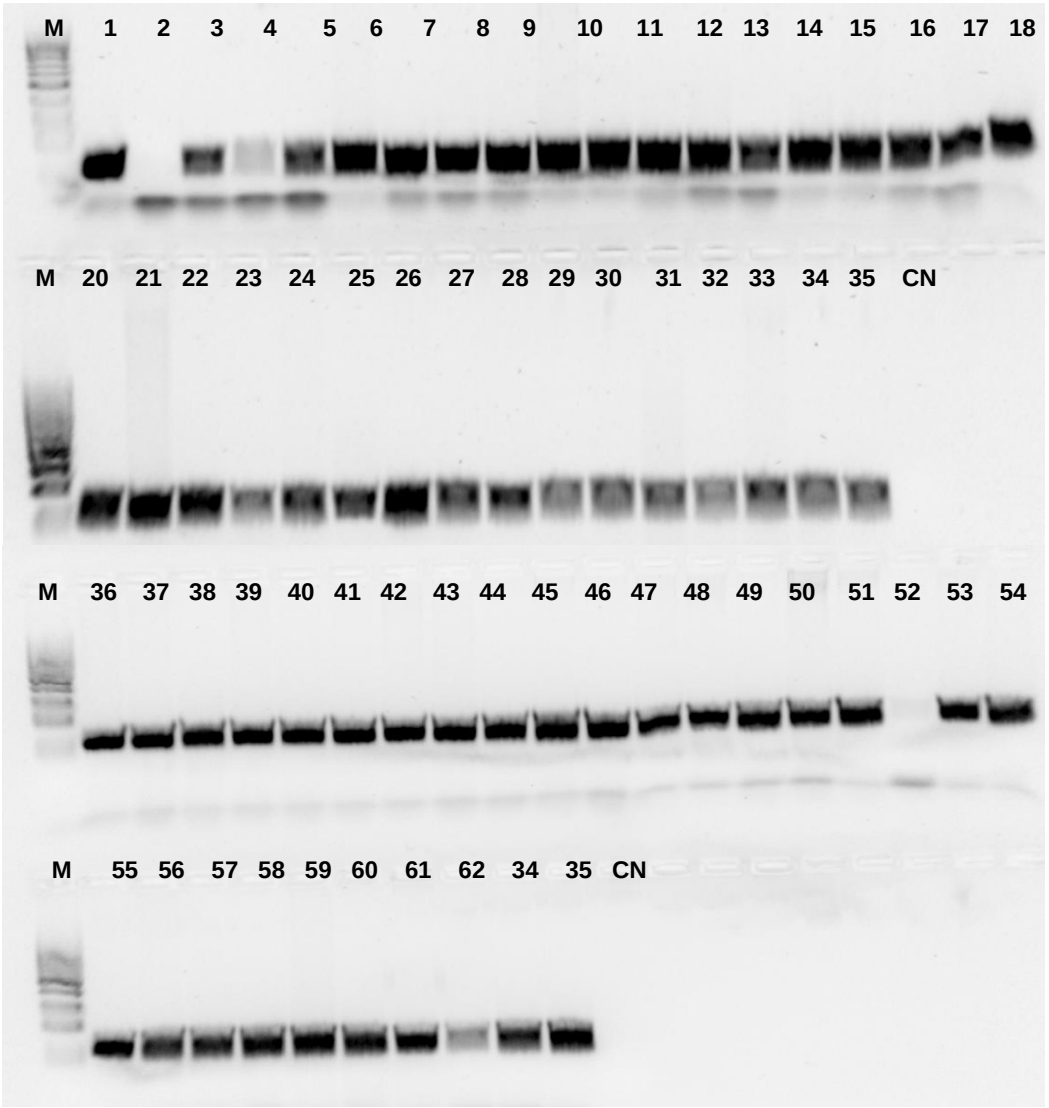


Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* 18SRG-F/R. Legenda: M- Marcador molecular 100 bp (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1- mandioca; 2- cereja ; 3- laranja ; 4- nectarina; 5- pêssego; 6- noz do brasil; 7- noz pecan; 8- caju ; 9- macadâmia; 10- pinhão ; 11- amêndoa ; 12- pistácio; 13- amendoim; 14- avelã; 15- favas; 16- tomate; 17- aveia; 18- cevada; 19- centeio; 20- girassol; 21- colza; 22- abóbora; 23- arroz; 24- trigo; 25- soja; 26- mostarda oriental; 27- mostarda preta; 28- chia; 29- linhaça; 30- trigo sarraceno; 31- massa; 32- batata; 33- milho; 34- sésamo branco; 35- sésamo preto; 36 - javali; 37- pato; 38- perdiz; 39- lebre; 40 -codorniz; 41- faisão; 42- veado; 43- coelho ; 44- galinha; 45- peru; 46- borrego ; 47- cabrito; 48- avestruz; 49- vaca; 50- cavalo; 51- porco; 52- bacalhau; 53- pescada; 54- robalo; 55- carapau; 56- abrótea; 57- red fish; 58- maruca; 59- cavala; 60- *L. albus*; 61- *L. luteus*; 62- *L. angustifolius*; CN- controlo negativo.

Esta reação teve como intuito verificar a capacidade de amplificação dos extratos de DNA de todas as espécies de plantas e animais a serem testadas, assim como evitar a possibilidade de falsos negativos durante a avaliação da reatividade cruzada com os *primers* específicos do sésamo. A amplificação teve como objetivo eliminar falsos negativos e verificar a capacidade de amplificação dos extratos de DNA. Kang, (2019) descreveu que produtos provenientes dos kits de extração assim como outros constituintes pertencentes à matriz alimentar podem interferir na reação de PCR inibindo a sua amplificação, pelo que é sempre necessário testar a capacidade de amplificação dos extratos de DNA. Na Figura 8 é possível verificar que para as amostras de cereja e de bacalhau não ocorreram amplificação dos extratos, o que confirma que estes dois extratos não têm DNA amplificável. Para resolver esta questão deveriam ter sido realizadas novas extrações destas 2 espécies, no entanto dado serem espécies como pouca possibilidade de serem reativas com o sésamo, estas não foram usadas nos testes de reatividade cruzada.

4.4 Avaliação de reatividade cruzada dos pares de *primers* em estudo

Após otimização das PCR com os 5 pares de *primers* foi necessário verificar se os *primers* desenhados eram específicos para a espécie sésamo, pelo que foram testados com diferentes espécies de plantas e animais. A Figura 9 representa um exemplo de eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR amplificados com os *primers* Ses-2F/R cujo alvo é um gene nuclear unicópia que codifica a proteína alergénica Ses i 2. Para além de amplificar as espécies alvo (sésamo branco e sésamo preto), estes *primers* também reconhecem regiões homólogas em outras espécies, nomeadamente na mostarda oriental; mostarda preta; chia; linhaça e trigo sarraceno. Estes resultados evidenciam que estes *primers* não são específicos para a espécie sésamo. A Figura 10 apresenta uma eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR amplificados com os *primers* SesCtc-F2/R2, cujo alvo é um gene mitocondrial multicópia que codifica para o citocromo oxidase c. Este conjunto de *primers* apenas amplificou os alvos sésamo branco e sésamo preto, pelo que são considerados específicos para amplificação da espécie sésamo. Os resultados de reatividade cruzada dos diferentes *primers* com as espécies de plantas e animais estão representados na Tabela 13. A amplificação das espécies anteriormente referidas como sendo homólogas ao sésamo apresentaram uma banda positiva (embora por vezes ténue) para os restantes pares de *primers*, nomeadamente SesCtc-F3-R3, Ses7-F/R e SesPOX-F1/R1. Algumas bandas ténues inespecíficas foram também verificadas com os *primers* Ses2-F/R para as espécies de avestruz, vaca e cavalo, mas que podem ter resultado de alguma contaminação cruzada durante a preparação da PCR.

