

Desenvolvimento e validação de um genossensor para a deteção de alergénios de avelã

Patrícia Raquel da Silva Moreira

Mestrado em Métodos Avançados e Acreditação em Análise Química

Departamento de Química e Bioquímica

2021

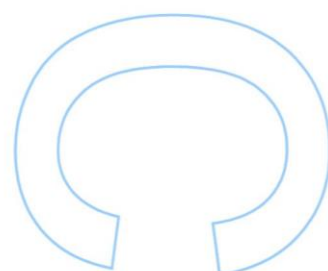
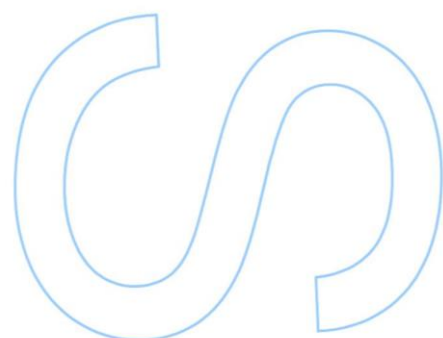
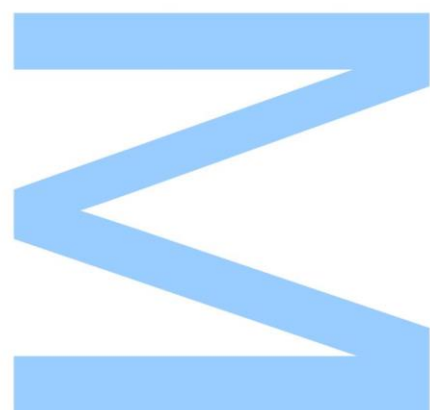
Orientador

Doutora Renata Barros da Costa, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Coorientadores

Doutora Joana Sofia Barros da Costa, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Professor Doutor Carlos Manuel de Melo Pereira, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto



Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____

3

5

6

Agradecimentos

À minha orientadora, Doutora Renata Costa, gostaria de agradecer por toda a simpatia, palavras sábias, e pelo voto de confiança ao longo deste ano tão desafiante. Para além de me motivar diariamente, fez-me crescer aos níveis pessoal e profissional, e ensinou-me competências como a resiliência, que vou levar para o resto da vida.

À minha coorientadora, Doutora Joana Costa, agradeço toda a paciência, dedicação e ensinamentos que me transmitiu na área da biologia molecular. Agradeço-lhe ainda por toda a preocupação, carinho e boa disposição.

Ao Professor Doutor Carlos Pereira, por ter disponibilizado todas as condições necessárias para a realização deste trabalho. Gostaria ainda de lhe agradecer por todo o apoio e ensinamentos que me transmitiu nos últimos 4 anos, tendo sido um dos impulsionadores do meu gosto pela área da Química analítica e dos sensores.

Quero ainda agradecer ao Centro de Investigação em Química da Universidade do Porto (CIQUP), e aos respetivos colaboradores pelo acolhimento, simpatia e prestabilidade.

À FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia), gostaria de agradecer o financiamento e a bolsa de investigação no âmbito do projeto AlleRiskAssess – “Towards allergen risk assessment of foods: structural and immunogenic changes induced by novel processing technologies and alternative protein sources” – PTDC/BAA-AGR/31720/2017.

Aos colaboradores do Laboratório de Bromatologia e Hidrologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, gostaria de agradecer pela atenção, suporte laboratorial e calorosa receção. Em especial, à Doutora Caterina Villa, gostaria de agradecer todo o apoio e disponibilidade que mostrou, não só ao longo do último ano, mas especialmente nos últimos meses.

Às minhas amigas Cátia, Mariana, Maria, Ana Luísa e Diana, um enorme obrigada pela força e apoio que me dão diariamente. A vossa companhia foi crucial ao longo desta etapa tão importante da minha vida.

Um especial agradecimento às minhas melhores amigas, por me acompanharem desde que me lembro. À Catarina, obrigada por seres incansável comigo, por todas as palavras de apoio e sextas-feiras na praia, por me fazeres sorrir diariamente, e especialmente por tornares a minha vida bem mais colorida. À Sofia, pela amizade inseparável ao longo de todos estes anos. Obrigada por me fazeres crescer, e por cresceres comigo, até às pessoas que somos hoje.

Ao meu namorado Marco, por todo o amor e paciência. Obrigada por me motivares diariamente a seguir os meus sonhos, e celebrares as minhas vitórias tão intensamente como celebrarias as tuas, e por me fazeres acreditar que nenhuma barreira é grande o suficiente para me conter.

Por último, mas definitivamente não menos importante, aos meus pais, ao meu irmão e à minha avó “pequenina”. A vocês que acreditaram em mim, até quando eu não acreditava, que me deram asas para atingir todos os meus sonhos e me fizeram sentir a menina mais sortuda do mundo, devo-vos um agradecimento imensurável.

Um obrigada a todos os que, à mais ou menos tempo, fazem parte da minha vida e tornaram este ano um dos melhores e mais desafiantes da minha vida!

Resumo

O alergénio Cor a 14 tem sido descrito na literatura como um importante marcador de elevado risco em reações alérgicas severas à avelã. O alergénio Cor a 14 preserva a sua alergenicidade em condições extremas de pH, temperatura, desnaturação induzida por surfactantes e de atividade proteolítica de enzimas digestivas. Neste trabalho foi desenvolvido e validado um genossensor ótico (SPR) com hibridização tipo *sandwich*, para a deteção da sequência de ADN específica do gene que codifica a proteína Cor a 14 da avelã. O elemento de bioreconhecimento foi imobilizado no sensor de ouro (Au-SPR) através da ligação Au-S estabelecida entre a superfície do sensor e a cadeia de oligonucleótidos sintética (CP) modificada com um grupo tiol. Posteriormente, imobilizou-se o espaçador lateral p-aminotiofenol (p-ATP), o qual maximizou a acessibilidade do alvo à CP.

O desenvolvimento do genossensor com alvo no gene que codifica a Cor a 14 iniciou-se pela otimização do sistema com recurso a uma cadeia de oligonucleótidos sintética, sendo posteriormente aplicado ao mesmo alvo extraído e amplificado a partir da avelã. A hibridização da CP com a cadeia de oligonucleótidos alvo sintética apresentou um limite de deteção (LOD) de $1,99 \times 10^{-17}$ mol L⁻¹ (19,9 amol L⁻¹) e sensibilidade de $[23,15 \pm 1,13]$ m⁰ década⁻¹ para o intervalo dinâmico de resposta linear de $1,00 \times 10^{-16}$ mol L⁻¹ (100 amol L⁻¹) e $1,00 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹ (0.1 nmol L⁻¹).

A amplificação do gene alvo da avelã foi realizada com recurso ao desenho de primers específicos que flanqueiam a mesma zona de reconhecimento utilizada pelo sensor. A especificidade dos primers e potencial reatividade cruzada foram avaliados por ferramentas computacionais (análise *in silico*) e experimentalmente por reação em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction - PCR) qualitativa com eletroforese em gel de agarose para 38 espécies de plantas (frutos de casca rija, cereais, sementes, frutas, leguminosas, entre outros) com proximidade genética ao alvo. Não foi reportada reatividade cruzada para nenhuma das espécies testadas, portanto, os *primers* e a região alvo selecionados para a PCR e o sensor são considerados específicos para a deteção de avelã.

Após a otimização dos parâmetros experimentais, estudou-se a performance analítica do genossensor ótico (SPR) com produtos amplificados por PCR de oito variedades de avelã (Pauellet, Segorbe, Santa Maria de Jésus, Couplà, Camponica, Cosford, Gunslebert e Avelã comercial italiana). O genossensor apresentou sensibilidades entre $12,01 \pm 0,49$ m⁰ década⁻¹ (Cosford) e $17,63 \pm 1,21$ m⁰ década⁻¹ (Couplà) com resposta linear para o intervalo de concentrações entre $1,00 \times 10^{-18}$ (1 amol

L⁻¹) a $1,00 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹ (0.1 nmol L⁻¹), para as oito variedades de avelã testadas com coeficientes de correlação (R²) entre 0,9726 e 0,9941.

Para testar a aplicabilidade do genossensor a amostras reais de alimentos contendo avelã, genossensor sistema foi testado em produtos de PCR amplificados a partir de misturas modelo de avelã em massa de trigo, apresentado um limite de deteção de 0,001% (10 mg/kg) e sensibilidade de $[-17,17 \pm 0,54]$ m⁰ para o intervalo 0,001% a 1% de avelã em massa de trigo (que corresponde a 1,6 mg kg⁻¹ de proteína de avelã na matriz).

O genossensor foi validado com recurso à metodologia de PCR em tempo real. A PCR em tempo real apresentou parâmetros de performance adequados, nomeadamente uma eficiência de 91,7%, um R² de 0,978 e um declive de -3,538, para um intervalo dinâmico de resposta linear de 0,005% a 50%. Com esta metodologia foi possível obter um LOD de 0,005% de avelã em massa de trigo (correspondendo a 7,8 mg kg⁻¹ de proteína de avelã na matriz).

O genossensor ótico (SPR) com alvo no gene que codifica o alergénio da avelã, Cor a 14, permitiu detetar e quantificar o alergénio com limites de deteção mais baixos comparativamente ao LOD obtido por PCR. Assim, o genossensor desenvolvido representa uma ferramenta analítica alternativa, específica, sensível e de relativo baixo custo para detetar o alergénio alvo Cor a 14, com aplicabilidade demonstrada para análise de avelã como ingrediente alergénico em alimentos complexos.

Palavras-chave Genossensor ótico, Ressonância plasmónica de superfície (SPR), Reação em cadeia da polimerase (PCR), PCR em tempo real, Alergénios, Alergias, Avelã, Cor a 14, ADN

Abstract

The allergen Cor a 14 has been described in the literature as an important marker of high risk in severe allergic reactions to hazelnut. The allergen Cor a 14 preserves its allergenicity under extreme conditions of pH, temperature, denaturation induced by surfactants and proteolytic activity of digestive enzymes. In this work, an optical genosensor (SPR) with a *sandwich*-type hybridization was developed and validated for the detection of a gene encoding the hazelnut Cor 14 protein. The biorecognition element was immobilized on the gold sensor (Au-SPR) through an Au-S bond established between the sensor surface and the synthetic oligonucleotide (CP) chain modified with a thiol group. Subsequently, the p-aminothiophenol (p-ATP) lateral spacer was immobilized, which will maximize the target's accessibility to the CP.

The development of the genosensor with target on the gene that encodes Cor a 14 began by optimizing the system using a synthetic oligonucleotide chain, being later applied to the same target sequence from extracted and amplified natural hazelnut. Hybridization of CP with the synthetic target oligonucleotide strand showed a detection limit (LOD) of $1.99 \times 10^{-17} \text{ mol L}^{-1}$ (19.9 mol L^{-1}) and a sensitivity of $[23.15 \pm 1.13] \text{ m}^0$ for the dynamic linear range of $1.00 \times 10^{-16} \text{ mol L}^{-1}$ (100 amol L^{-1}) and $1.00 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ (0.1 nmol L^{-1}).

The amplification of the target gene was performed using the design of specific primers that flank the same recognition zone used by the sensor. Primer specificity and potential cross-reactivity were firstly evaluated through computational tools (in silico analysis), with further experimental analysis by qualitative PCR with agarose gel electrophoresis for 38 plant species (tree nuts, cereals, seeds, fruits, legumes, among others). No cross-reactivity was reported for any of the species tested, therefore, the selected primers and respective target region were considered specific for the hazelnut detection.

After optimizing the experimental parameters, the analytical performance of the optical genosensor (SPR) was studied applied to PCR amplified products from eight hazelnut varieties (Paeulet, Segorbe, Santa Maria de Jésus, Couplà, Camponica, Cosford, Gunslebert and Italian commercial hazelnut). The genosensor showed sensitivities between $12.01 \pm 0.49 \text{ m}^0 \text{ decade}^{-1}$ (Cosford) and $17.63 \pm 1.21 \text{ m}^0 \text{ decade}^{-1}$ (Couplà) with linear response for the range of concentrations between 1.00×10^{-18} (1 amol L^{-1}) to $1.00 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ (0.1 nmol L^{-1}), for the eight hazelnut varieties tested with correlation coefficients (R^2) between 0.9726 and 0.9941.

In order to test the applicability of the genossensor to real food samples containing hazelnut, the system was tested with PCR products amplified from model mixtures of hazelnut in wheat pasta, presenting a detection limit (LOD) of 0.001% and a sensitivity of $[-17.17 \pm 0.54] m^0$ for the range 0.001% to 1% hazelnut in wheat pasta (which corresponds to 1.6 mg kg^{-1} of hazelnut protein in matrix).

The genossensor was validated by developing a real-time PCR methodology. Real-time PCR showed good performance parameters, namely an efficiency of 91.7%, a R^2 of 0.978 and a slope of 3.538, for a dynamic linear range from 0.005% to 50%. With this methodology, it was possible to obtain an LOD of 0.005% of hazelnut in wheat pasta (corresponding to 7.8 mg kg^{-1} of hazelnut protein in matrix).