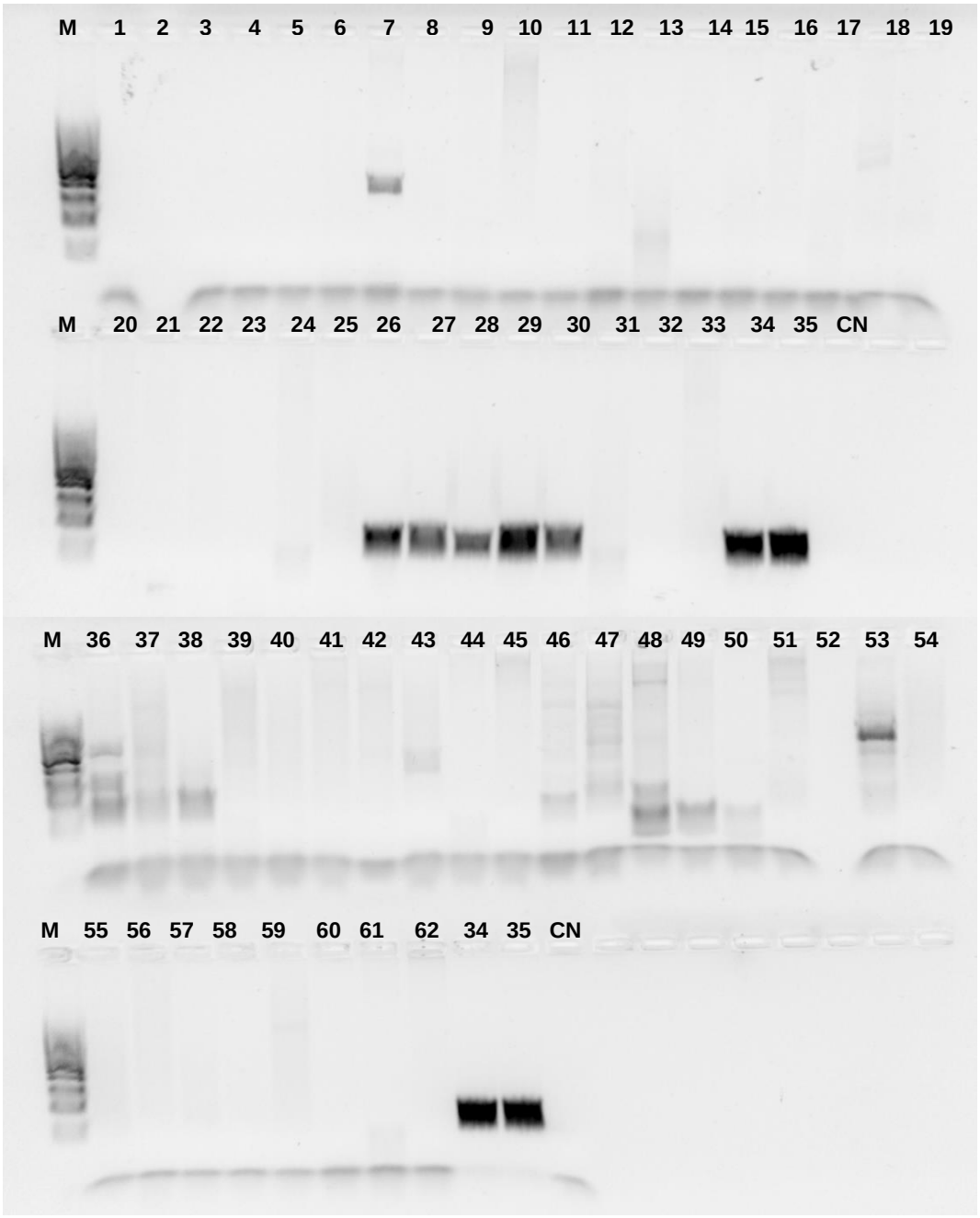


Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* SES2-F/R. Legenda: M- Marcador molecular 100 bp (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1- mandioca; 2- poço vazio; 3- laranja; 4- nectarina; 5 - pêssego; 6- noz do Brasil; 7- noz pecan; 8- caju ; 9- macadâmia; 10- pinhão ; 11- amêndoa ; 12- pistácio; 13- amendoim; 14- avelã; 15- favas; 16- tomate; 17- aveia; 18- cevada; 19- centeio; 20- girassol; 21- colza; 22- abóbora; 23- arroz; 24- trigo; 25- soja; 26- mostarda oriental; 27- mostarda preta; 28- chia; 29- linhaça; 30- trigo sarraceno; 31- massa; 32- batata; 33- milho; 34- sésamo branco; 35- sésamo preto; 36- javali; 37- pato; 38- perdiz; 39- lebre; 40- codorniz; 41- faisão; 42- veado; 43- coelho ; 44- galinha; 45- perú; 46- borrego; 47- cabrito; 48- avestruz; 49- vaca; 50- cavalo; 51- porco; 52- poço vazio; 53- pescada; 54- robalo; 55- carapau; 56- abrótea; 57- red fish; 58- maruca; 59- cavala; 60- *L. albus*; 61- *L. luteus*; 62- *L. angustifolius*; CN- controlo negativo.

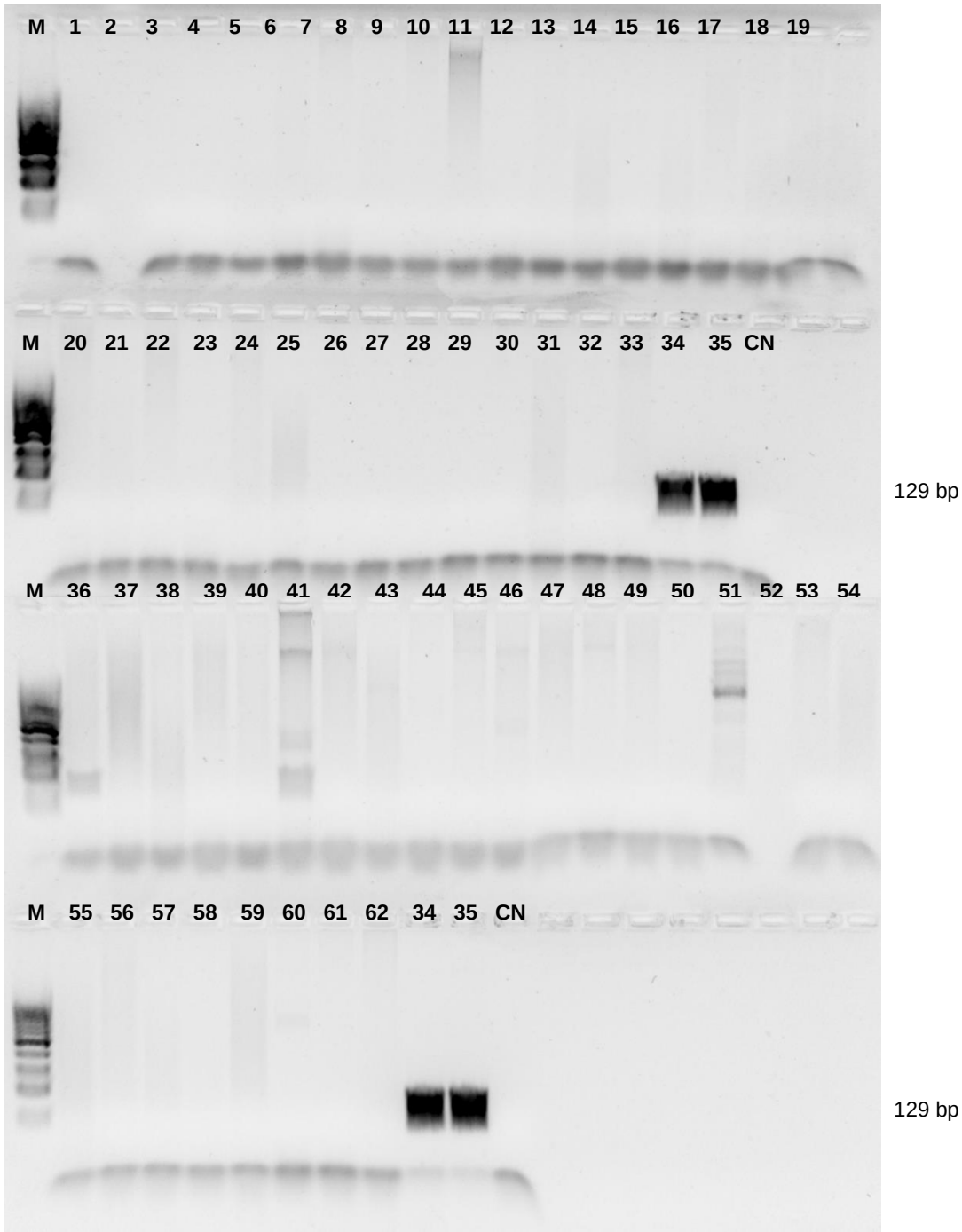


Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* SesCtc-F2/ R2. Legenda: M- Marcador molecular 100 bp (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1- Mandioca; 2- poço vazio; 3- laranja; 4- nectarina; 5- pêssego; 6- noz do Brasil; 7- noz pecan; 8- caju; 9- macadâmia; 10- pinhão; 11- amêndoa; 12- pistácio; 13- amendoim; 14- avelã; 15- favas; 16- tomate; 17- aveia; 18- cevada; 19- centeio; 20- girassol; 21- colza; 22- abóbora; 23- arroz; 24- trigo; 25- soja; 26- mostarda oriental; 27- mostarda preta; 28- chia; 29- linhaça; 30- trigo sarraceno; 31- massa; 32- batata; 33- milho; 34- sésamo branco; 35- sésamo preto; 36- javali; 37- pato; 38- perdiz; 39- lebre; 40- codorniz; 41- faisão; 42- veado; 43- coelho ; 44- galinha; 45- perú; 46- borrego; 47- cabrito; 48- avestruz; 49- vaca; 50- cavalo; 51- porco; 52- poço vazio; 53- pescada; 54- robalo; 55- carapau; 56- abrótea; 57- red fish; 58- maruca; 59- cavala; 60- *L. albus*; 61- *L. luteus*; 62- *L. angustifolius*; CN- controlo negativo.