The optical genossensor (SPR) targeting a hazelnut allergen-specific DNA sequence, Cor 14, will allow the indirect detection and quantification of the allergen with slightly lower LOD compared to the LOD obtained by PCR. Thus, the developed genossensor represents an alternative, specific, sensitive, and relative low-cost analytical tool to detect the target allergen Cor 14, with demonstrated applicability for analysis of hazelnut as an allergenic ingredient in complex foods.

Keywords Optical genossensor, Surface plasmon resonance (SPR), Polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR, Allergens, Allergies, Hazelnut, Cor a 14, DNA

Índice

Agradecimentos.....	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Índice.....	xi
Índice de tabelas.....	xiv
Índice de figuras	xvi
Lista de Abreviaturas/Siglas.....	xix
1. Introdução.....	1
1.1 Alergias alimentares	1
1.2 Alergénios alimentares	4
1.3 Legislação na União Europeia	5
1.4 Frutos de casca rija - Avelã	7
1.4.1 Prevalência.....	8
1.4.2 Proteínas alergénicas da avelã.....	8
1.4.3 Sintomatologia.....	10
1.5 Metodologias para a deteção de alergénios da avelã	11
1.5.1 ELISA.....	12
1.5.2 Espectrometria de Massa.....	13
1.5.3 PCR em tempo real.....	14
1.5.4 Biossensores.....	18
1.5.4.1 Elementos de bioreconhecimento.....	18
1.5.4.1.1 Imunossensores.....	19
1.5.4.1.2 Genossensores	19
1.5.4.1.2.1 Imobilização de ADN.....	19
1.5.4.1.2.2 Pré-tratamento de amostras.....	21
1.5.4.1.2.3 Genossensores – modelo <i>sandwich</i>	22
1.5.4.2 Tipos de transdução	22

1.5.4.3	Exemplos de aplicações biossensores	25
2.	Objetivo do trabalho	28
3.	Material e Métodos.....	29
3.1	Seleção <i>in silico</i> das cadeias de oligonucleótidos para a construção do genossensor	29
3.2	Reagentes e soluções	33
3.2.1	PCR/PCR em tempo real.....	33
3.2.2	Ativação CP / hidratação das probes.....	34
3.2.3	SPR.....	34
3.3	Material e equipamentos.....	34
3.3.1.1	Equipamento para PCR.....	35
3.3.1.2	Equipamento de SPR	35
3.4	Execução experimental	36
3.4.1	Extração de ADN (preparação dos extratos)	36
3.4.2	Determinação da concentração e pureza dos extratos de ADN.....	37
3.4.3	PCR qualitativa.....	37
3.4.4	Eletroforese	38
3.4.5	Construção do genossensor	38
3.4.5.1	Construção do elemento de bioreconhecimento.....	39
3.4.5.2	Hibridização do alvo com SP.....	41
3.4.5.3	Performance analítica do genossensor.....	41
3.4.6	Aplicação do genossensor em produtos de PCR (avelã)	43
3.4.6.1	Aplicação em amostras de avelã	43
3.4.6.2	Aplicação em misturas modelo de avelã em massa de trigo.....	43
3.4.7	PCR em tempo real	45
4.	Resultados e discussão	47
4.1	Avaliação da qualidade dos extratos.....	47
4.2	Otimização das condições da PCR qualitativa para Cor a 14	49
4.3	Estudos de reatividade cruzada (especificidade dos <i>primers</i>).....	50

4.4	Otimização das condições experimentais do genossensor	53
4.4.1	Otimização da concentração de CP	53
4.4.2	Otimização da concentração de espaçador lateral	54
4.4.3	Determinação dos parâmetros analíticos da curva de calibração (alvo Cor a 14 sintético).....	56
4.5	Aplicação do genossensor a amostras de avelã	58
4.5.1	Performance analítica do genossensor – amostras de avelã (<i>Corylus avellana</i>)	58
4.5.2	Efeito do tamanho da cadeia alvo (analito)	60
4.6	Aplicação do genossensor ótico (SPR) a misturas modelo de avelã em massa de trigo.....	63
4.6.1	Avaliação da performance analítica do genossensor ótico (SPR).....	63
4.6.2	Estudo do efeito da purificação de produtos de PCR.....	65
4.6.3	Validação da performance do genossensor ótico (SPR) através da PCR em tempo real Como ferramenta de validação da performance analítica do genossensor ótico (SPR) com alvo no gene da Cor a 14 da avelã, recorreu-se à metodologia de PCR em tempo real. A PCR em tempo real foi realizada com recurso a extratos de ADN das mesmas misturas modelo de avelã em massa de trigo, cada uma com uma concentração total de ADN de 50 ng μL^{-1}	66
4.7	Potencial para monitorização de alergénios alimentares	68
5.	Conclusões	71
6.	Perspetivas futuras	72
7.	Referências.....	73
Anexo I	83
Anexo II	84

Índice de tabelas

Tabela 1. Alergénios da avelã e respetiva classificação bioquímica, peso molecular e forma de exposição (informação disponibilizada em: http://www.allergen.org/).....	10
Tabela 2. Sumário das aplicações reportadas mais recentes de ELISA para a deteção/quantificação de alergénios de avelã.....	13
Tabela 3. Sumário das aplicações reportadas mais recentes de espetrometria de massa para a deteção/quantificação de alergénios de avelã.	14
Tabela 4. Sumário das aplicações reportadas mais recentes de métodos baseados em ADN para a deteção/quantificação de alergénios de avelã.	17
Tabela 5. Sumário das aplicações reportadas mais recentes de biossensores (genossensores e imunossensores) para a deteção/quantificação de alergénios de avelã.....	27
Tabela 6. Sequência genética da região alvo (template Tp/Tg), da <i>capture probe</i> (CP), da <i>signalling probe</i> (SP) e dos respetivos <i>primers</i>	32
Tabela 7. <i>Primers</i> utilizados em PCR qualitativa e/ou PCR em tempo real.	33
Tabela 8. Quantidade de reagentes utilizados para cada par de <i>primers</i> da PCR qualitativa.	37
Tabela 9. Condições de tempo/temperatura utilizadas para a PCR qualitativa dos diferentes pares de <i>primers</i>	38
Tabela 10. Etapas da montagem do elemento de biorreconhecimento e respetivas soluções utilizadas e tempo de duração.	40
Tabela 11. Etapas da análise da performance analítica, respetivas soluções utilizadas e respetivos tempos de duração.	42
Tabela 12. Variedades de avelã estudadas neste trabalho.....	43
Tabela 13. Proporções de avelã e de massa de trigo utilizadas na preparação das misturas modelo.	44
Tabela 14. Quantidade de reagentes utilizados para cada par de <i>primers</i> da PCR qualitativa.	45
Tabela 15. Quantidade de reagentes utilizados para a PCR em tempo real com EvaGreen.	45
Tabela 16. Condições de temperatura utilizadas nas amplificações por PCR em tempo real com EvaGreen.....	46
Tabela 17. Resumo das PCR qualitativas para os pares de primers 18 SRG F/R, EG F/R e Cor 14-F _{geno} /Cor 14-R (* 18SEU-F/R).....	52

Tabela 18. Parâmetros analíticos (declive, ordenada na origem, R^2 e intervalo linear) das curvas de calibração obtidas para as diferentes concentrações de CP. 54

Tabela 19. Parâmetros analíticos (declive, ordenada na origem, R^2 e intervalo linear) das curvas de calibração obtidas para as diferentes concentrações de p-ATP. 55

Tabela 20. Parâmetros analíticos (declive, declive do quadruplicado, ordenada na origem, R^2 , intervalo linear e LOD) da curva de calibração representada na Figura 21. 56

Tabela 21. Parâmetros analíticos (declive, ordenada na origem, R^2 e intervalo linear) das curvas de calibração obtidas para as diferentes variedades de avelã. 58

Tabela 22. Parâmetros analíticos (declive, ordenada na origem, R^2 e intervalo linear) das curvas de calibração representadas na **Figura 25**. 61

Tabela 23. Parâmetros analíticos (declive, declive do quadruplicado, ordenada na origem, R^2 e intervalo linear) da curva de calibração representada na Figura 27. 63

Tabela 24. Parâmetros analíticos (LOD, intervalo dinâmico de resposta linear e R^2) das curvas de calibração obtidas neste trabalho através das metodologias genossensor ótico (SPR) e PCR em tempo real. 68

Tabela 25. Intervalo dinâmico de resposta linear (massa de avelã na matriz alimentar), LOD (massa de proteína de avelã na matriz alimentar) e nível de proteção oferecido pelos métodos: Genossensor ótico e PCR em tempo real desenvolvidos neste trabalho, Imunossensor eletroquímico (Costa *et al* (2021) [95]) e Kit comercial ELISA Ridascreen® Fast Hazelnut (r-Biopharm AG, Darmstadt, Alemanha). 69

Índice de figuras

Figura 1. Mecanismo imunológico de alergias IgE específicas (imagem adaptada de C. Garino et al, (2010) [35]).	11
Figura 2. Curva de amplificação por PCR em tempo real (adaptado de Rodriguez-Lazao et al., (2013) [58]).	17
Figura 3. Esquema dos elementos que constituem um biossensor (adaptade de H.A. Alhadrami et al, (2018) [72]).	18
Figura 4. A) Representação esquemática de um equipamento de SPR; B) Gráfico de intensidade de reflexão em função do ângulo de incidência, representando duas condições diferentes da superfície aquando da aquisição de resultados.	25
Figura 5. Esquema de hibridização das cadeias de oligonucleótidos: CP, SP e Tp/Tg.	29
Figura 6. Resultado da pesquisa no NCBI para o gene que codifica a proteína alergénica Cor a 14 (nº de aceso do NCBI - FJ358504.1).	30
Figura 7. Par de <i>primers</i> selecionado através do <i>software</i> primer-BLAST.	31
Figura 8. Aplicação do Nucleotide BLAST no NCBI para avaliar a especificidade: A) do gene que codifica a proteína alergénica Cor a 14; B) a zona escolhida como alvo.	31
Figura 9. Representação esquemática da construção do elemento de bioreconhecimento pelo método de hibridização em <i>sandwich</i> .	39
Figura 10. Sensograma representativo dos passos da construção do elemento de bioreconhecimento.	40
Figura 11. Sensograma representativo dos passos de performance analítica do genossensor.	42
Figura 12. Exemplos de misturas modelo de avelã em massa de trigo utilizadas (10% de avelã em massa de trigo; 0,005% de avelã em massa de trigo).	44
Figura 13. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os <i>primers</i> EG-F/EG-R (109 pb), para extratos de espécies a serem testados na avaliação da reatividade cruzada.	48
Figura 14. Eletroforeses em gel de agarose dos produtos de PCR com os <i>primers</i> 18SRG-F/18SRG-R (113 pb), para extratos de espécies a serem testados na avaliação da reatividade cruzada.	48
Figura 15. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os <i>primers</i> 18SEU-F/18SEU-R (140 pb), para os extratos de noz e noz pecã a serem testados na avaliação da reatividade cruzada.	49

Figura 16. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Cor 14-F_{geno}/Cor 14-R para várias concentrações de extratos de avelã, a diferentes temperaturas para otimização da temperatura de amplificação. 50

Figura 17. Eletroforeses em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Cor 14-F_{geno}/Cor 14-R dos extratos das amostras de reatividade cruzada. 51

Figura 18. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Cor 14-F_{geno}/Cor 14-R dos extratos das amostras de reatividade cruzada. 51

Figura 19. A) Sensogramas obtidos para a imobilização no disco de ouro do SPR de 0,25, 0,5, 0,75 e 1,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CP, seguida da imobilização de p-ATP 1.5 mmol L^{-1} . **B)** Curvas de calibração obtidas para a imobilização no disco de ouro do SPR de 0,25, 0,5, 0,75 ou 1,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CP seguida da imobilização de p-ATP 1,5 mmol L^{-1} (num intervalo analítico de $1,00 \times 10^{-15}$ mol L^{-1} a $1,00 \times 10^{-9}$ mol L^{-1} de alvo sintético Cor a 14).53

Figura 20. A) Sensogramas obtidos para a imobilização no disco de ouro do SPR de 0,75 de CP $\mu\text{mol L}^{-1}$, seguida da imobilização de 1,0, 1,5 e 2,0 mmol L^{-1} de p-ATP. **B)** Curvas de calibração obtidas para a imobilização no disco de ouro do SPR de 0.75 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CP seguida da imobilização de p-ATP 1,0, 1,5 ou 2,0 mmol L^{-1} (num intervalo analítico de $1,00 \times 10^{-15}$ mol L^{-1} a $1,00 \times 10^{-9}$ mol L^{-1} de alvo sintético Cor a 14). 55

Figura 21. A) Sensogramas obtidos para a performance analítica do genossensor construído com 0,75 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CP e 1,5 mmol L^{-1} de p-ATP, para um intervalo de concentrações de Cor a 14 entre $1,00 \times 10^{-18}$ $\mu\text{mol L}^{-1}$ e $1,00 \times 10^{-10}$ $\mu\text{mol L}^{-1}$ e **B)** respetiva curva de calibração obtida com concentrações de alvo sintético entre [$1,00 \times 10^{-18}$ a $1,00 \times 10^{-10}$] mol L^{-1} 57

Figura 22. Curvas de calibração obtidas para as diferentes variedades de avelã, resultantes de uma imobilização de 0,75 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CP e de 1,5 mmol L^{-1} de p-ATP. 59

Figura 23. Declives das curvas de calibração obtidas para as oito variedades de avelã. Intervalo de valores obtido através da equação $m \pm \sigma m$ (m - declive; σm - desvio padrão do declive da reta). 60

Figura 24. Produtos de PCR utilizando os pares de primers Cor 14-F_{geno} e Cor 14-R (produto com 86 pb), e Cor 14-F e Cor 14-R (produto com 122 pb)..... 60

Figura 25. Curvas de calibração obtidas para os produtos de PCR com recurso a dois *primers* F diferentes Cor 14-F_{geno} e Cor 14-F, para duas variedades de avelã **A)** Santa Maria de Jesús e **B)** Gunslebert. 61

Figura 26. Declives das curvas de calibração **A)** Santa Maria de Jesús e **B)** Gunslebert. Intervalo de valores obtido através da equação $m \pm \sigma m$ (m - declive; σm – desvio padrão do declive da reta). 62

Figura 27. A) Sensogramas obtidos para a performance analítica do genossensor construído com $0,75 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CP e $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de p-ATP, para um intervalo de concentrações avelã em massa de trigo entre 0,001% e 1% **B)** Curva de calibração obtida através de um quadruplicado com concentrações de avelã em massa de trigo entre 0,001% e 1% 64

Figura 28. Exemplo de um ensaio de PCR em tempo real. Curvas de amplificação **(A)**, curva de calibração **(B)** e respetiva análise de desnaturação **(C)** de misturas modelo de avelã em massa de trigo (50-0,001%, n=3 replicados por mistura modelo) com os *primers* (Cor14-F_{geno}/R) Legenda (C): linhas verdes – misturas modelo avelã em massa de trigo; linha preta – controlo negativo. 67

Lista de Abreviaturas/Siglas

ADN – Ácido desoxirribonucleico

Ag PCR – Águas de PCR

AuSPEs – *Gold screen-printed electrodes*

Au-SPR – Sensor de SPR revertido por ouro

CN – Controlo negativo

CP – *Capture probe*

CV – Voltametria Cíclica

dNTP - Desoxirribonucleotídeos fosfatados

dsADN – Cadeia dupla de ADN

DGE – Direção-Geral da Educação

DGS – Direção-Geral da Saúde

EAACI - Academia Europeia de Alergia e Imunologia Clínica

EIS – Espectroscopia de impedância eletroquímica

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

IgE – Imunoglobulina E

IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*

LC – Cromatografia Líquida

LC-MS/MS – Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa tandem

LOD – Limite de deteção

LQ – Limite de quantificação

LPA – *Ligation-Dependent Probe Amplification*

MgAc – Acetato de magnésio

MIP – Polímero de impressão molecular

MLPA – *Multiplex ligation-dependent probe amplification*

MS – Espectrometria de massa

NaAc – Acetato de sódio

PB – Pares de bases

PCR – Reação em cadeia da polimerase

SP – *Signalling probe*

SPR – Ressonância plasmónica de superfície

ssADN – Cadeia simples de ADN

SSPE – *Saline sodium phosphate EDTA buffer*

SWV – Voltametria de onda quadrada

TE – Tris-EDTA

Tg – Porção Alvo Cor a 14 (amostra real)

Tp – Porção Alvo Cor a 14 (sintético)

TCEP-HCl – Hidrocloreto de Tris(2-carboxietil)fosfina

1. Introdução

Nas últimas décadas, as alergias alimentares representam um problema crescente de saúde pública, por serem cada vez mais comuns e afetarem, de forma transversal, todos os grupos etários [1]. Atualmente, acredita-se que até cerca de 10% da população mundial sofra de alergia a um ou mais alimentos, tendo este valor uma tendência crescente, não só nos países desenvolvidos como nas economias emergentes [2, 3]. As alergias alimentares foram reportadas como afetando 5 a 6% das crianças/adolescentes e 3 a 4% dos adultos [4]. Por norma, a prevalência das alergias alimentares em crianças tende a ser mais elevada do que nos adultos, uma vez que certas alergias alimentares diagnosticadas tendem a desaparecer na passagem para a adolescência. Estes são os casos das alergias ao leite e ovo, as quais são bastante frequentes em crianças, mas que em muitos casos tendem a desaparecer [5, 6]. No entanto, alergias alimentares ao amendoim, aos frutos de casca rija ou aos crustáceos tendem a persistir pela idade adulta, pelo que os indivíduos sensibilizados/alérgicos a estes alimentos são aconselhados a retirá-los da sua alimentação.

Com a tendência crescente da prevalência das alergias alimentares a nível mundial, a deteção de alimentos alergénicos em produtos alimentares torna-se cada vez mais importante. Por outro lado, esta tarefa é complexa e desafiante, tanto pela complexidade intrínseca de uma matriz alimentar, como pela baixa proporção na qual os alergénios se apresentam. Isto desafia as mais variadas áreas da investigação a desenvolver métodos cada vez mais sensíveis para a deteção de alergénios alimentares. Atualmente, existem dois grandes grupos de metodologias de análise de alergénios, as baseadas em deteção de proteínas (imunológicos e espectrometria de massa) e as baseadas na deteção de ADN ou RNA. Dentro destes, os biossensores têm vindo a representar uma alternativa inovadora a técnicas como os ELISA ou a PCR em tempo real. Em particular, os genossensores, pela sua elevada especificidade, são vistos como promissores e competitivos na área alimentar [7].

1.1 Alergias alimentares

Segundo a Direção-Geral da Saúde – DGS, a Direção-Geral da Educação – DGE e Academia Europeia de Alergia e Imunologia Clínica (EAACI - *European Academy of Allergy and Clinical Immunology*), a alergia alimentar é uma reação de saúde adversa, que ocorre como resposta específica do sistema imunitário e de forma reprodutível a

um dado alimento [8, 9]. Esta resposta imunológica está diretamente dependente do tipo de alergénio que lhe deu origem, podendo ser mediada por imunoglobulina E (isto é, IgE específica), mediada por anticorpos do tipo não-IgE, mediada por células, ou ainda pela combinação de diversos processos [10]. De um modo geral, as alergias alimentares são mediadas pelas IgE. A fisiopatologia da alergia alimentar envolve 2 etapas, nomeadamente a sensibilização e a elicitação. A primeira fase corresponde à sensibilização, a qual envolve a ativação das células dendríticas levando à diferenciação das células Th2 que promovem a libertação de interleucinas (IL-4, IL-5, IL-13) e posterior produção de IgE. As IgE ligam-se aos seus recetores específicos nos mastócitos que estão presentes em vários sistemas dentro do organismo humano: cutâneo, intestinal, respiratório e cardiovascular. Após reexposição ao alimento, o alergénio liga-se às IgE específicas e leva à libertação de mediadores da resposta alérgica (citoquinas, interleucinas, histamina), os quais são responsáveis pelos sintomas clínicos da reação alérgica [11].

As alergias alimentares afetam profundamente a qualidade de vida dos indivíduos sensibilizados/alérgicos, não só pelo conjunto de sintomas clínicos associados, mas principalmente por ser ainda uma doença sem cura [9]. O tratamento padrão para pacientes alérgicos passa por evitar completamente o(s) alimento(s) a que estão sensibilizados, de forma a evitarem reações alérgicas. No entanto, a total evicção dos alimentos causadores de resposta alérgica é muito difícil de conseguir, pelo que os indivíduos alérgicos com sintomas clínicos severos são aconselhados a terem consigo epinefrina injetável, que deverá ser imediatamente administrada em casos de exposição acidental [9, 12]. Esta fragilidade impõe, do ponto de vista clínico, a forte necessidade de um correto diagnóstico, de forma a possibilitar ao paciente uma manutenção informada da sua dieta. Por conseguinte, a EAACI elaborou as “*Guidelines for Food Allergy and Anaphylaxis Group*”. Estas foram criadas com o intuito de fornecer recomendações para o diagnóstico e gestão das alergias alimentares, suspeitas ou confirmadas, para pacientes de todas as idades [9]. Uma alergia alimentar é normalmente difícil de diagnosticar, pelo que o clínico/médico deve seguir um conjunto de passos, de forma a possibilitar um diagnóstico fiável. Estes passos correspondem:

- 1) À avaliação detalhada do historial médico do paciente** – começa pela definição dos alimentos que potencialmente tenham desencadeado uma resposta imunológica adversa, o tempo e cronicidade do aparecimento dos primeiros sintomas clínicos, quais os sintomas clínicos observados, a severidade da reação alérgica, a existência de potenciais fatores de risco hereditários e de doenças pré-existentes, principalmente relacionadas com

alergias (ex. asma). Esta é considerada como uma avaliação preliminar, mas que muitas vezes permite a identificação não só do alimento alergénico que despoitou a reação alérgica, mas também do seu potencial mecanismo. Após definição clara do histórico médico, o diagnóstico prossegue com recurso a testes clínicos;

2) Realização de testes clínicos de diagnóstico para alergias alimentares

– englobam duas tipologias, os testes serológicos e os testes *in vivo*:

- a. Testes *in vivo*, como o teste de picada cutânea (SPT – *skin prick test*). Este teste é geralmente utilizado na linha da frente de diagnóstico. Consiste essencialmente na colocação de uma pequena gota de extrato do alimento suspeito na pele do paciente, seguida de uma pequena picadela. A formação de uma bolha de tamanho superior ao induzido pelo controlo positivo (histamina) é indicativa de sensibilização ao alimento em questão;
- b. Testes *in vitro*, ex. os testes serológicos para determinação de IgE quantificável no soro dos indivíduos com potencial alergia alimentar. A presença de IgE sugere que os indivíduos são sensibilizados a certos alergénios, que podem ser posteriormente identificados por testes mais específicos, tais como o ImmunoCap (Phadia™);
- c. Mais recentemente, foram também propostos para diagnóstico, os testes de ativação de basófilos (BAT – *basophil activation tests*). Estas células são recolhidas dos indivíduos com suspeita de alergia alimentar, simulando-se *in vitro* uma resposta alérgica com libertação de mediadores específicos (histaminas, citocinas, interleucinas) responsáveis pelos sintomas clínicos observáveis.

3) Dieta eliminatória para propósitos de diagnóstico, onde se elimina um alimento ou um grupo de alimentos da dieta do paciente. Após um período de 2 a 4 semanas, avalia-se se a exclusão do alimento deu resultado a um alívio ou não dos sintomas sentidos;

4) Testes de provocação oral, que podem ser em formato aberto, fechado ou duplamente cego e controlado com placebo, permitem a confirmação da alergia alimentar. O paciente é exposto ao alimento a que se pensa ser alérgico, de forma controlada e em doses crescentes. A eliciação de uma reação alérgica ou não ao mesmo, é monitorizada em ambiente hospitalar, levando a um diagnóstico mais exato da existência de alergia alimentar.

Uma vez realizado o diagnóstico, a responsabilidade recai sobre o paciente alérgico. Este deve manter uma atitude preventiva e cuidadosa, abordando a sua saúde alimentar com seriedade. Isto passa essencialmente pela leitura atenta dos rótulos de produtos alimentares (especialmente os processados), com especial atenção à possibilidade de presença de ingredientes alergénicos.

1.2 Alergénios alimentares

Segundo as “*Guidelines for Food Allergy and Anaphylaxis Group*” da EAACI, alergénio é qualquer substância que induza uma resposta imunológica, seja pela produção de IgE ou por um mecanismo celular [9]. Assim, um alergénio alimentar é descrito como um componente de um alimento ou de uma matriz alimentar, que, ao ser reconhecido pelo sistema imunológico como um agressor externo, desencadeia uma resposta imunitária conhecida como reação alérgica [10].

Em termos estruturais, a classificação mais comum dos alergénios alimentares considera que são geralmente proteínas/glicoproteínas, solúveis em água. Isto, aliado ao facto de muitas vezes apresentarem atividade enzimática, facilita a sua travessia da barreira da membrana mucosa, e torna-as altamente resistentes à digestão. De forma geral, possuem pesos moleculares entre os 3 e os 160 kDa, no entanto, os alergénios mais comuns apresentam pesos moleculares entre os 20 e os 40 kDa [13]. Contudo, excepcionalmente, os alergénios alimentares podem ainda apresentar-se sob a forma de haptenos químicos, substâncias não proteicas de baixo peso molecular. Estes, apesar de não serem autossuficientes para causarem uma reação adversa, quando ligados a uma proteína transportadora adquirem potencial alergénico [14]. Atualmente, a definição de alergénio alimentar tem de ser reconsiderada, dado o número crescente de alergénios alimentares que não possuem estas propriedades físico-químicas [15, 16].

As proteínas alergénicas alimentares mais comuns podem ser de origem animal ou vegetal, desempenhando funções bioquímicas de transporte, de regulação/estrutural, de defesa ou de reserva. Os alergénios de origem vegetal são normalmente proteínas de reserva como as vicilinas, albuminas 2S (como é o caso da Cor a 14 da avelã) e leguminas, embora existam inúmeros alergénios que desempenham outras funções, tais como transporte, defesa e regulação. Os alergénios de origem animal mais comuns desempenham funções de regulação/estruturais, como são exemplo as tropomiosinas e as parvalbuminas [15, 16].