Tabela 13 - Resumo dos testes de reatividade cruzada dos diferentes *primers*

Primers **Espécies**	**SesCtc-F2/R2**	**Ses7-F/R**	**Ses2-F/R**	**SesPox-F1/R1**	**SesCtc-F3/R3**
Sésamo branco	+	+	+	+	+
Sésamo preto	+	+	+	+	+
Mandioca	-	-	-	-	-
Laranja	-	-	-	-	-
Nectarina	-	-	-	-	-
Pêssego	-	-	-	-	-
Noz do Brasil	-	-	-	-	-
Noz Pecan	-	-	-	-	-
Caju	-	-	-	-	-
Macadâmia	-	-	-	-	-
Pinhão	-	-	-	-	-
Amêndoa	-	-	-	-	-
Pistachio	-	-	-	-	-
Amendoim	-	-	-	-	-
Avelã	-	-	-	-	-
Favas	-	-	-	-	-
Tomate	-	-	-	-	-
Aveia	-	-	-	-	-
Cevada	-	-	-	-	-
Centeio	-	-	-	-	-
Girassol	-	-	-	-	-
Colza	-	-	-	-	-
Abóbora	-	-	-	-	-
Arroz	-	-	-	-	-
Trigo	-	-	-	-	-
Soja	-	-	-	-	-
Mostarda oriental	-	+	+	+	+/-
Mostarda Preta	-	+	+/-	-	+/-
Chia	-	-	+/-	+/-	+/-
Linhaça	-	+	+	+	+/-
Trigo sarraceno	-	+/-	+/-	+	-
Massa	-	-	-	-	-
Puré de Batata	-	-	-	-	-
Milho	-	-	-	-	-
Javali	-	-	-	-	-
Pato	-	-	-	-	-
Perdiz	-	-	-	-	-
Lebre	-	-	-	-	-
Codorniz	-	-	-	-	-
Faisão	-	-	-	-	-
Veado	-	-	-	-	-
Coelho	-	-	-	-	-
Galinha	-	-	-	-	-
Perú	-	-	-	-	-
Borrego	-	-	-	-	-
Cabrito	-	-	-	-	-
Avestruz	-	-	+/-	-	-
Vaca	-	-	+/-	-	-
Cavalo	-	-	+/-	-	-
Porco	-	-	-	-	-
Pescada	-	-	-	-	-
Robalo	-	-	-	-	-
Carapau	-	-	-	-	-
Abrótea	-	-	-	-	-
Red fish	-	-	-	-	-
Maruca Cavala	-	-	-	-	-
L. albus	-	-	-	-	-
L. luteus	-	-	-	-	-
L. angustifolius	-	-	-	-	-

Nota: +, amplificação positiva, - sem amplificação, +/-, banda ténue.

Desta forma, o conjunto de *primers* SesCtc-F2/R2 foi escolhido para prosseguir com o desenvolvimento da PCR qualitativa com as misturas modelo de sésamo em massa de biscoitos (não processados) e em biscoitos (processados). Foram também selecionados para o desenvolvimento de um método de quantificação para o sésamo baseado em PCR em tempo real.

4.5 Deteção absoluta e relativa do sésamo por PCR qualitativa

Através de uma diluição seriada com concentração inicial de 5 ng/µL, determinou-se que o limite de deteção absoluto para o sésamo branco e o sésamo preto foi de 0,005 ng/µL, o que corresponde 10 pg de DNA de sésamo (Figura 11). Considerando que uma cópia de DNA de sésamo corresponde a 0.97 pg, o LOD absoluto permite a detetar até 10 cópias de DNA de sésamo (https://cvalues.science.kew.org/search).

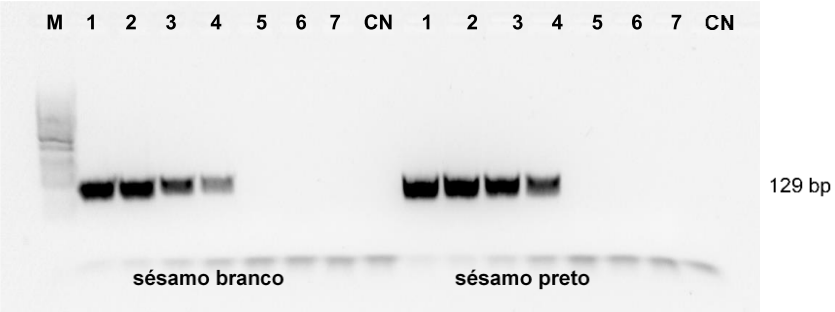


Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* SesCtc-F2/R2. Legenda: M- Marcador molecular 100 bp (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1- 5 ng/µL; 2- 0,5 ng/µL; 3- 0,05 ng/µL; 4- 0,005 ng/µL; 5- 0,0005 ng/µL; 6- 0,00005 ng/µL; 7- 0,000005 ng/µL; CN- controlo negativo.

Para determinar o LOD relativo foram utilizadas as misturas modelo de sésamo em massa de biscoito e em biscoito. Por PCR qualitativa foi possível detetar 50 mg/kg de sésamo em massa de biscoito assim como em massa de biscoito processado (Figura 12).

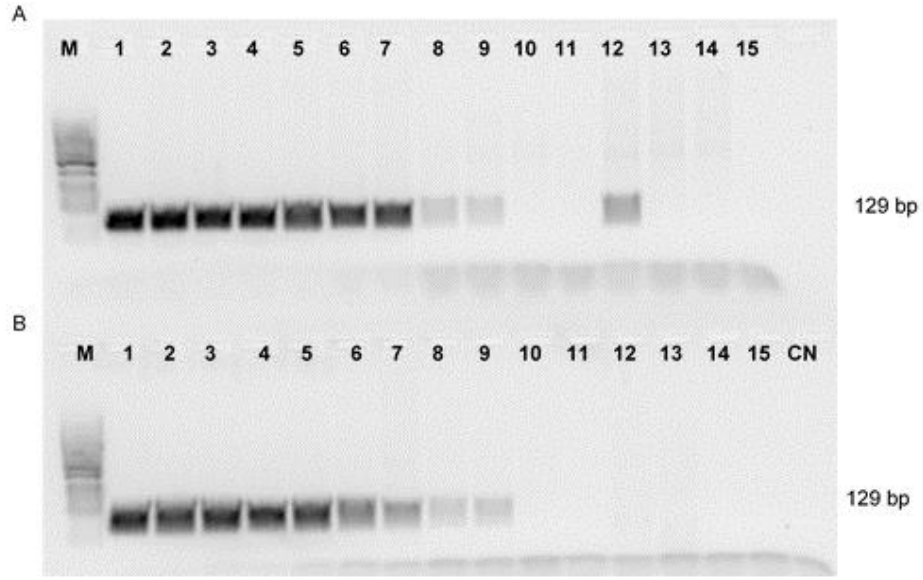


Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* SesCtc-F2/R2 em misturas modelo de sésamo em massa de biscoito (A) e biscoito (B). Legenda: M- Marcador molecular 100 bp (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1- 100%; 2- 10%; 3- 5%; 4- 1%; 5- 0,5%; 6- 0,1%; 7- 0,05%; 8- 0,01%; 9- 0,005%; 10- 0,001%, 11-0,0005%; 12- 0,0001%; 13- 0,00005%, 14- 0,00001%; 15- 0% de sésamo em matriz; CN- controlo negativo.

4.6 Resultados sequenciação

A PCR com o par de *primers* SesCtc-F2/R2 foi o que apresentou melhores resultados de especificidade e sensibilidade. Desta forma, foi necessário confirmar a identidade dos produtos de PCR por sequenciação. Com os dados de sequenciação foi possível desenhar uma sonda de hidrólise para ser posteriormente usada no desenvolvimento de um método quantitativo de PCR em tempo real (Figura 13).

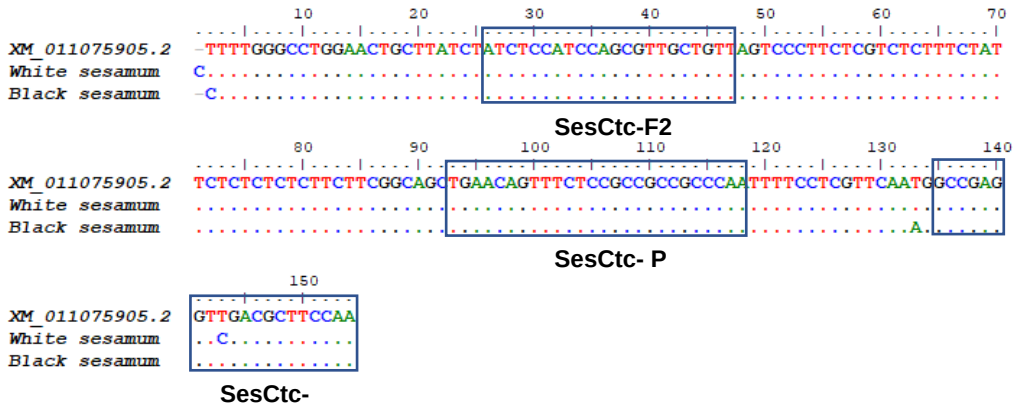


Figura 13 - Alinhamento do produto de sequenciação do sésamo branco e do sésamo preto com a sequência consensos retirados do NCBI (número de acesso XM011075905.2). Na figura estão representadas as zonas de emparelhamento dos *primers* e da sonda.

4.7 PCR em tempo real

Este trabalho teve como objetivo desenvolver métodos de PCR para identificar o sésamo como alimento alergénico e quantificá-lo em matrizes processadas. Assim, procedeu-se ao desenvolvimento e otimização da PCR em tempo real. A primeira abordagem foi com recurso a um corante de fluorescência universal, o *EvaGreen*. Na utilização deste método, foi necessário recorrer posteriormente a uma análise das curvas de *melting* para avaliar a especificidade dos fragmentos produzidos. Para analisar os resultados, recorremos aos critérios de validação definidos e adaptados de duas entidades: MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (Bustin et al.,2010) e da *European Network of GMO Laboratories* (ENGL 2015). Ambos definem diversos parâmetros da reação, nomeadamente o coeficiente de correlação (R^2) igual ou superior a 0,98%, um declive de -3,6 e -3,1 e uma eficiência da PCR entre os 90% e 110%. A eficiência da PCR calcula-se pela seguinte equação:

$$E\ (\%) = 10^{(-1/\text{declive})} - 1$$

O LOD define-se como a quantidade mínima de analito que pode ser detetada com 95% de confiança, enquanto o limite de quantificação (LOQ) é quantidade mínima de analito que pode ser detetada com 95% de confiança e que faz parte da curva de calibração. Relativamente às curvas de calibração, estas devem ter no mínimo cinco concentrações do analito de interesse que cubram pelo menos 3 ordens de grandeza. A repetibilidade é verificada através dos desvios padrão relativos de cada Cq de cada réplica de cada amostra, em que esta não deve ultrapassar os ±25%.