Os alergénios podem causar sensibilização por via direta (por ingestão) ou indireta (por inalação ou contato cutâneo). Os alergénios que causam sensibilização por

via direta são classificados com alergénios classe I, enquanto os alergénios por via indireta são designados por classe II. Estes últimos (alergénios classe II) causam reações alérgicas por reatividade cruzada, após o indivíduo ter sido sensibilizado por alergénios aéreos (pólen) ou contacto cutâneo [17]. No caso dos alergénios classe I, a sua ingestão pode ocorrer por consumo do alimento na sua forma crua, como acontece com as frutas e alguns vegetais, ou após processamento alimentar [14]. Ainda assim, a ingestão de alergénios alimentares nem sempre é do conhecimento do consumidor. Estes podem estar presentes como ingredientes não declarados na matriz alimentar, seja por contaminação cruzada, adulteração ou rotulagem incorreta. De forma a evitar que situações destas ocorram, foi implementada legislação com o intuito, não só de rotular corretamente os produtos alimentares, mas também de criar linhas de orientação para maximizar a segurança alimentar e correta higienização. Para que todas as regras possam ser postas em prática, é essencial que existam metodologias capazes de detetar e/ou quantificar alergénios, em porções vestigiais, em alimentos e matrizes alimentares [18, 19].

1.3 Legislação na União Europeia

A evolução tecnológica associada ao ramo alimentar despertou na sociedade uma crescente preocupação no que concerne à saúde e segurança alimentar. É neste âmbito que, em 1979, é dado por parte da Comissão Europeia o primeiro grande passo na implementação de rotulagem apropriada em produtos alimentares. A elaboração da Diretiva 79/112/EEC impulsionou a União Europeia (UE) para uma nova Era no que diz respeito à segurança alimentar e ao direito de informação do consumidor [20].

Apesar de promissora, esta primeira Diretiva ainda não impõe a rotulagem de alimentos suscetíveis de causar alergias e/ou intolerâncias. Seguindo o *Codex Alimentarius* que em 1985 recomendou a rotulagem de ingredientes potencialmente alergénicos (cereais contendo glúten, crustáceos, peixe, leite, ovos, frutos de casca rija, amendoim e sulfitos) em alimentos processados pré-embalados [21], a UE elabora em 2003 a primeira Diretiva orientada para a rotulagem de ingredientes alergénicos em produtos alimentares pré-embalados. Na Diretiva 2003/13/EC surge assim uma lista de 12 alimentos que constituem possíveis fontes de substâncias alergénicas e/ou causadoras de intolerâncias, as quais passam a ter um carácter de rotulagem obrigatório quando presentes. Nesta lista encontram-se [22]:

- 1) Cereais que contêm glúten (trigo, centeio, cevada, aveia, espelta, *kamut* ou as suas estirpes hibridizadas, e produtos à base de cereais)

- 2) Crustáceos e produtos à base de crustáceos;
- 3) Ovos e produtos à base de ovos;
- 4) Peixes e produtos à base de peixe;
- 5) Amendoins e produtos à base de amendoins;
- 6) Soja e produtos à base de soja;
- 7) Leite e produtos à base de leite (incluindo lactose);
- 8) Frutos de casca rijã (amêndoas, avelãs, nozes, castanhas de caju, nozes pecã, castanhas do Brasil, pistáchios, nozes macadâmia e do Queensland) e produtos à base de frutos de casca rijã;
- 9) Aipo e produtos à base de aipo;
- 10) Mostarda e produtos à base de mostarda;
- 11) Sementes de sésamo e produtos à base de sementes de sésamo;
- 12) Dióxido de enxofre e sulfitos em concentrações superiores a 10 mol kg⁻¹ ou 10 mg L⁻¹ expressos em SO₂.

Esta lista não prevê qualquer tipo de exceções, nem mesmo para produtos alimentares altamente processados, tais como iogurtes. Em 2005, é publicada a Diretiva 2005/26/EC, que de forma provisória implementa um conjunto de exceções à rotulagem de alergénios [23]. Lista que dois anos mais tarde, na Diretiva 2007/68/EC se tornou efetiva [24]. No entanto, em 2006, surge a Diretiva 2006/142/EC onde dois novos ingredientes são adicionados à lista prioritária de alimentos potencialmente alergénicos:

- 13) Tremoço e produtos à base de tremoço;
- 14) Moluscos e produtos à base de moluscos.

Assim, e até aos dias de hoje, a rotulagem destes catorze ingredientes e produtos à base dos mesmos, permanece de caráter obrigatório [25].

Finalmente, em 2011, fruto de várias revogações e alterações da Diretiva 79/112/EEC, é publicado o Regulamento (EU) N^o 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de outubro de 2011. Este regulamento explicita claramente “os princípios e normas gerais da legislação alimentar” e “estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios”. Sendo um dos princípios gerais da legislação alimentar: “fornecer aos consumidores uma base para que façam escolhas informadas em relação aos géneros alimentícios que consomem e para prevenir todas as práticas que possam induzir o consumidor em erro”. Particularmente, no artigo 21^o do Regulamento (EU) N^o 1169/2011 são salientadas as diretrizes para a rotulagem de substâncias ou produtos que provocam alergias ou intolerâncias, estabelecidos em Diretivas anteriores. Estas passam pela indicação clara do nome do alimento alergénico na lista de ingredientes, devidamente realçado dos restantes ingredientes. E no caso

particular de carência de uma lista de ingredientes, o produto deve incluir o termo “contém” seguido do nome do alimento alergénico ou substância [26].

Este conjunto de regras tem por objetivo proteger, não só o consumidor final, mas também toda a indústria alimentar, projetando sempre uma política de melhoria contínua e revisão periódica do Regulamento [19]. Neste sentido, a indústria alimentar acabou por adotar a rotulagem de precaução com a inclusão da designação “pode conter...” nos rótulos dos alimentos processados, ajudando a proteger a indústria alimentar de potenciais ações legais por parte de consumidores alérgicos. No entanto, estas medidas de precaução excessiva acabam por prejudicar e dificultar as escolhas alimentares dos consumidores sensibilizados/alérgicos na altura de escolher alimentos processados pré-embalados.

1.4 Frutos de casca rija - Avelã

Do ponto de vista botânico, um fruto de casca rija é composto por uma casca dura e seca que protege uma semente ou embrião. No entanto, esta definição nem sempre vai ao encontro do que habitualmente é aceite como um fruto de casca rija, isto é, uma semente comestível proveniente de árvores [27]. Assim sendo, e segundo a legislação europeia, são considerados frutos de casca rija: as amêndoas, **as avelãs**, as nozes, as castanhas de caju, as nozes pecã, as castanhas do Brasil, os pistáquios, as nozes macadâmia e as nozes do Queensland [22]. Este grupo de alimentos é abundantemente consumido à escala mundial. O seu agradável sabor, aliado aos múltiplos benefícios para a saúde, tornam os frutos de casca rija em ingredientes chave na dieta do cidadão comum. Podem ser consumidos nos mais variados formatos, desde crus, a torrados, ou mesmo processados, como ingrediente de uma matriz alimentar (ex: bolos, bolachas, chocolate, café com sabor, cereais, óleos...) [1, 27, 28].

A avelã (*Corylus avellana*) é classificada como um fruto de casca rija, pertencendo à família Betulaceae e ao género *Corylus*. Tal como os vários frutos de casca rija, esta é altamente apreciada devido ao seu sabor e aroma, assim como pelos seus múltiplos benefícios para a saúde, nomeadamente a cardiovascular. Nos últimos anos e com a crescente procura por alimentos saudáveis, a sua procura no mercado tem vindo a crescer, consequentemente provocando um aumento da produção e consumo de avelã, particularmente em países desenvolvidos. Contudo, a avelã também representa uma fonte significativa de alergénios e a sua ingestão pode induzir reações com sintomas que variam de leves a fatais [29].

1.4.1 Prevalência

Num estudo envolvendo vários países europeus, bem como os EUA e a Austrália, Burney *et al* (2010) reportaram a sensibilização à avelã como uma das mais prevalentes mundialmente, dentro dos inúmeros alimentos estudados, com valores a rondar os 7,2%, estando a alergia à avelã relacionada com a alergia ao pólen das betuláceas. A prevalência da sensibilização à avelã baixa substancialmente quando são excluídos os pacientes com polinoses (3,1%). O estudo refere ainda que a sensibilização à avelã é especialmente significativa em determinados países europeus, como a Alemanha (14,7%), a Noruega (12,8%), a Suíça (12,6%) e a Suécia (11,8%), todos com valores acima da média geral [30]. Neste sentido foi realizado um novo estudo onde, entre outras, a prevalência da sensibilização à avelã foi estimada com um valor de 9,3% a nível europeu, superior em 2,1% relativamente à média mundial [31]. Este conjunto de dados evidencia ainda a proeminência da incidência deste tipo de alergia em países desenvolvidos.

1.4.2 Proteínas alergénicas da avelã

Atualmente, são conhecidas doze proteínas alergénicas provenientes da avelã: Cor a 1, Cor a 2, Cor a 6, Cor a 8, Cor a 9, Cor a 10, Cor a 11, Cor a 12, Cor a 13, Cor a 14, Cor a 15 e Cor a TLP. Excetuando a Cor a TLP, todas estão incluídas na lista oficial de alergénios da “*International Union of Immunological Societies/World Health Organization*” (<http://www.allergen.org/>) (**Tabela 1**) [1, 29, 32].

A Cor a 1 e Cor a TLP são proteínas pertencentes à classe PR (*pathogenesis-related*), PR-10 e PR-5 respetivamente. São proteínas de baixo peso molecular, com elevada estabilidade a baixo pH e alguma resistência à proteólise. Estas características tornam-nas boas candidatas para a indução de respostas imunológicas adversas em indivíduos sensibilizados. As proteínas PR-10 estão envolvidas em mecanismos de defesa em respostas de estímulo a stress biótico. Já as PR-5 desempenham essencialmente funções de defesa (atividade antifúngica). São normalmente classificadas como alergénios de classe II, sendo que a sua sensibilização resulta da exposição cutânea ou respiratória através do pólen [29, 33];

A Cor a 2 pertence à classe das profilinas. Estas intervêm ativamente em processos associados com a motilidade celular, e como tal, participam em muitos processos celulares essenciais. Esta classe de proteínas apresenta elevada homologia entre si, sendo muitas vezes responsáveis por fenómenos de reatividade cruzada entre alergénios aéreos e alimentares. Tal como as PR (Cor a 1 e Cor a TLP) constitui um alergénio de classe II [29, 32].

A Cor a 6 pertence à classe das isoflavonas reductases. São proteínas cujo peso molecular se encontra geralmente nos 35 kDa, e exercem essencialmente funções biológicas de defesa [32].

A Cor a 8 pertence à classe das proteínas não específicas de transporte de lípidos (nsLTP), fazendo parte da superfamília das prolaminas. Esta apresenta uma estrutura monomérica de baixo peso molecular, com sequências primárias ricas em resíduos de cisteína. As suas principais funções biológicas passam pelo transporte de diferentes classes de lípidos através de membranas celulares. No entanto, também podem exercer funções de defesa ou potencial envolvimento no crescimento e desenvolvimento da planta. São altamente resistentes a elevadas temperaturas (até 170 °C), a condições extremas de pH e à atividade enzimática, tendo as características ideais para ser classificado como um alergénio de classe I [29, 32, 34].

A Cor a 9 pertence à classe das leguminas (também designadas por globulinas 11S). Estas são proteínas funcionais multiméricas, existindo como mistura de trímeros e hexâmeros ligados entre si por interações não covalentes. São proteínas não glicosiladas, sendo a sua principal função biológica atuarem como proteínas de reserva [29, 32].

A Cor a 10 é classificada como proteína de ligação luminal, ou “*Heat shock protein*” 70. É descrita como uma proteína ligada ao stress biótico e abiótico, com capacidade de se ligar a outros péptidos e assim auxiliar eventos de dobragem conformacional de proteínas [29, 32].

A Cor a 11 pertence à classe das vicilinas (ou globulinas 7S). As vicilinas são proteínas triméricas, consideradas importantes proteínas de reserva, desempenhando funções biológicas de regulação/estrutura (dador de nitrogénio durante a germinação de sementes) e de defesa (atividade antifúngica) [29, 32].

A Cor a 12, a Cor a 13 e a Cor a 15 são classificadas como oleosinas de baixo peso molecular. São essencialmente constituídas por três domínios: um domínio central hidrofóbico e dois domínios com maior afinidade hidrofílica. As suas funções biológicas passam principalmente pela estabilização de corpos lipídicos por meio da prevenção da sua coalescência durante a dessecação das sementes [29, 32].

A Cor a 14 é uma albumina 2S, fazendo parte do principal grupo de proteínas de reserva em sementes de plantas dicotiledóneas. As albuminas 2S são pequenas proteínas globulares, solúveis em água com baixas concentrações de sais, com um elevado conteúdo em resíduos arginina, glutamina, asparagina e cisteína [29]. Estruturalmente, esta proteína é um hétero-dímero constituído por duas subunidades (com pesos moleculares de 8-10 kDa e 3-4 kDa) ligadas entre si através de ligações

dissulfureto. Para além disso, apresenta um elevado número de hélices- α na sua estrutura. A sua conformação 3D compacta, faz das albuminas 2S, proteínas com elevada estabilidade ao processamento alimentar e elevada resistência à digestão gastrointestinal. Estas proteínas têm a capacidade de atravessar o lúmen intestinal na sua forma IgE reativa, e de dar origem a uma resposta imunitária em indivíduos sensibilizados. Tal como a Cor a 8, é considerado um alergénio de classe I. Todo este conjunto de propriedades físico-químicas faz da Cor a 14 uma proteína alergénica com elevado interesse clínico, tornando-a também num alvo apelativo para a identificação de alergénios da avelã em produtos alimentares [35, 36].

Tabela 1. Alergénios da avelã e respetiva classificação bioquímica, peso molecular e forma de exposição (informação disponibilizada em: <http://www.allergen.org/>).

Alergénio	Classificação bioquímica	Peso molecular (kDa)	Exposição ao alergénio
Cor a 1	Proteína relacionada com a patogénese (PR-10), membro da família Bet v1	17	Vias respiratórias
Cor a 2	Profilina	14	Alimentos
Cor a 6	Homóloga da isoflavona redutase	35	Vias respiratórias
Cor a 8	Proteína não específica de transporte de lípidos do tipo 1 (nsLTP)	9	Alimentos
Cor a 9	Globulina 11S de armazenamento em sementes (legumina)	40	Alimentos
Cor a 10	Proteína de ligação luminal	70	Vias respiratórias
Cor a 11	Globulina 7S de armazenamento em sementes (vicilina)	48	Alimentos
Cor a 12	Oleosina	17	Alimentos
Cor a 13	Oleosina	14-16	Alimentos
Cor a 14	Albumina 2S	10	Alimentos
Cor a 15	Oleosina	17	Alimentos
Cor a TLP	Sem informação	Sem informação	Sem informação

1.4.3 Sintomatologia

Tal como a maioria das alergias alimentares, a alergia à avelã também é mediada pelas IgE [37]. A sensibilização à avelã pode ocorrer por duas vias. A via direta ocorre por exposição gastrointestinal, levando à produção de IgE diretamente com alvo nos alergénios da avelã, resultando em reações alérgicas moderadas a severas em reexposições subsequentes. A via indireta ocorre por exposição prévia a alergénios homólogos aéreos ou cutâneos, os quais levam à produção de IgE em proteínas homologas. Mais tarde, quando o indivíduo alérgico ingere avelã, as IgE reconhecem as

estruturas homólogas (epítomos reativos), ligam-se aos alergénios da avelã e desencadeiam uma resposta alérgica, normalmente leve (limitada ao síndrome de alergia oral) a moderada Figura 1.

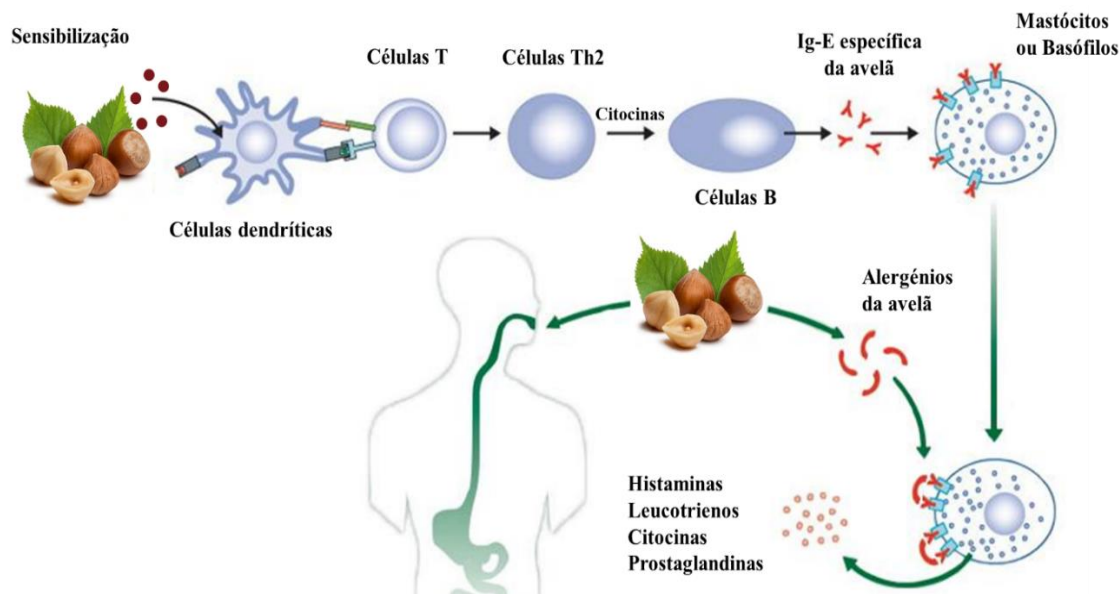


Figura 1. Mecanismo imunológico de alergias IgE específicas (imagem adaptada de C. Garino et al, (2010) [35]).

Os sintomas de alergia à avelã podem surgir afetando diversos sistemas de órgãos, no entanto, as reações mediadas por IgE manifestam-se geralmente na pele (urticária, angioedemas e inchaços acentuados), no trato respiratório (espirros, tosse, congestão nasal e dificuldade respiratória) e no sistema gastrointestinal (diarreia, vómitos, cólicas). A severidade destes sintomas pode variar de leves a fatais (choque anafilático) [29].

1.5 Metodologias para a deteção de alergénios da avelã

Muitas vezes, os alergénios alimentares estão presentes em quantidades vestigiais ou mascarados pela matriz alimentar, o que dificulta a sua deteção. Isto desafia as mais diversas áreas científicas a desenvolver métodos cada vez mais sensíveis e capazes de detetar/quantificar quantidades vestigiais de alergénios em produtos alimentares. Atualmente, existem dois grandes grupos de metodologias analíticas para a deteção/quantificação de alergénios alimentares: métodos baseados em deteção de proteínas (ELISA, imunossensores e plataformas de espetrometria de

massa) e métodos baseados em deteção de ADN (métodos baseados em PCR - reação em cadeia da polimerase e genossensores) [7].

1.5.1 ELISA

ELISA (“*Enzyme linked immunosorbent assay*”) é um dos métodos proteicos mais empregue, aproveitando-se da especificidade da ligação anticorpo-antigénio para o imunorreconhecimento e conseqüente deteção de um determinado anticorpo ou antigénio de interesse. É reconhecida pelos baixos limites de deteção e quantificação, todavia, estes valores estão intrinsecamente dependentes de fatores como a matriz, o processamento alimentar e o tipo de ELISA utilizado (direta, indireta, competitiva ou *sandwich*) [28]. Os métodos ELISA são provavelmente os métodos analíticos mais utilizados para a deteção/quantificação de alergénios alimentares. São métodos de implementação relativamente simples, rápida e sem requerer pessoal ou equipamento muito especializado. Atualmente, existem vários ELISA sob a forma de kits comerciais, o que os torna métodos muito utilizados pela indústria alimentar para o controlo da presença de alergénios.

Por ser um método tão bem estabelecido, constam já na literatura diversos estudos focados na utilização de ELISA para a deteção e quantificação de alergénios da avelã nas mais variadas matrizes alimentares. Em estudos mais recentes, foram já reportados casos de aplicação de ELISA *sandwich*, ELISA competitiva indireta e kits comerciais de ELISA. Na Tabela 2 encontram-se brevemente descritas as mais recentes aplicações de ELISA para a deteção e/ou quantificação de alergénios de avelã, salientando o formato de ELISA utilizado, a matriz em que foi aplicado, a(s) proteína(s) alvo, e quando possível, a discriminação do limite de deteção (LOD) e limite de quantificação (LQ). O kit ELISA Ridascreen® Fast Hazelnut (r-Biopharm AG, Darmstadt, Alemanha) é um exemplo desses kits, permitindo um intervalo de resposta linear de 2,5-20 mg/kg de avelã em matriz e LOD de 0,19 mg kg⁻¹. Além dos kits comerciais, existem também vários métodos ELISA publicados que permitem a deteção/quantificação de avelã com desempenho semelhante aos kits comerciais. Como exemplo, Costa *et al* (2015) desenvolveu um ELISA em formato *sandwich* com recurso a um anticorpo policlonal com alvo nas proteínas de avelã e um anticorpo monoclonal com alvo no alergénio Cor a 9. O sistema ELISA permitiu a deteção de 1 mg kg⁻¹ de avelã em chocolate de leite [38, 39]. Outros exemplos de ELISA para deteção de alergénios de avelã foram reunidos num artigo de revisão recentemente publicado, podendo ser consultados em Holzhauser *et al* [40].

Tabela 2. Sumário das aplicações reportadas mais recentes de ELISA para a deteção/quantificação de alergénios de avelã.

Matriz alimentar	Proteína alvo	Técnica	LOD	LQ	Ref	
Chocolates	Proteínas da avelã	Elisa <i>Sandwich</i>	1 mg kg ⁻¹	50 mg kg ⁻¹	[38]	
Chocolate	Cor a 9	Elisa <i>Sandwich</i>	1 mg kg ⁻¹	50 mg kg ⁻¹	[39]	
Bolachas	Cor a 9	Elisa <i>Sandwich</i>	0,1 mol kg ⁻¹	-	[41]	
Bolachas	Proteínas marcadoras da avelã	Elisa Competitiva Indireta	1,36 µg mL ^{-1 a}	4,08 µg mL ^{-1 a}	[42]	
Chocolates, muffins e papas de aveia	Proteínas marcadoras da avelã	Elisa em kit comercial	Veratox® for Hazelnut Allergen	-	[1/6/1,4] mg kg ^{-1 b}	[43]
			RidaScreen® Fast Hazelnut	-	[1/2/2] mol kg ^{-1 b}	
			ELISA Systems Hazelnut	-	[8/38/6] mg kg ^{-1 b}	
Farinhas e pão	Proteínas marcadoras da avelã	Elisa em Kit comercial	RidaScreen® Fast Hazelnut	-	-	[44]
			Hazelnut Residue			
Pastas de frutos secos	Proteínas marcadoras da avelã	Elisa em Kit Comercial (RidaScreen® Fast Hazelnut)	-	1 mg kg ⁻¹	[45]	
Avelãs torradas e bolachas	Proteínas marcadoras da avelã	Elisa em Kit Comercial (RidaScreen® Fast Hazelnut)	0,19 mol kg ⁻¹	-	[46]	

^a µg de proteína por mL de solução 5 mM de ureia em tampão fosfato; ^b valores para as matrizes [Chocolates/*muffins*/papas de aveia], respetivamente.

1.5.2 Espectrometria de Massa

Nos últimos anos, os grandes avanços tecnológicos associados à metodologia de espectrometria de massa (*mass spectrometry* - MS) têm permitido um enorme progresso no campo da proteómica, particularmente na identificação e caracterização de alergénios alimentares [47]. Esta é reconhecida pela elevada sensibilidade e especificidade, para além disso, é independente da interação biológica anticorpo-antigénio, o que promove a especificidade e evita fenómenos de reatividade cruzada [7].

A espectrometria de massa tem por base a separação de iões em fase gasosa de acordo com a sua relação massa/carga (*m/z*). Para a análise de proteínas e péptidos, é frequentemente acoplada a cromatografia líquida (LC) ou cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) [40]. Como exemplo, Heick *et al* (2011) [44] desenvolveu um sistema de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa tandem (LC-MS/MS) para a deteção de sete alimentos alergénicos em farinha e pão. Entre eles, a avelã, a partir da deteção de quatro estruturas peptídicas da proteína alergénica 11S globulina. Este sistema permitiu assim a deteção de 5 mol kg⁻¹ de avelã em farinha e pão.

Outros exemplos de espetrometria de massa para deteção de alergénios de avelã foram também reunidos no artigo de revisão mencionado na secção 1.5.1, podendo ser consultados em Holzhauser *et al* [40]. Estes encontram-se brevemente descritos na Tabela 3, salientando a matriz em que foram aplicadas as metodologias, a(s) proteína(s) alvo do estudo, a técnica utilizada, e quando possível, a discriminação do LOD.

Tabela 3. Sumário das aplicações reportadas mais recentes de espetrometria de massa para a deteção/quantificação de alergénios de avelã.