4.7.1 PCR em tempo real com corante EvaGreen

A PCR em tempo real com recurso ao corante EvaGreen foi efetuada com a uma diluição seriada de sésamo branco e de sésamo preto com *n*=5 concentrações (5 ng/µL-0,0005 ng/µL) para determinar o LOD absoluto do sistema (Figura 14). As curvas de amplificação permitiram obter uma curva de calibração com uma eficiência da PCR de cerca de 101,3% e com um R^2 de 0,986, parâmetros estes que estão de acordo com os critérios de aceitação para este tipo de metodologia. O LOD absoluto foi aparentemente bom, permitindo a amplificação de sésamo até 1 pg.

Estes valores são semelhantes aos reportados por Zhang et al., (2018) com um método de PCR em tempo real simplex utilizando o corante universal SyberGreen (limite de deteção absoluto na ordem dos 10 pg de DNA genómico). A análise de *melting* permitiu

identificar um pico de *melting* a 82,2ºC, no entanto, abaixo de 100 pg o fragmento formado não é igual ao produto a concentrações superiores.

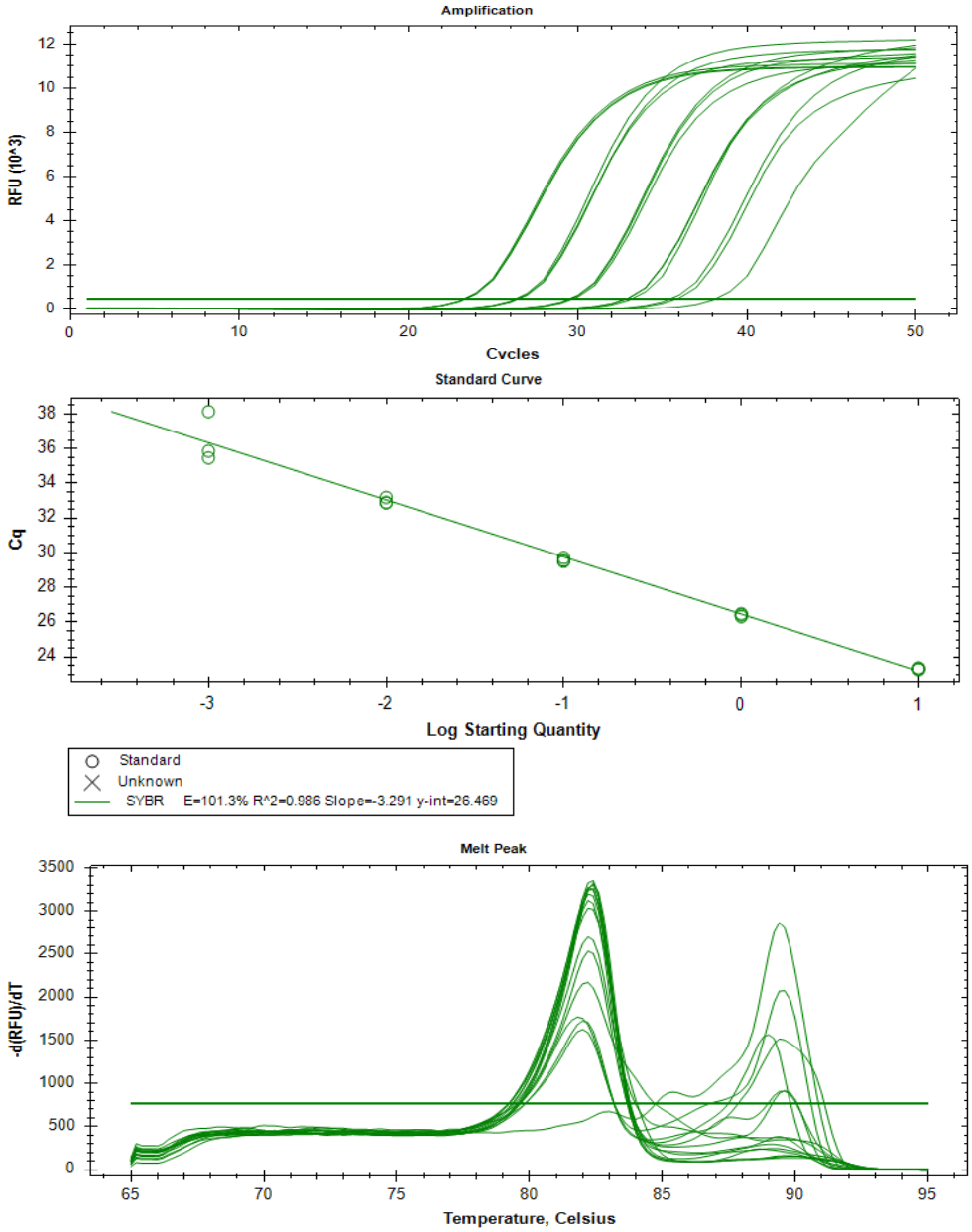


Figura 14 - Curvas de amplificação (A), respetiva curva de calibração (B) e curvas de *melting* (C) obtidas por PCR em tempo real da diluição seriada 1/10 (10 ng-1 pg) do extrato de DNA de sésamo branco com os *primers* SesCtc-F2/R2 e corante universal EvaGreen.

Abaixo de 100 pg, o produto formado apresenta um segundo pico de *melting* a 89,6ºC, o que confirma que este sistema de PCR em tempo real baseado no uso de corante EvaGreen não é suficientemente específico para a quantificação de sésamo em

quantidades vestigiais. Os mesmos resultados foram obtidos com o sésamo branco e o sésamo preto, pelo que o sistema não foi mais utilizado por falta de especificidade.

4.7.2 PCR em tempo real com sonda de hidrólise (TaqMan)

Contrariamente à técnica com corante universal que intercala os ácidos nucleicos de cadeia dupla, as sondas de hidrólise são consideradas como um terceiro *primer* que tem de emparelhar corretamente com a região alvo. Estas sondas são marcadas com um fluoróforo e um inibidor de fluorescência, designado por quencher. Em solução, a sonda marcada não emite fluorescência, mas quando a enzima amplifica o produto alvo a sonda é destruída e o fluoróforo separa-se do inibidor, emitindo assim fluorescência quando a sonda é hidrolisada. A PCR em tempo real com recurso a sonda de hidrólise foi efetuada com uma diluição seriada de sésamo branco e de sésamo preto com *n*=6 concentrações (50 ng/µL-0,0005 ng/µL) para determinar o LOD absoluto do sistema.

A curva de calibração da PCR em tempo real com sonda SesCtc-P e os *primers* SesCtc-F2/R2 apresentou excelentes parâmetros de amplificação, com uma eficiência de 102,8% e um coeficiente de correlação (R^2) de 0.992. O LOD absoluto foi definido em 1 pg, dado todas as réplicas amplificaram positivamente (Figura 15).

Relativamente à quantificação absoluta do sésamo preto, verifica-se que a eficiência e o declive encontram-se dentro dos parâmetros estipulados por Bustin et al. (2010) e ENGL (2015) (eficiência da PCR = 108,7% e declive = -3,131). Este método permitiu estimar um LOD de 1 pg de DNA de sésamo preto, sendo este resultado igual ao do sésamo branco (Figura 16). Em ambos os sistemas, foi possível a amplificação de 1 pg, o que corresponde a cerca de 1 cópia de DNA de sésamo (1C=0.97 pg) (https://cvalues.science.kew.org/search).

O sistema de PCR em tempo real com sonda foi também aplicado a misturas modelo de massa de biscoitos (não processados) e biscoitos (processados) contendo quantidades conhecidas de sésamo. O sistema permitiu determinar um limite de deteção relativo de 0,005% ou 50 mg/kg de sésamo em massa de biscoito (Figura 17 A, C). Os parâmetros da curva de calibração estão de acordo com os critérios de aceitação de ENGL (2015) e Bustin et al., (2010), apresentando uma eficiência de 92,2% e um coeficiente de correlação de 0,991.

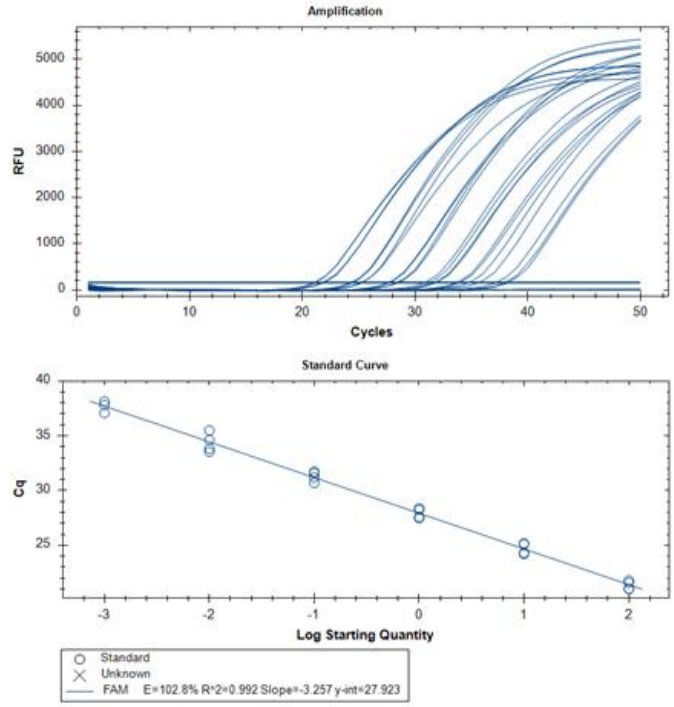


Figura 15 - Curvas de amplificação (A) e respetiva curva de calibração (B) obtidas por PCR em tempo real com os *primers* SesCtc-F2/R2 e sonda SesCtc-P utilizando as diluições seriadas (1/10) de DNA de sésamo branco (100 ng-0.1 pg) (*n*=4 réplicas de amplificação).

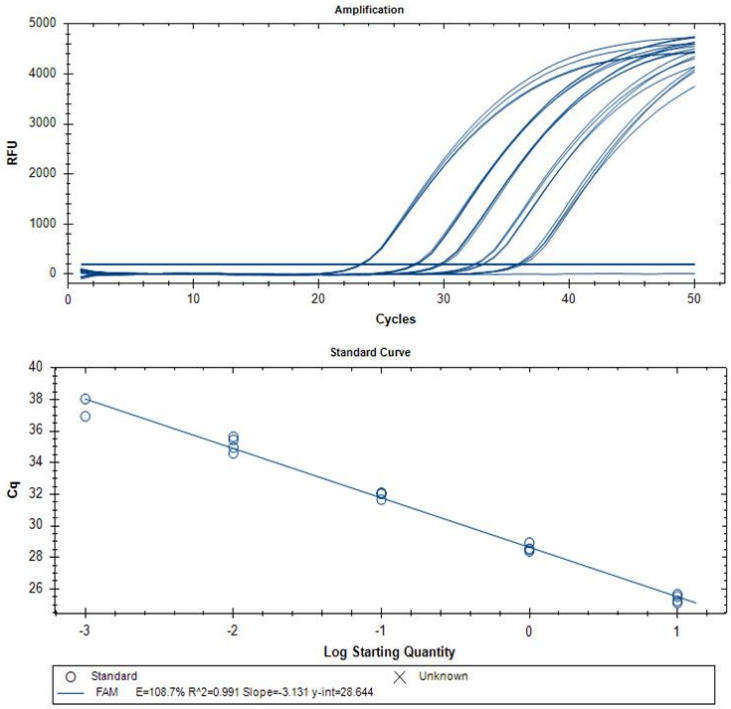


Figura 16 - Curvas de amplificação (A) e respetiva curva de calibração (B) obtidas por PCR em tempo real com os *primers* SesCtc-F2/R2 e sonda SesCtc-P utilizando as diluições seriadas (1/10) de DNA de sésamo preto (10 ng-0.1 pg) (*n*=4 réplicas de amplificação).

Nas misturas modelo de biscoito, o LOD relativo foi semelhante ao das misturas não processadas, nomeadamente 50 mg/kg de sésamo em biscoitos processados (Figura 17 B e D). A aplicação do sistema às misturas modelo de sésamo em biscoito apresentaram valores de eficiências de 100,6% e um coeficiente de correlação de 0,957, cujos critérios de performance são semelhantes às misturas não processadas, o que parece evidenciar que o método não é afetado pelo efeito do processamento. Segundo Fernández et al., (2001), a presença de genes multicópia torna o processo de recuperação de cópias de DNA mais simples quando o alimento é submetido a condições de processamento térmicas intensas.

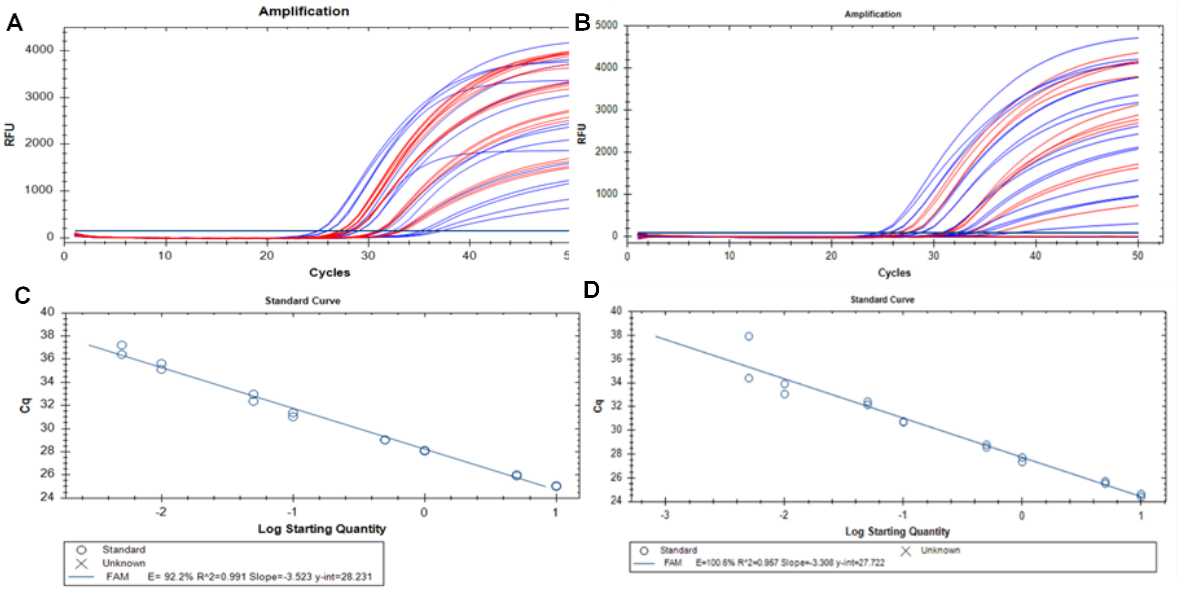


Figura 17 - Curvas de amplificação (A, B) e respetiva curva de calibração (C, D) obtidas por PCR em tempo real com os *primers* SesCtc-F2/R2 e sonda SesCtc-P utilizando as misturas modelo de sésamo em massa de biscoito (A, C) e em biscoitos (B, D) (10-0,001%) (*n*=2 réplicas de amplificação). As curvas a azul correspondem à curva de calibração e as vermelhas às amostras de validação.

4.7.3 Validação do método com amostras cegas

O método de PCR em tempo real com a sonda foi aplicado a 5 amostras cegas de massa de biscoito e biscoito contendo quantidades conhecidas de sésamo (2,5%;1,5%; 0,8%;0,2% e 0,02% (m/m)) com o objetivo de validar o método de quantificação proposto. Os resultados estimados de sésamo, bem como os parâmetros de validação estão representados nas Tabela 14 e Tabela 15. Segundo a ENGL, a precisão é definida como o coeficiente de variação relativo aos resultados sob determinadas condições de

reprodutibilidade. Os resultados só são considerados dentro dos critérios de aceitação se os valores do coeficiente de variação (CV) são <25%.

Ao verificar os resultados das amostras cegas não processadas de massa de biscoito e processadas de biscoitos com sésamo, podemos verificar que todos as amostras apresentam valores de CV inferiores a 25%, à exceção da amostra SES18 cujo CV foi de 27,6%. Por ser a amostra cega com menor quantidade de sésamo (0,02%) é expectável que desvios à precisão sejam maiores. No entanto, estes resultados de validação foram analisados de forma preliminar, pelo que deverão ser novamente repetidos. A performance do método proposto não parece ser afetada pelo processamento térmico, uma vez que os valores de precisão foram inferiores a 25% para todas as amostras cegas.

Tabela 14 - Estimativa do conteúdo em sésamo nas amostras cegas de massa de biscoitos (amostras não processadas) com análise da precisão e exatidão do método.

Amostra cega	Valor real (%)	Valor estimado (%)	Coeficiente de variação (%)	Erro (%)
SES14	2,5	2,53	1.5	1,3
SES15	1,5	1,45	2,9	-3,0
SES16	0,8	0,86	5,4	7,4
SES17	0,2	0,12	12,6	- 39,2
SES19	0,02	0,03	27,6	27,6

Tabela 15 - Estimativa do conteúdo em sésamo nas amostras cegas de biscoitos (amostras processadas) com análise da precisão e exatidão do método.

Amostra cega	Valor real (%)	Valor estimado (%)	Coeficiente de variação (%)	Erro (%)
SESP14	2,5	2,43	10,8	- 2,7
SESP15	1,5	1,21	0,5	- 19,1
SESP17	0,2	0,13	13,7	- 35,0
SESP18	0,08	0,09	7,9	12,1
SESP19	0,02	0,02	8,4	0,0

Relativamente à exatidão, esta é definida como o desvio do valor estimado ao valor verdadeiro, sendo reportando como erro relativo (%) ou *bias* e cujo critério de aceitação deve ser inferior a ±25%. É possível verificar que o erro relativo está dentro do critério estipulado pela ENGL para a maioria das amostras cegas, à exceção das SES17 e SES18 nas amostras cegas não processadas e da SESP17 no caso da amostra cega de biscoito. Tal como foi referido para a determinação da precisão, estes testes de validação deverão ser repetidos de forma a confirmar estes desvios aos valores verdadeiros (exatidão). Segundo López-Calleja et al., (2015) os pares de *primers* ITS conseguiram detetar numa

magnitude de 0,1 mg/kg. No entanto, para avaliar a precisão do método, os dados foram analisados através do teste t-student o qual demonstrou que o método era preciso. Analisou as suas amostras em dias diferentes e a robustez manteve-se sempre igual. Apesar deste estudo ser redirecionado para a amplificação da região ITS, este é considerado um gene multicópia assim como o citocromo oxidase c.