Matriz alimentar	Proteína alvo	Técnica	LOD	Ref
Chocolates	Cor a 8, Cor a 9, Cor a 11 (1/4/3 péptidos, respetivamente)	LC-MS/MS	1 mol kg ⁻¹	[38]
Pão e farinhas	Globulina 11S (4 péptidos)	LC-MS/MS	5 mol kg ⁻¹	[44]
Biscoitos e Chocolate	Cor a 9 (péptidos)	LC-MS	1,3 ou 14 mol kg ⁻¹ (respetivamente biscoitos e chocolate)	[48]
Pão	Globulina 11S (4 péptidos)	LC-MS/MS	5 mol kg ⁻¹	[49]
Biscoitos, bolachas, bolos e farinhas	Globulina 11S, proteínas de armazenamento (2/2 péptidos, respetivamente)	LC-MS/MS	1 mol kg ⁻¹	[50]
Biscoitos e cereais de pequeno-almoço	Cor a 9 (2 péptidos)	LC-ESI-LIT-MS2 LC-ESI-LIT-MS3	30 ou 35 mol kg ⁻¹ , respetivamente utilizando MS ² e MS ³	[51]
Não reportado	Cor a 8, Cor a 9, Cor a 11 (1/4/3 péptidos, respetivamente)	LC-MS/MS	Não reportado	[52]
Matriz de trigo e glucose	Cor a 14, Cor a 11, Cor a 9 (2/16/15 péptidos, respetivamente)	MALDI-TOF/MS MS/MS	Não reportado	[53]

1.5.3 PCR em tempo real

Os métodos baseados na análise de ADN têm sido considerados como excelentes alternativas para a deteção/quantificação da maioria dos alimentos alergénicos. Estes apresentam inúmeras vantagens, tais como: rápida execução (semelhante ao ELISA), relativo baixo custo e com elevada aplicabilidade a matrizes alimentares muito processadas. Os métodos baseados no ADN não detetam a proteína de forma direta, mas sim o gene que a codifica ou um gene marcador de espécie. Para a deteção/quantificação de alimentos alergénicos por análise de ADN, os métodos mais comuns são os baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) [7, 40, 54].

A PCR é uma técnica bioquímica para a amplificação *in vitro* de cópias de ADN [55, 56]. Esta é realizada com recurso a uma mistura reacional habitualmente composta por: água ultrapura (livre de DNases e RNases), um par de *primers* - pequenas cadeias

de oligonucleótidos (15-25 bases nitrogenadas) complementares às extremidades 3' das cadeias alvo de ssADN; nucleótidos contendo as distintas bases nitrogenadas (adenina - ATP, timina - TTP, guanina - GTP e citosina - CTP) essenciais para a construção das novas cadeias (dNTP); uma enzima Taq polimerase e o seu cofator (Mg^{2+}), responsáveis pela extensão da nova cadeia de ADN; uma solução tampão que permita estabelecer as condições ótimas para a atividade enzimática; e o ADN alvo [57, 58]. Esta mistura reacional, é levada a um termociclador onde o ADN vai ser exposto a um conjunto de rampas de temperatura, promovendo a amplificação dos produtos de PCR que consistem em cópias do ADN original. A PCR é assim dividida nos seguintes passos:

- 1) **Desnaturação** – neste primeiro passo, as cadeias de ADN são levadas a temperaturas entre os 95-98 °C. Estas temperaturas elevadas promovem a quebra das pontes de hidrogénio entre bases nitrogenadas, e consequentemente levam à total abertura das cadeias duplas de ADN (dsADN).
- 2) **Hibridização dos primers** – terminada a desnaturação, a temperatura baixa para valores habitualmente entre 55-65 °C, para que se processe a hibridização dos *primers* com as extremidades 3' das correspondentes cadeias simples de ADN (ssADN). A temperatura deste passo é ditada pela temperatura de hibridização dos *primers*, sendo habitualmente um valor médio das temperaturas de hibridização (T_a) do par de *primers*.
- 3) **Extensão** - uma vez ligados os *primers*, volta-se a elevar a temperatura, geralmente para os 72 °C, para que se dê o terceiro e último passo da amplificação. Esta é considerada a temperatura ótima da atividade enzimática da Taq polimerase, que consiste numa leitura do *template* no sentido 3'→5' com adição dos dNTP no sentido 5'→3' e criando as cadeias complementares do fragmento alvo.

No fim de um ciclo de PCR, cada cadeia dsADN terá dado origem a duas novas cadeias dsADN. Assim sendo, a repetição deste ciclo induz um crescimento exponencial da quantidade de ADN alvo. É de realçar que, uma vez que a mistura reacional tem reagentes consumíveis como os dNTP, o ciclo de PCR só pode ser repetido um número limitado de vezes, geralmente entre 25-40 vezes no caso da PCR qualitativa [58, 59]. Além disso, acima dos 40 ciclos de amplificação, a PCR tende a ser menos específica, uma vez que a enzima tem tendência a cometer erros acima deste limite.

A PCR em tempo real surge como uma técnica promissora para a deteção e quantificação de alimentos alergénicos. Esta baseia-se na aquisição de um sinal de

fluorescência no decorrer dos ciclos da PCR, permitindo a construção de curvas de calibração [58]. Esta aquisição do sinal de fluorescência pode ser realizada de duas formas: através do uso de corantes de fluorescência ou através de sondas específicas de hidrólise ou de hibridização [60]. As sondas de hidrólise consistem em pequenas cadeias de oligonucleótidos complementares ao fragmento a amplificar, atuando como um terceiro *primer*, ligadas a um fluoróforo e a um *quencher*. No decorrer do processo de amplificação, a hibridização da sonda separa fisicamente o fluoróforo do *quencher*, gerando um sinal de fluorescência. No caso da utilização dos corantes de fluorescência, estes intercalam-se com as cadeias duplas de ADN potencializando a emissão de fluorescência [61]. Ao longo dos anos, vários corantes têm vindo a ser utilizados, como é exemplo o SYBR Green, reconhecido como o corante universal mais utilizado. Com o progresso da técnica, surgem novos corantes, com vantagens como a elevada sensibilidade a variações durante a desnaturação, refletidas nas diferentes formas obtidas para as curvas de desnaturação, como é o corante de nova geração EvaGreen [62].

À medida que a reação avança, a quantidade de ADN aumenta e o sinal aumenta de forma proporcional, permitindo a quantificação do produto formado. Estabelecendo a correlação entre o número de ciclos e o sinal de fluorescência é obtida a chamada de curva de amplificação (Figura 2). Cada curva de amplificação pode ser dividida em três fases [58]:

- 1) **Fase de iniciação** – ocorre durante os primeiros ciclos da PCR em que a emissão de fluorescência não consegue ser distinguida da linha de base;
- 2) **Fase exponencial** – há um aumento exponencial na fluorescência, sendo nesta fase que a quantificação é possível;
- 3) **Fase “plateau”** – dá-se o esgotamento dos reagentes, não se observando nenhum aumento no sinal de fluorescência.

Uma vez estabelecida a curva de amplificação, esta é utilizada para calcular o valor do ciclo de quantificação (C_q), determinado pela interceção da curva de amplificação com um valor limite previamente estabelecido (*threshold*). Este valor é inversamente proporcional ao logaritmo da quantidade inicial de ADN alvo. Para que possa ser realizada a quantificação de uma amostra, é necessária a construção de uma curva de calibração, neste caso constituída pelos valores de C_q obtidos para diversos padrões/diluições em função do logaritmo da concentração do alvo [61, 63].

No caso do uso de corantes universais, os produtos de amplificação devem ser submetidos a uma análise de desnaturação de forma a confirmar a identidade dos produtos de PCR formados. Com recurso às respetivas curvas de desnaturação, pode

ser efetuada a confirmação da identidade dos produtos resultantes, sendo que cada produto tem um valor característico de temperatura de desnaturação (T_m) (temperatura à qual 50% das cadeias se encontram no formato de dupla hélice e os restantes 50% se encontram na forma de cadeia aberta) [61].

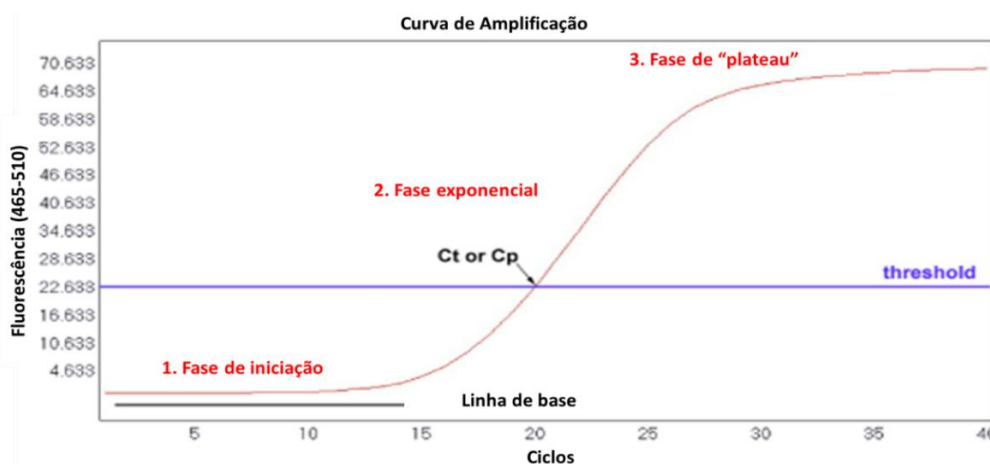


Figura 2. Curva de amplificação por PCR em tempo real (adaptado de Rodriguez-Lazao *et al.*, (2013) [58]).

A PCR em tempo real é das técnicas mais usadas, embora outras tenham também ampla aplicação, nomeadamente a PCR em tempo real acoplada a *nested* em reação única (*single-tube nested real-time PCR*) e amplificação dependente da ligação de sonda (LPA - *ligation-dependent probe amplification*). Costa *et al* (2015) desenvolveu uma PCR em tempo real, com alvo no gene que codifica a proteína *hsp1*. O sistema permitiu a quantificação de 0,005% (50 mg/kg) de avelã em chocolate [64]. Na Tabela 4 estão representados outros exemplos de metodologias baseadas em PCR para a detecção e quantificação da avelã como alimento alergénico (maioritariamente reunidos no artigo de revisão mencionado na secção 1.5.1, Holzhauser *et al* [40]).

Tabela 4. Sumário das aplicações reportadas mais recentes de métodos baseados em ADN para a deteção/quantificação de alergénios de avelã.

Matriz alimentar	Gene alvo	Técnica	LOD	Ref
Biscoitos	ADN <i>barcoding region trnL</i>	PCR em tempo real com análise por HRM (<i>High resolution melting analysis</i>)	0,01%	[65]
Chocolates e cereais de pequeno-almoço	HSP1 (heat shock protein)	PCR em tempo real acoplada a <i>nested</i> em tubo único	0,5 pg ; 50 mol kg ⁻¹	[66]
Não reportado	Cor a 1	MLPA (<i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i>)	1,4 ng	[67]
Chocolates e bolachas noz dopadas com frutos de casca rija	Cor a 1	LPA (<i>line probe assay</i>)	5 mol kg ⁻¹ (chocolate) 100 mol kg ⁻¹ (bolachas de noz)	[68]
Chocolates	HSP1 (heat shock protein)	PCR em tempo real	0,005%	[64]

1.5.4 Biossensores

De acordo com a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), “um biossensor é um dispositivo capaz de fornecer informações analíticas quantitativas ou semiquantitativas específicas, utilizando um elemento de reconhecimento (recetor) que está em contacto direto com um elemento transdutor” [69]. Assim sendo, os biossensores são dispositivos analíticos utilizados para a deteção de diversos alvos biológicos. Os biossensores são usualmente constituídos por três elementos: elemento de biorechecimento - que irá reconhecer o analito, o transdutor - que irá converter o evento de reconhecimento biológico num sinal químico ou físico mensurável, e um sistema de processamento de sinal que permita armazenar, exibir e analisar os sinais de saída (Figura 3) [54, 70, 71]. Estes métodos são considerados promissores, pela sua simplicidade, rapidez, reprodutibilidade e baixo custo, mostrando-se assim como uma oferta de excelência no mercado, em particular, na deteção de alergénios alimentares [7]. Estes dispositivos podem ser categorizados quanto ao seu tipo de transdução ou quanto ao seu elemento de biorechecimento [72].

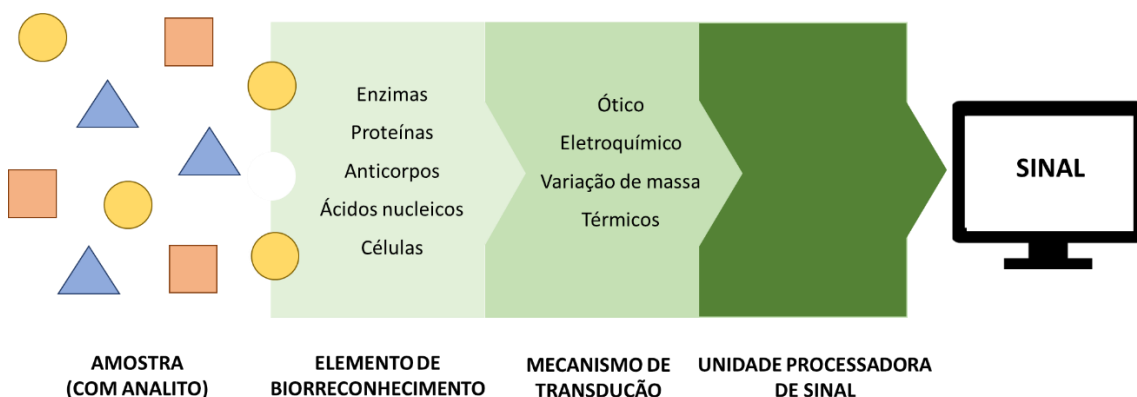


Figura 3. Esquema dos elementos que constituem um biossensor (adaptade de H.A. Alhadrami *et al*, (2018) [72]).