Embora existam alguns métodos propostos na literatura para a deteção do sésamo em alimentos, a maioria destes não utiliza misturas modelo ou não avalia o efeito do processamento na determinação efetiva do conteúdo em sésamo. Além disso, na sua maioria, os métodos descritos têm como alvo o gene que codifica a albumina 2S do sésamo (Ses i 1) e alguns estudos apenas avaliam a amplificação absoluta de DNA do sésamo, cuja determinação não permite extrapolar para a quantidade relativa do sésamo em alimentos.

5 Conclusão

Para este estudo, propuseram-se metodologias baseados na PCR qualitativa para a deteção de genes unicópia que codificam os alergénios (albumina 2S e vicilina) e genes multicópia (gene mitocondrial – o citocromo oxidase subunidade c e o gene cloroplastidial - proteína peroxirredoxina 2E-1). Das 5 regiões testadas apenas um par de *primers* demonstrou uma elevada especificidade, nomeadamente o par de *primers* SesCtc-F2/R2 com alvo no gene do citocromo c oxidase. Verificou-se que este par de *primers* não apresentava qualquer reatividade cruzada com as 58 espécies de plantas e animais testadas por PCR qualitativa. Para além desta questão, verificaram-se que as espécies mostardas oriental e preta, chia, trigo sarraceno e linhaça apresentam uma elevada reatividade com o sésamo, sendo amplificadas em simultâneo com o sésamo branco e preto na maioria dos sistemas de PCR testados.

A PCR qualitativa permitiu determinar um limite de deteção absoluto de 10 pg de DNA de sésamo e um limite de deteção relativo de 50 mg/kg em misturas cruas e processadas. Uma vez que o par de *primers* SesCtc-F2/R2 era o mais adequado para este trabalho, prosseguiu-se com uma primeira abordagem para obtenção do LOD absoluto através de sistema de PCR em tempo real com uso de corante universal (*Evagreen*). Foi possível determinar uma sensibilidade na gama dos 100 pg de DNA de sésamo. Apesar de aparentemente permitir amplificar quantidades menores de sésamo, a análise de *melting* permitiu identificar a amplificação de produtos inespecíficos nas concentrações mais baixas, demonstrando que esta abordagem não é exequível considerando os limites de deteção baixos necessários para a quantificação de alergénios.

Como alternativa, procedeu-se à otimização de um sistema com recurso a sonda de hidrólise (SesCtc-P). Esta apresentou melhores resultados, aumentando assim a sensibilidade do método e especificidade. Foi verificado um limite de deteção absoluto de 1 pg de DNA de sésamo branco e de sésamo preto. Nas amostras de sésamo processado e não processado a PCR em tempo real com recurso a sonda de hidrólise permitiu obter um LOD relativo de 0,005% ou 50 mg/kg de sésamo em massa de biscoito e em biscoito. A performance do método não é afetada pelo processamento uma vez que o LOD em misturas processadas foi igual ao das misturas não processadas, ou seja, 50 mg/kg de sésamo em matriz. As eficiências da PCR em tempo real para a matriz processada e a não processada variaram entre os 92.2% e 100.6%, pelo que, estão dentro dos critérios de aceitação para este tipo de metodologias.

Os resultados obtidos na análise de amostras cegas contendo sésamo em massa de biscoito e de biscoito processado estão em conformidade dos critérios da ENGL, pelo que se concluiu que o método tem elevada exatidão e precisão. O próximo passo para melhorar

os parâmetros de validação do método poderá contemplar à normalização da curva de calibração com recurso à amplificação simultânea do alvo sésamo e de um gene eucariota, para avaliar o efeito de matriz na quantificação do sésamo.

Em suma, neste estudo foram desenvolvidos métodos qualitativos e quantitativos rápidos e simples para auxiliar uma melhor gestão do sésamo como alimento alergénico com sensibilidade adequada para a deteção de sésamo em alimentos processados.

6 Referências

Aalberse RC, Akkerdaas J, van Ree R. 2001. «Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens». *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 56 (6): 478–90. https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2001.056006478.x.

Achouri A, Boye JI. 2013. «Thermal processing, salt and high pressure treatment effects on molecular structure and antigenicity of sesame protein isolate». *Food Research International* 53 (1): 240–51. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.04.016.

ALLERGOME. 2020. «Allergome database, the platform for allergen knowledge, Latina, Italy.» http://www.allergome.org. Acedido em 30 Setembro 2020.

Anilakumar KR, Pal A, khanum F, Bawa AS. 2010. «Nutritional, medicinal and industrial uses of sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds - An overview». *Agriculturae Conspectus Scientificus* 75 (4): 159–68.

Arakali SR, Green TD, Dinakar C. 2017. «Prevalence of food allergies in South Asia». *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 118 (1): 16–20. https://doi.org/10.1016/j.anai.2016.09.441.

Ashri A. 1998. «Sesame Breeding». Em *Plant breeding reviews, vol. 7*, editado por Jules Janick, 179–228.

Asturias JA, Gómez- Bayón N, Arilla CM, Sáchez- Pulido L, Valencia A, Martínez A. 2002. «Molecular and structural analysis of the panallergen profilin B cell epitopes defined by monoclonal antibodies». *International Immunology* 14 (9): 993–1001. https://doi.org/10.1093/intimm/dxf070.

Azarnia S, Boye JI, Mongeon V, Sabik H. 2013. «Detection of ovalbumin in egg white, whole egg and incurred pasta using LC-ESI-MS/MS and ELISA». *Food Research International* 52 (2): 526–34. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.039.

Bauer T, Weller P, Hammes WP, Hertel C. 2003. «The effect of processing parameters on DNA degradation in food». *European Food Research and Technology* 217 (4): 338–43. https://doi.org/10.1007/s00217-003-0743-y.

Beausoleil JL, Spergel JM. 2006. «Late diagnosis of tree nut and sesame allergy in patients previously sensitized but tolerant to peanut». *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 97 (4): 443–45. https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)60931-3.

Bedigian D. 2003. «Evolution of sesame revisited: domestication, diversity and prospects». *Genetic Resources and Crop Evolution* 50: 779–787.

Ben-shoshan M, Harrington DW, Soller L, Fragapane J, Lawrence J, Pierre YS, Godefroy SB, Elliot SJ, Clarke AE. 2010. «A population-based study on peanut, tree nut, fish, shellfish, and sesame allergy prevalence in Canada». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125 (6): 1327–35. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.03.015.

Beyer K, Bardina L, grishina G, Sampson HA. 2002. «Identification of sesame seed allergens by 2-dimensional proteomics and Edman sequencing: Seed storage proteins as common food allergens». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 110 (1): 154–59. https://doi.org/10.1067/mai.2002.125487.

Beyer K, Grishina L, Bardina L, Sampson HA. 2007. «Identification of a New Sesame Seed Allergen - Ses i 7, an 11 S Globulin belonging to the Seed Storage Proteins». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 119 (1): S117. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.11.439.

Blankestijn MA, Den hartog Jager CF, Blom WM, Otten HG, De Jong GAH, Gaspari M, Houben GF, Knulst AC, Verhoeckx KCM. 2018. «A subset of walnut allergic adults is sensitized to walnut 11S globulin Jug r 4». *Clinical and Experimental Allergy* 48 (9): 1206–13. https://doi.org/10.1111/cea.13208.

Boyce JMD, Jones SM, Sampson H, Cooper SF, Boyce S, et al. 2010. *Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: Report of the NIAID-sponsored expert panel*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Vol. 126. Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.10.007.

Breiteneder H, Radauer C. 2004. «A classification of plant food allergens». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 113 (5): 821–30. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.01.779.

Brezná B, Piknová L. 2013. «Real-time PCR Methods for Identification of Animal or Plant Species». *Curr Issues Mol Biol* 15 (18): 253–72.

Brough HA, Caubet JC, Mazon A, Haddad D, Bergmann MM, Wassenberg J, Panetta V et al. 2020. «Defining challenge-proven coexistent nut and sesame seed allergy: A prospective multicenter European study». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 145 (4): 1231–39. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.09.036.

Brzezinski JL. 2007. «Detection of sesame seed DNA in foods using real-time PCR». *Journal of Food Protection* 70 (4): 1033–36. https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.4.1033.

Bureau, Allergen. 2019. «Food Industry Guide to the Voluntary Incidental Trace Allergen Labelling (VITAL®) Program Version 3.0». *The Allergen Bureau Limited*, n. October:

1–18.

Burks AW, Tang M, Sicherer s, Muraro A, Eigenmann PA, Ebisawa M, Fiocchi A et al. 2012. «ICON: Food allergy». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 129 (4): 906–20. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.02.001.

Burney P, Summers C, Chin S, Hooper R, Van Ree R, Lidholm J. 2010. «Prevalence and distribution of sensitization to foods in the European Community Respiratory Health Survey: A EuroPrevall analysis». *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 65 (9): 1182–88. https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2010.02346.x.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. 2009. «The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments». *Clinical Chemistry* 55 (4): 611–22. https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797.

Cheng F, Wu J, Pan A, Sheng Q, Zhang D, Yeong HK, Li X, Zhou S, Yang L. 2016. «Development and inter-laboratory transfer of a decaplex polymerase chain reaction assay combined with capillary electrophoresis for the simultaneous detection of ten food allergens». *Food Chemistry* 199: 799–808. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.058.

Costa J, Amaral JS, Grazina L, Oliveira MBPPP, Mafra I. 2017a. «Matrix-normalised real-time PCR approach to quantify soybean as a potential food allergen as affected by thermal processing». *Food Chemistry* 221: 1843–50. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.091.

Costa J, Bavaro SL, Benedé S, Diaz - Perales A, Bueno- Diaz C, Gelencser E, Klueber J et al. 2020. «Are Physicochemical Properties Shaping the Allergenic Potency of Plant Allergens?» *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. https://doi.org/10.1007/s12016-020-08810-9.

Costa J, Fernandes TJR, Villa C, Oliveira MBPP, Mafra I. 2017b. «Advances in food allergen analysis». *Food Safety: Innovative Analytical Tools for Safety Assessment*, 305–60. https://doi.org/10.1002/9781119160588.ch9.

Costa J, Oliveira MBPP, Mafra I. 2013. «Effect of thermal processing on the performance of the novel single-tube nested real-time PCR for the detection of walnut allergens in sponge cakes». *Food Research International* 54 (2): 1722–29. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.09.047.

Dalal I, Binson I, Levine A, Somekh E, Ballin A, Reifen R. 2003. «The pattern of sesame sensitivity among infants and children». *Pediatric Allergy and Immunology* 14 (4): 312–

16. https://doi.org/10.1034/j.1399-3038.2003.00040.x.

Dalal I, Goldberg M, Yitzhak K. 2012. «Sesame seed food allergy». *Current Allergy and Asthma Reports* 12 (4): 339–45. https://doi.org/10.1007/s11882-012-0267-2.

Dubliela P, Kabasser S, Smargiasso N, Geiselhart S, Bublin M, Hafner C, Mazzucchelli G, Hoffmann- Sommergruber K. 2018. «Jug r 6 is the allergenic vicilin present in walnut responsible for IgE cross-reactivities to other tree nuts and seeds». *Scientific Reports* 8 (1): 1–14. https://doi.org/10.1038/s41598-018-29656-4.

Dumitru LM, Irimia-Vladu M, Sariciftci NS. 2016. *Biocompatible Integration of Electronics Into Food Sensors*. *Comprehensive Analytical Chemistry*. Vol. 74. Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/bs.coac.2016.04.009.

Elhlers AM, Rossnagel M, Brix B, Blankestijn MA, Le TM, Suer W, Otten HG, Knulst AC. 2019. «Sesame oleosins are minor allergens». *Clinical and Translational Allergy* 9 (1): 1–5. https://doi.org/10.1186/s13601-019-0271-x.

Elleuch M, Bedigian D, Zitoun A. 2011. «Sesame (Sesamum indicum L.) Seeds in Food, Nutrition, and Health». *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*, 1029–36. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375688-6.10122-7.

ENGL. 2015. «ENGL (2015) Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing.» *European network of GMO laboratories, Joint Research Center*: 1–8. https://doi.org/10.2788/65827.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2020. «FAOSTAT». 2020. www.fao.org/faostat/en/#data/. Acedido em 2 Outubro 2020.

Fernández A, García T, Asensio L, Rodríguez MA, González I, Hernández PE, Martín R. 2001. «PCR-RFLP analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region for identification of 3 clam species». *Journal of Food Science* 66 (5): 657–61. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04617.x.

Gangur V, Kelly C, Navuluri L. 2005. «Sesame allergy: A growing food allergy of global proportions?» *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 95 (1): 4–11. https://doi.org/10.1016/s1081-1206(10)61181-7.

García BE, Lizaso MT. 2011. «Cross-reactivity syndromes in food allergy». *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 21 (3): 162–70.

Gendel SM. 2012. «Comparison of international food allergen labeling regulations». *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 63 (2): 279–85. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.04.007.

Hauser M, Roulias A, Ferreira F, Egger M. 2010. «Panallergens and their impact on the allergic patient». *Allergy, Asthma and Clinical Immunology* 6 (1): 1–14. https://doi.org/10.1186/1710-1492-6-1.

Holzhauser T, Johnson P, Hindley JP, O'Connor G, Chan CH, Costa J, Faeste CK et al. 2020. «Are current analytical methods suitable to verify VITAL® 2.0/3.0 allergen reference doses for EU allergens in foods?» *Food and Chemical Toxicology* 145. https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111709.

Houhoula DP, Belsis V, Georgopoulos L, Giannou V, Kyrana VR, Tsaknis J, Lougovois VP, Koussissis. 2015. «Detection of sesame allergen traces with two PCR assays - the challenge to protect food-allergic consumers». *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology* 3 (4): 210. https://doi.org/10.24925/turjaf.v3i4.210-215.221.

Jappe U, Schawager C. 2015. «Relevance of lipophilic allergens in food allergy diagnosis». *Current Allergy and Asthma Reports* 17 (9): 1–9. https://doi.org/10.1007/s11882-017-0731-0.

Jayasena S, Smits M, Fiechter D, Jong A, Nordlee J, Baumert J, Taylor SL, Pieters RH, Koppelman SJ. 2015. «Comparison of six commercial ELISA kits for their specificity and sensitivity in detecting different major peanut allergens.» *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63 (6): 1849–55. https://doi.org/10.1021/jf504741t.

Kahyaoglu KST, Kaya S. 2006. «Modeling of moisture, color and texture changes in sesame seeds during the conventional roasting». *Journal of Food Engineering* 75 (2): 167–77. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.04.011.

Kang TS. 2019. «Basic principles for developing real-time PCR methods used in food analysis: A review». *Trends in Food Science and Technology* 91 (March): 574–85. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.037.

Kasera R, Singh AB, Prasad KN, Arora N. 2015. «Enzymatic hydrolysis: A method in alleviating legume allergenicity». *Food and Chemical Toxicology* 76: 54–60. https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.11.023.

Krishnan K, Moens PDJ. 2009. «Structure and functions of profilins». *Biophysical Reviews* 1 (2): 71–81. https://doi.org/10.1007/s12551-009-0010-y.

Leduc V, Moneret-Vautrin DA, Tzen JTC, Morisset M, Guerin L, Kanny G. 2006. «Identification of oleosins as major allergens in sesame seed allergic patients». *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 61 (3): 349–56. https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2006.01013.x.

Lehrer SB, Ayuso R, Reese G. 2002. «Current understanding of food allergens». *Annals of*

the New York Academy of Sciences 964: 47–68. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04133.x.

Lepski S, Brockmeyer J. 2013. «Impact of dietary factors and food processing on food allergy.» *Molecular Nutrition & Food Research* 57 (1): 145–52. https://doi.org/10.1002/mnfr.201200472.

López-Calleja IN, Cruz S, Martín R, Gonzalez I, Garcia T. 2015. «Duplex real-time PCR method for the detection of sesame (*Sesamum indicum*) and flaxseed (*Linum usitatissimum*) DNA in processed food products». *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 32 (11): 1772–85. https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1079650.

Lyons SA, Burney PGJ, Ballmer-Weber BK, Fernandez- Rivas M, Berreales L, Clausen M, Dubakiene R et al. 2019. «Food allergy in adults: substantial variation in prevalence and causative foods across Europe». *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* 7 (6): 1920-1928.e11. https://doi.org/10.1016/j.jaip.2019.02.044.

Ma, Xiuli, Hong Li, Jiukai Zhang, Wensheng Huang, Jianxun Han, Yiqiang Ge, Jinlyu Sun, et al. 2020. «Comprehensive quantification of sesame allergens in processed food using liquid chromatography-tandem mass spectrometry». *Food Control* 107 (1): 106744. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106744.

Maruyama N, Nakagawa T, Ito K, Cabanos C, Borres MP, Movérare R, Tanaka A, Sato S, Ebisawa M. 2016. «Measurement of specific IgE antibodies to Ses i 1 improves the diagnosis of sesame allergy». *Clinical and Experimental Allergy* 46 (1): 163–71. https://doi.org/10.1111/cea.12626.

Monaci L, Pilolli R, Angelis ED, Crespo JF, Novak N, Cabanillas B. 2020. *Food allergens: Classification, molecular properties, characterization, and detection in food sources*. *Advances in Food and Nutrition Research*. 1.ª ed. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2020.03.001.

Moreno JF, Maldonado BM, Wellner N, Mills CEN. 2005. «Thermostability and in vitro digestibility of a purified major allergen 2S albumin (Ses i 1) from white sesame seeds (Sesamum indicum L.)». *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1752 (2): 142–53. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.07.022.

Moreno JF, Clemente A. 2008. «2S Albumin storage proteins: What makes them food allergens?» *The Open Biochemistry Journal* 2: 16–28. https://doi.org/10.2174/1874091x00802010016.

Morisset, M., D. A. Moneret-Vautrin, G. Kanny, L. Guénard, E. Beaudouin, J. Flabbée, e R.

Hatahet. 2003. «Thresholds of clinical reactivity to milk, egg, peanut and sesame in immunoglobulin E-dependent allergies: Evaluation by double-blind or single-blind placebo-controlled oral challenges». *Clinical and Experimental Allergy* 33 (8): 1046–51. https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2003.01734.x.

Mushtaq A, Hanif MA, Ayub MA, Bhatti IA, Jilani MI. 2020. *Sesame*. Editado por Elsevier Ltd. *Medicinal Plants of South Asia*. Vol. 44. https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004.

Mustorp S, Engdahl-axelsson C, Svensson U, Holck A. 2008. «Detection of celery (*Apium graveolens*), mustard (*Sinapis alba, Brassica juncea, Brassica nigra*) and sesame (*Sesamum indicum*) in food by real-time PCR». *European Food Research and Technology* 226 (4): 771–78. https://doi.org/10.1007/s00217-007-0589-9.

Neethirajan S, Weng X, Tah A, Cordero JO, Ragavan KV. 2018. «Nano-biosensor platforms for detecting food allergens – New trends». *Sensing and Bio-Sensing Research* 18 (July 2017): 13–30.

Okubo K, Nishimura N, Shibasaki K. 1979. «Composition of sesame seed protein components and purification of the amin globulin». Cereal Chemistry 56: 100-4.