1.5.4.1 Elementos de biorechecimento

O elemento de biorechecimento, ou biorecetor, é o componente responsável pela identificação seletiva de uma determinada espécie alvo. É assim o elemento determinante para a seletividade do biossensor, definida como a capacidade que o dispositivo tem de gerar resultados apenas resultantes das interações específicas entre o elemento de biorechecimento e o analito, sem interferência de outras espécies [73]. O reconhecimento da espécie alvo pode ser realizado através de dois processos: interações biocatalíticas ou por bioafinidade. O primeiro sistema baseia-se nos produtos gerados na atividade catalítica de determinadas biomoléculas para intermediar a

deteção, o segundo sistema reconhece as interações específicas que ocorrem entre o analito e o elemento de bioreconhecimento [74]. É importante salientar que o bioreceptor pode ter origem natural ou uma origem sintética, dependendo usualmente do analito em estudo. Os elementos de origem natural tiram benefício em se basear nas interações fisiológicas, que ocorrem naturalmente no seu meio, para atingir a especificidade com o analito. Por outro lado, os elementos de origem sintética são estruturas artificialmente desenvolvidas com o objetivo de mimetizar essas mesmas interações fisiológicas.

1.5.4.1.1 Imunossensores

Imunossensores são biossensores baseados no reconhecimento da interação específica anticorpo-antígeno (Ac-Ag) para o bioreconhecimento de uma determinada espécie. Tanto o anticorpo como o antígeno podem ser imobilizados na superfície transdutora, para detetar um antígeno ou um anticorpo respetivamente. Devido à elevada especificidade da ligação Ac-Ag, os imunossensores apresentam uma elevada seletividade e sensibilidade, sendo assim dispositivos com propriedades atrativas para determinadas aplicações, inclusive na deteção de alergénios alimentares [75].

1.5.4.1.2 Genossensores

Genossensores são biossensores cujo elemento de bioreconhecimento consiste numa sequência de oligonucleótidos (ADN ou RNA), geralmente designada por sonda de captura ou *capture probe* (CP), complementar à sequência alvo. O bioreconhecimento ocorre através de uma reação de hibridização entre as duas cadeias [70].

O ADN é uma molécula bastante abundante e estável a elevadas temperaturas, como aquelas utilizadas aquando do processamento alimentar, o que faz deste um marcador biológico de eleição para a deteção/quantificação de alergénios alimentares. Para além disso, a molécula de ADN é altamente específica, sendo este um fator determinante para um biossensor. Assim, os genossensores são ofertas promissoras pela sua elevada especificidade/seletividade, e pela sua presença na matriz alimentar, independente do processamento alimentar [7, 70].

1.5.4.1.2.1 Imobilização de ADN

O processo de imobilização do bioreceptor é fundamental para construir com sucesso um genossensor com elevada eficiência e especificidade. O processo de imobilização deverá ocorrer de modo a garantir uma boa orientação e uma elevada biodisponibilidade das cadeias de ADN, para que a sua hibridização com o alvo seja

favorecida (minimização dos impedimentos estereoquímicos). Os processos mais utilizados para a imobilização de ADN em superfícies transdutoras são [74, 76, 77]:

- 1) **Adsorção** – a técnica mais simples, uma vez que não requer qualquer tipo de funcionalização/modificação do elemento de bioreconhecimento. A *capture probe* é imobilizada por adsorção eletrostática entre o grupo fosfato carregado negativamente, e a superfície do transdutor modificada com filmes carregados positivamente;
- 2) **Imobilização com recurso a complexação avidina/estreptavidina-biotina** – nesta técnica, a *capture probe* é funcionalizada numa das extremidades (3' ou 5') com uma molécula de biotina e o transdutor é modificado com avidina/estreptavidina. Quando postos em contacto, dá-se a formação do complexo avidina/estreptavidina-biotina, que viabiliza a ligação não covalente entre a *capture probe* e o transdutor, geralmente de ouro ou de carbono;
- 3) **Imobilização por ligação covalente** – nesta técnica, a *capture probe* é geralmente funcionalizada numa das extremidades (3' ou 5') com um grupo tiol (S-H) ou amina (NH₂). Este grupo funcional viabiliza a ligação covalente da sonda diretamente à superfície metálica do transdutor, ou a outro grupo funcional introduzido previamente na superfície.

A imobilização por ligação covalente promove uma ligação estável e flexível das cadeias de ADN, previne a dessorção da monocamada formada na superfície e desfavorece interações não específicas. A variante mais utilizada desta técnica, e a utilizada neste trabalho, consiste na funcionalização de uma extremidade da *capture probe* com um grupo tiol e posterior imobilização por ligação covalente a uma superfície de ouro. A elevada afinidade entre o grupo tiol e a superfície de ouro, induz a ligação covalente entre as espécies (Au-S), possibilitando a formação de uma monocamada automontada (*self-assembly monolayer* – SAM) [76].

Apesar das inúmeras vantagens realçadas relacionadas com este processo de imobilização, podem ocorrer fenómenos de difusão lateral, formando “ilhas de ADN”. As aglomerações das cadeias de oligonucleótidos inviabilizam que o processo de bioreconhecimento ocorra com sucesso, o que conseqüentemente afetará o bom funcionamento do genossensor. De forma a evitar que este fenómeno ocorra, a superfície sensora deverá ser construída no formato de monocamada binária, com *capture probe* e um segundo elemento, geralmente um tiol que funcionará como um espaçador lateral. Este componente tem como principal função ocupar os espaços livres entre cadeias de oligonucleótidos e evitar assim que estas se movimentem na superfície

transdutora. Assim, esta camada binária promoverá uma orientação mais favorável do bioreceptor, para que este possa hibridizar com o alvo, despromovendo interações não específicas [78, 79].

A monocamada binária pode ser construída seguindo uma de duas estratégias: “*backfilling*” ou “*inserting*”. No método de “*backfilling*”, inicia-se a construção da superfície sensora pela imobilização da *capture probe* na superfície do transdutor, formando-se uma monocamada automontada desta cadeia de oligonucleótidos. De seguida, procede-se à lavagem da superfície com recurso a uma solução tampão adequada, para que o excesso de *capture probe* “livre” seja removido. Finalmente, é realizada a imobilização do espaçador lateral, que irá preencher os espaços não ocupados pela cadeia de oligonucleótidos. Por outro lado, no método de “*inserting*”, a ordem dos passos de imobilização é invertida. Isto é, inicialmente dá-se a imobilização do espaçador lateral, e só de seguida se realiza imobilização da *capture probe* [79, 80].

A escolha do melhor método de formação da monocamada binária é ainda um tema em aberto, sendo reportados na literatura casos promissores da utilização de ambas as estratégias para a construção de superfícies sensoras em genossensores.

1.5.4.1.2.2 Pré-tratamento de amostras

A maioria dos protocolos de genossensores requerem um pré-tratamento das amostras, antes da hibridização com o elemento de bioreconhecimento. Este inclui passos como a extração de ADN, a amplificação por PCR (reação em cadeia da polimerase) e a purificação pós-PCR [81].

A extração de ADN é usualmente o primeiro passo efetuado neste tipo de análise. Este procedimento tem como intuito a redução da complexidade da matriz alimentar, separando possíveis interferentes como proteínas e ácidos gordos, do ADN genómico. A seleção adequada do método de extração é imprescindível para garantir a qualidade e integridade do ADN a analisar, sendo a sua escolha dependente da matriz alimentar [82].

Ainda que teoricamente isolado, o ADN extraído apresenta uma elevada complexidade, que dificulta e muitas vezes impossibilita a sua deteção direta, uma vez que a porção alvo consiste habitualmente numa pequena sequência de ADN de cadeia simples, dentro de um genoma completo. Posto isto, surge a necessidade de recorrer a um processo de amplificação prévia de ácidos nucleicos, como a PCR. Esta viabiliza a restrição do tamanho do ADN alvo, facilitando assim a sua hibridização com o elemento de bioreconhecimento, e melhorando a sensibilidade do método [83].

O último passo de pré-tratamento passa pela purificação dos produtos resultantes da PCR. Esta elimina os reagentes utilizados aquando da reação, como a enzima polimerase, os catiões divalentes (como Mg^{2+}) e os dNTP (desoxirribonucleotídeos fosfatados) não incorporados, que poderão interferir posteriormente na análise. A purificação dos produtos de PCR não constitui um procedimento mandatário, no entanto o seu efeito na análise pode ser testado, procurando uma melhoria na performance analítica do genossensor [84].

1.5.4.1.2.3 Genossensores – modelo *sandwich*

Numa abordagem de hibridização em *sandwich*, uma nova cadeia de oligonucleótidos, para além da porção alvo e a CP, é adicionada ao sistema: a *signalling probe* (SP). Esta consiste numa cadeia de oligonucleótidos que hibridiza parcialmente com a ponta oposta da porção alvo. Esta hibridização permite a abertura da cadeia dupla, mantendo a porção alvo livre para posterior hibridização com a CP, e ainda fornece rigidez ao analito. Estes três componentes formam o chamado formato *sandwich* “*capture probe* – alvo – *signalling probe*”.

Este tipo de *design* acarreta várias vantagens. Uma vez que são utilizadas duas *probes* a detecção é altamente seletiva. Para além disso, este modelo não implica o *labelling* da sequência alvo. A *capture probe* e a *signalling probe* são desenhadas para que a sua interação seja mínima na ausência do alvo, o que garante que o sinal gerado corresponde à ligação CP-alvo, e que os sinais de fundo sejam relativamente baixos [85]. Por último, a *signalling probe* pode ser funcionalizada com um grupo enzimático, que permite não só uma amplificação de sinal e uma elevada sensibilidade, como também a possibilidade de utilização do sistema com diversos tipos de transdução (ex. ótico e eletroquímico) [79].

1.5.4.2 Tipos de transdução

O transdutor é o componente do biossensor responsável pela conversão do sinal gerado pelo bioreconhecimento do alvo num sinal físico ou químico mensurável. Assim, à medida que o analito se liga ao elemento de bioreconhecimento, o sinal medido vai sofrendo variações. Estas variações devem ser proporcionais à quantidade de analito que se liga ao biorecetor. Atualmente, são reconhecidos quatro tipos de transdutores utilizados em biossensores:

- 1) **Eletroquímicos** – detetam a variação do fluxo de eletrões gerada pela oxidação ou redução de um analito na superfície do eléctrodo de trabalho, quando submetido a um potencial fixo ou variável [7]. Medem o sinal

eletroquímico produzido aquando da interação específica entre o elemento de bioreconhecimento e o analito, por meio de uma ou mais espécies eletroativas. Dependendo do tipo de propriedade eletroquímica a ser medida, estes podem ainda ser divididos em amperométricos, potenciométricos, ou condutimétricos [86, 87];

- 2) **Variação de massa** – estes podem ser piezoelétricos ou de onda acústica. Os biossensores piezoelétricos têm um componente (geralmente um cristal de quartzo revestido com eléctrodos de ouro) que é feito oscilar numa frequência específica, através da aplicação de um sinal elétrico. A superfície deste componente é revestida com o elemento de bioreconhecimento. À medida que o analito é reconhecido pelo bioreceptor, a massa do sistema aumenta, e a frequência de ressonância da oscilação diminui proporcionalmente. Da mesma forma, o aumento de massa na superfície de biossensores de onda acústica leva a uma mudança na frequência de saída. Esta variação da frequência pode ser utilizada para determinar, de forma indireta, a concentração do analito [87];
- 3) **Térmicos/calorimétricos** – detetam variações de calor resultantes de reações exotérmicas, fruto do bioreconhecimento do analito. Estas variações na entalpia podem ser indiretamente utilizadas para determinar a concentração do analito [88];
- 4) **Óticos** - estes têm usualmente um de dois princípios de acompanhamento das propriedades óticas da superfície de medição: a deteção de mudanças na absorção de luz aquando do reconhecimento do analito por parte do bioreceptor, ou a deteção de diferenças no light output devido a processos de luminescência que resultaram do imunorreconhecimento. Estas mudanças nas propriedades óticas vão ser proporcionais à quantidade de analito detetado [47]. Dentro dos biossensores óticos, alguns dos métodos a destacar são: a ressonância plasmónica de superfície (SPR - *surface plasmon resonance*) e as suas variantes, como iSPR (*imaging SPR*) e LSPR (*localized SPR*), particularmente importantes por permitirem uma deteção em tempo real e sem necessidade de *labelling*; o REA (*resonance enhanced absorption*); o TIRF (*total internal reflection fluorescence*); e o SERS (*surface-enhanced Raman spectroscopy*) [7, 47, 89, 90].

Biossensores óticos – SPR

Dentro dos sensores óticos, aqueles baseados na excitação dos plasmões de superfície, geralmente chamados de sensores de ressonância plasmónica de superfície (SPR) pertencem ao grupo de dispositivos de deteção refratométrica [91, 92].