Orruño E, Morgan MRA. 2007. «Purification and characterisation of the 7S globulin storage protein from sesame (*Sesamum indicum* L.)». *Food Chemistry* 100 (3): 926–34. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.051.

Orruño E, Morgan MRA. 2011. «Resistance of purified seed storage proteins from sesame (Sesamum indicum L.) to proteolytic digestive enzymes». *Food Chemistry* 128 (4): 923–29. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.120.

Ovadia A, Nahum A, Tasher D, Abir S, Epo L, Kessel A and Dalal I. 2019. «Sesame: An unrecognized trigger of food protein-induced enterocolitis syndrome». Research-article. *American Academy of Allergy, Asthma & Immunology* 7 (1): 305–6. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jaip.2018.05.007.

Pafundo S, Gullì M, Marmiroli N. 2010. «Multiplex real-time PCR using SYBR® GreenER™ for the detection of DNA allergens in food». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396 (5): 1831–39. https://doi.org/10.1007/s00216-009-3419-z.

Pastorello EA, Varin E, Farioli L, Pravettoni V, Ortolani C, Trambaioli C, Fortunato, Giuffrida MG, Rivolta F, Robino A, Calamari AM, Lacava L, Conti A. 2001. «The major allergen of sesame seeds (Sesamum indicum) is a 2S albumin». *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 756 (1–2): 85–93. https://doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00073-1.

Peyman, H, Ahmadi MRH, Yaghoubi M, Mahmodi E, Delpisheh A. 2011. «Food allergy in patients with confirmed celiac disease». *Clinical and Translational Allergy* 1 (Suppl 1): P27. https://doi.org/10.1186/2045-7022-1-s1-p27.

Pilolli R, Monaci R, Visconti A. 2013. «Advances in biosensor development based on integrating nanotechnology and applied to food-allergen management». *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 47: 12–26. https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.02.005.

Pjano VD, Passalacqua G, Magazzú G, Luca F, Feliciootto R, Barberio G. 2000. «Anaphylaxis to sesame in a patient with celiac disease». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 105 (1): S133. https://doi.org/10.1016/s0091-6749(00)90829-7.

Platteau C, Loose MD, Meulenaer BD, Taveniers I. 2011. «Detection of allergenic ingredients using real-time PCR: A case study on hazelnut (Corylus avellena) and soy (Glycine max)». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (20): 10803–14. https://doi.org/10.1021/jf202110f.

Prado M, Ortea I, Vial S, Rivas J, Calo- Mata P, Barros- Velázquez J. 2016. «Advanced DNA- and protein-based methods for the detection and investigation of food allergens». *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56 (15): 2511–42. https://doi.org/10.1080/10408398.2013.873767.

Prakash V, Nandi PK. 1978. «Isolation and characterization of α-globulin of sesame seed (*Sesamum Indicum* L.)». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26 (2): 320–23. https://doi.org/10.1021/jf60216a043.

Pumphrey RSH, Patha M, Gowland H. 2007. «Further fatalities caused by anaphylactic reactions to food, 2001-2006». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 119 (4): 1016–18. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.12.622.

Radauer C, Breiteneder H. 2007. «Evolutionary biology of plant food allergens». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120 (3): 518–25. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.07.024.

Radauer C., Bublin M, Wagner S, Mari A, Breiteneder H. 2008. «Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 121 (4). https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.01.025.

Rahaman T, Vasiljevic T, Ramchandran L. 2015. «Conformational changes of β-lactoglobulin induced by shear, heat, and pH-Effects on antigenicity». *Journal of Dairy Science* 98 (7): 4255–65. https://doi.org/10.3168/jds.2014-9010.

Rahaman T, Vasiljevic T, Ramchandran L. 2016. «Effect of processing on conformational

changes of food proteins related to allergenicity». *Trends in Food Science and Technology* 49: 24–34. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.001.

Regulamento (UE) nº 1169/2011. 2011. «Regulamento (UE) no 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de Outubro de 2011, relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, que altera os Regulamentos (CE) no 1924/2006 e (CE) no 1925/2006 do Parlamento ». *Jornal Oficial da União Europeia*, 2011.

Reld G, Husain FT, Bretbacher IE, Nemes A, Cichna-Markl M. 2010. «Development and validation of a sandwich ELISA for the determination of potentially allergenic sesame (Sesamum indicum) in food». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398 (4): 1735–45. https://doi.org/10.1007/s00216-010-4069-x.

Robbelen G, Downey RK, Ashiri A. 1989. «Sesame». Em *Oil cops of the world*, 375–87. New York: Mcgraw - Hill.

Sampson HA, O'Mahony L, Burks BA, Marshall P, Lack G, Akdis CA. 2018. «Mechanisms of food allergy». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 141 (1): 11–19. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.11.005.

Schöringhumer K, Reld G, Cichna- Markl M. 2009. «Development and validation of a duplex real-time PCR method to simultaneously detect potentially allergenic sesame and hazelnut in food». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (6): 2126–34. https://doi.org/10.1021/jf8033336.

Schwager C, kull S, Krause S, Schocker F, Petersen A, Beker W, Jappe U. 2015. «Development of a novel strategy to isolate lipophilic allergens (oleosins) from peanuts». *PLoS ONE* 10 (4): 1–15. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123419.

Shewry, P. R., J. A. Napier, e A. S. Tatham. 1995. «Seed storage proteins: Structures and biosynthesis». *Plant Cell* 7 (7): 945–56. https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.945.

Tai SKS, Wu, LSH, Chen EMF, Tzen JTC. 1999. «Molecular cloning of 11S globulin and 2S albumin, the two major seed storage proteins in sesame». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (12): 4932–38. https://doi.org/10.1021/jf990366z.

Toda M, Heilmann M, Ilchmann A, Virths S. 2014. «The Maillard reaction and food allergies: Is there a link?» *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 52 (1): 61–67. https://doi.org/10.1515/cclm-2012-0830.

Torricelli M, Pierboni E, Rondini C, Altissimi S, Haouet N. 2020. «Sesame, pistachio, and macadamia nut: Development and validation of new allergenic systems for fast real-time PCR application». *Foods* 9 (8). https://doi.org/10.3390/foods9081085.

van Hengel AJ. 2007. «Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389 (1): 111–18. https://doi.org/10.1007/s00216-007-1353-5.

Van Ree R, Voitenko V, Van Leeuwen WA, Aalberse RC 1992. «Profilin is a cross-reactive allergen in pollen and vegetable foods». *Int Arch Allergy Immunol* 98: 97–104.

Verhoeckx, KCM, Vissers YM, Baumert JL, Faludi R, Feys M, Flanagan S, Herouet-Guicheney C, et al. 2015. «Food processing and allergenicity». *Food and Chemical Toxicology* 80: 223–40. https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.03.005.

Verma AK, Kumar S, Das M, Dwivedi PDD. 2012. «Impact of Thermal Processing on Legume Allergens.» *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)* 67 (4): 430–41. https://doi.org/10.1007/s11130-012-0328-7.

Vial S, Berrahal Y, Prado M, Wenger J. 2017. «Single-Step DNA Detection Assay Monitoring Dual-Color Light Scattering from Individual Metal Nanoparticle Aggregates». *ACS Sensors* 2 (2): 251–56. https://doi.org/10.1021/acssensors.6b00737.

Villa C, Costa J, Gondar C, Oliveira MBPP, Mafra I. 2018. «Effect of food matrix and thermal processing on the performance of a normalised quantitative real-time PCR approach for lupine (Lupinus albus) detection as a potential allergenic food». *Food Chemistry* 262 (April): 251–59. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.079.

Warren, Christopher M., Avneet S. Chadha, Scott H. Sicherer, Jialing Jiang, e Ruchi S. Gupta. 2019. «Prevalence and Severity of Sesame Allergy in the United States». *JAMA network open* 2 (8): e199144. https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2019.9144.

WHO, FAO; 2018. «Codex Alimentarius General standard for the labelling of prepackaged foods. Adopted in 1985, amended in 1991, 1999, 2001, 2003, 2005, 2008 and 2010, revised in 2018.» *international Food standards* 1 (2): 2018.

WHO/IUIS 2020. «World Health Organization/International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature Sub-committee». http://www.allergen.org/. Acedido em 30 Setembro 2020.

Yanagida N, Ejiri Y, Takeishi D, Sato A, Maruyama N, Takahashi K, Nagakura IK, Ogura K, Asaumi T, Ebisawa M. 2019. «Ses i 1-specific IgE and sesame oral food challenge results». *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* 7 (6): 2084-2086.e4. https://doi.org/10.1016/j.jaip.2019.02.022.

Youle RJ, Huang AHC. 1981. «Occurrence of low molecular weight and high cysteine

containing albumin storage proteins in oilseeds of diverse species». *American Journal of Botany* 68 (1): 44–48.

Zhang W, Zhao Y, Xu Q, Chen Q. 2018. «Development of a triplex real-time PCR assay for simultaneous detection of allergenic ingredients in processed food». *Czech Journal of Food Sciences* 36 (1): 22–27. https://doi.org/10.17221/28/2017-CJFS.

Zoumpoulakis P, Sinanoglou VJ, Batrinou A, strati IF, Miniadis-Meimaroglou S. 2012. «A combined methodology to detect γ-irradiated white sesame seeds and evaluate the effects on fat content, physicochemical properties and protein allergenicity». *Food Chemistry* 131 (2): 713–21. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.049.

Zuidmeer L, Goldhahan K, Rona RJ, Gislason S, Madsen C, Summers C, Sodergren E. 2008. «The prevalence of plant food allergies: A systematic review». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 121 (5). https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.02.019.