De forma simplificada, o equipamento de SPR consiste num disco de vidro substituível, coberto por uma fina camada de ouro, um canal de fluxo por onde passam as soluções desejadas, um prisma, uma fonte de radiação um detetor ótico (Figura 4A). Nesta configuração, conhecida como a configuração de Kretschamn, a luz passa pelo prisma com alto índice de refração e é totalmente refletida (ATR). Ao chegar à superfície do metal, a densidade de eletrões livre que se encontra à superfície oscila, gerando uma onda que se propaga longitudinalmente ao longo da interface do metal e do dielétrico (onda plasmónica de superfície). [92]. A um determinado ângulo de incidência, parte da radiação é absorvida pelos plasmões de superfície, promovendo a sua ressonância, denominado ângulo de ressonância. Isto é, ao absorverem luz a um determinado comprimento de onda e no ângulo de ressonância, originam a chamada ressonância plasmónica de superfície [93].

Em termos práticos, a fonte de luz faz um pequeno varrimento de ângulos de incidência, e a um determinado ângulo estabelecem-se as condições ideais para que ocorra a ressonância dos plasmões de superfície. Esta absorção causa uma perda de intensidade do feixe refletido, aparecendo como um *dip* (Figura 4B) na curva de intensidade de reflexão [92, 94].

A onda plasmónica de superfície é muito sensível a fenómenos que ocorram no meio onde se propaga. À medida que determinadas espécies se vão ligando à superfície do sensor ou perto da mesma, o valor do índice de refração da superfície varia proporcionalmente. Uma variação do valor índice de refração implica uma variação do valor do ângulo de ressonância, e conseqüentemente um desvio no valor do *dip* (Figura 4B). Estas alterações podem ser monitorizadas, nomeadamente através da representação gráfica do ângulo de ressonância ao longo do tempo, num gráfico chamado de sensograma [91].

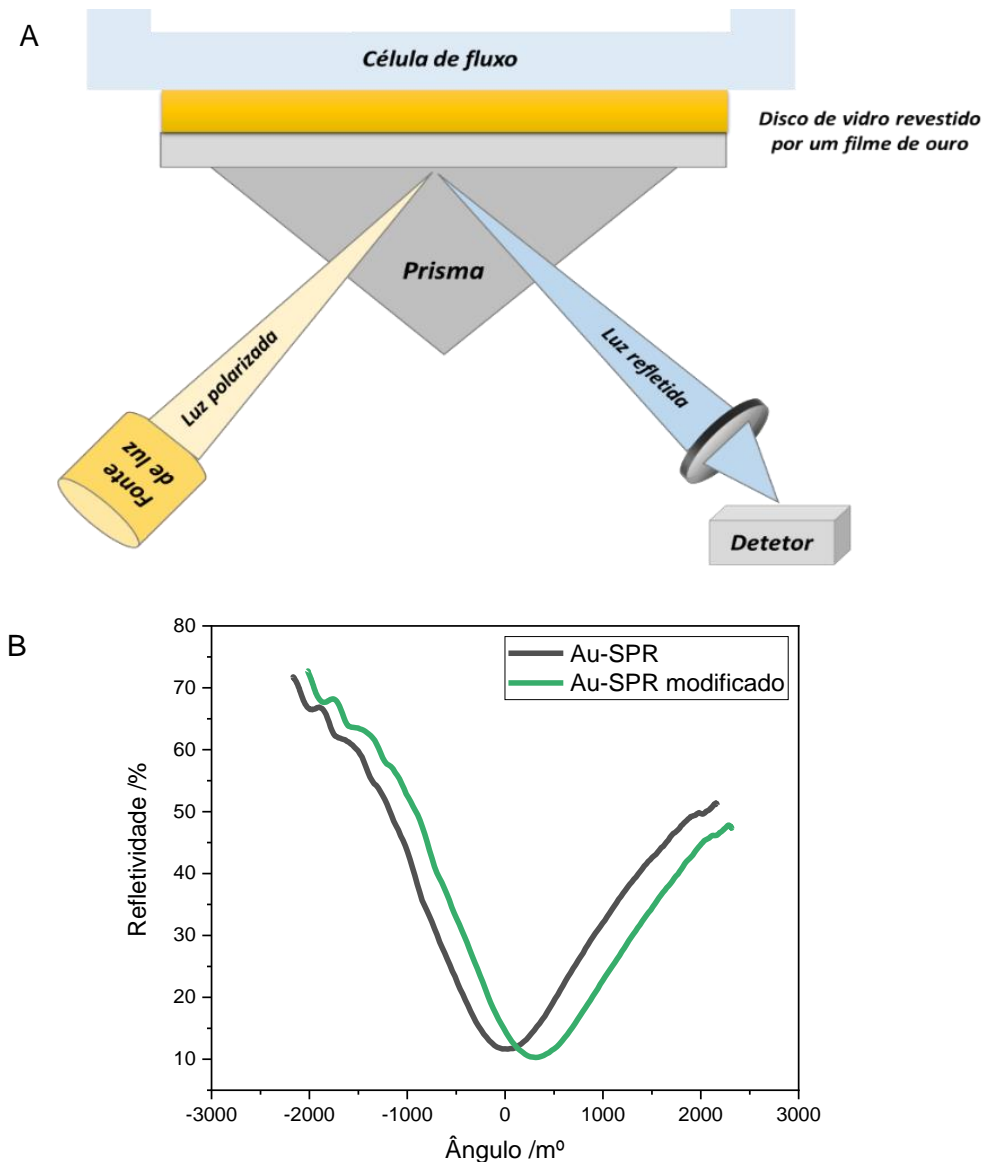


Figura 4. **A)** Representação esquemática de um equipamento de SPR; **B)** Gráfico de intensidade de reflexão em função do ângulo de incidência, representando duas condições diferentes da superfície aquando da aquisição de resultados.

1.5.4.3 Exemplos de aplicações biossensores

Na Tabela 5 encontram-se representados os mais recentes trabalhos publicados relativos ao desenvolvimento de biossensores para a deteção/quantificação de alergénios alimentares identificados na avelã. Na literatura, encontra-se já um exemplo de deteção de Cor a 14 como meio de quantificação de avelã em matrizes alimentares, nomeadamente em massa de trigo. Costa et al (2021) [95] desenvolveu duas plataformas de imunorreconhecimento da proteína Cor a 14, com transdução ótica e eletroquímica. O biossensor com limite de deteção mais baixo (LOD de 0,05 fg mL⁻¹) e o mais seletivo foi obtido com o elemento de bioreconhecimento construído com

anticorpos produzidos em galinha (anti-Cor a 14 IgY). O biossensor foi testado em amostras reais recorrendo a misturas modelo de avelã em massa de trigo, permitindo a detecção de 1 mg kg^{-1} de avelã em massa de trigo (correspondendo a $0,16 \text{ mg kg}^{-1}$ de proteína na matriz).

Na literatura é possível encontrar alguns genossensores desenvolvidos para a detecção de avelã enquanto alimento alergénico, contudo, de acordo com o nosso conhecimento não foi encontrado nenhum trabalho relacionado com o desenvolvimento de um genossensor com alvo na Cor a 14 de avelã. Entre os genossensores reportados apenas um se baseia em transdução ótica. Wang et al (2011) [96] desenvolveu um biochip ótico de filme fino de silicone, combinado com dois sistemas de PCR tetraplex, para a detecção simultânea de aipo, amêndoa, aveia, sésamo, mostarda, tremoço, noz e avelã. Neste estudo, o biochip de filme fino deteta a presença de produtos de PCR por conversão enzimática de ácidos nucleicos híbridos em filmes moleculares finos. A massa resultante altera o padrão de interferência da luz na superfície do biochip, resultando numa mudança de cor. Apesar dos vários alvos em estudo, a determinação do LOD é apenas realizada para uma espécie, o sésamo, não sendo possível estabelecer um LOD associado ao sensor para a detecção de avelã enquanto alergénio.

Na Tabela 5 estão representados exemplos de biossensores, nomeadamente genossensores e imunossensores desenvolvidos para a detecção e quantificação da avelã como alimento alergénico.

As alergias são até aos dias de hoje uma doença sem cura, sendo a proteção de indivíduos alérgicos unicamente assegurada pela eliminação dos alimentos aos quais são sensíveis da sua dieta [9]. No entanto, alergénios alimentares podem aparecer acidentalmente em alimentos processados, através de rotulagem indevida ou contaminações durante os procedimentos de confeção e armazenamento. Neste sentido, a proteção destes indivíduos passa pelo desenvolvimento e implementação de programas de gestão e monitorização focados na detecção e quantificação de alergénios [7, 97]. A maioria dos métodos analíticos que têm vindo a ser desenvolvidos são focados em técnicas complexas, caras e que requerem operadores com elevado grau de conhecimento, nomeadamente para a execução e implementação de técnicas como ELISA, LC-MS e PCR em tempo real. Assim, o desenvolvimento de biossensores que permitam quantificar e detetar alergénios com elevada sensibilidade e seletividade irá potenciar que estes dispositivos sejam implementados em larga escala. Em particular, os biossensores apresentam um elevado potencial para serem incorporados em sistemas automatizados e até mesmo anexados a equipamentos de uso diário, como os smartphones [7]. Os imunossensores e os MIP (polímeros de impressão molecular)

são reconhecidos por características como a simplicidade, baixo custo e facilidade de miniaturização. Por outro lado, a flexibilidade conformacional e a reatividade cruzada característica das proteínas, implicam problemas de seletividade neste tipo de sensor. Deste modo, os genossensores surgem como alternativas que, apesar de um pouco mais complexas, se demonstram altamente seletivas e não dependentes quer da conformação, quer da reatividade cruzada das proteínas alergénicas [7, 70].

Tabela 5. Sumário das aplicações reportadas mais recentes de biossensores (genossensores e imunossensores) para a deteção/quantificação de alergénios de avelã.

	Matriz alimentar	Gene / Proteína alvo	Técnica	LOD	Ref
Genossensores	Cereais de pequeno-almoço, snacks, biscoitos e chocolate	Cor a 1	<i>PNA array from duplex PCR amplification</i>	1 nmol L ⁻¹ / 50 pg (oligonucleótidos sintéticos e ADN respetivamente)	[98]
	Avelã, chocolate, leite de soja, biscoitos, suplemente de lecitina	Cor a 1	<i>Electrochemical low-density AD array combined with PCR</i>	[0,1-0,3] nmol L ⁻¹	[99]
	Avelã	Cor a 9	Amperometria (<i>beads</i> magnéticas) acoplada a PCR	0,72 pmol L ⁻¹ de oligonucleótidos sintéticos e 20 pg de ADN	[100]
	Bolachas crocantes de aveia, omelete de chocolate, <i>wafers</i> de avelã, palitos de pão	Oleosina	Biochip ótico de filme fino, combinado com dois sistemas de PCR <i>tetraplex</i>	Não reportado	[96]
Imunossensores	Bolachas e chocolates	Proteínas da avelã	<i>Antibody-microarrayed chip using iSPR</i>	[1,5 / 4,6] mol kg ⁻¹	[101]
	Azeite	Proteínas da avelã (anti-avelã MAb 50-5H9)	Imunossensor ótico direto	0,08 mol kg ⁻¹	[102]
	Bolachas digestivas, bolachas de avelã e avelãs	Proteínas da avelã (antiavelã MAb)	SPR	0,1 ppm (melhor resultado para o anticorpo F-50-6B12)	[103]
	Bolachas	Cor a 9	Imunossensor eletroquímico	0,1 mol kg ⁻¹	[41]
	Farinha de arroz branco	Cor a 1	Imunossensor eletroquímico	0,089 mol kg ⁻¹	[104]
	Massa de trigo	Cor a 14	Imunossensor eletroquímico	1,0 mg kg ⁻¹ de avelã (0,16 mg kg ⁻¹ de proteína)	[95]

2. Objetivo do trabalho

Tendo em conta a relevância da alergia à avelã na sociedade, este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e posterior validação de um genossensor ótico (SPR) em formato *sandwich*, com alvo no gene que codifica o alergénio Cor a 14, para a deteção/quantificação de avelã como alimento alergénico em produtos alimentares.

Como objetivos específicos pretende-se inicialmente selecionar e validar a especificidade da cadeia de oligonucleótidos alvo (dentro do ADN genómico da Cor a 14), através de estudos de reatividade cruzada com outras espécies de plantas. De seguida, tenciona-se desenvolver o genossensor em formato *sandwich*, com recurso a cadeias de oligonucleótidos sintéticas (CP, alvo Cor a 14 e SP). Assim, pretende-se otimizar os parâmetros experimentais associados ao sistema, nomeadamente concentrações ótimas de CP e p-ATP.

Posteriormente, pretende-se explorar a aplicação do genossensor ótico (SPR) em alimentos, nomeadamente em produtos de PCR de diferentes variedades avelã (*Corylus avellana*), e de misturas modelo de avelã em massa de trigo.

Finalmente, espera-se desenvolver de uma metodologia de PCR em tempo real para ser utilizada como ferramenta de validação do genossensor ótico.

3. Material e Métodos

3.1 Seleção *in silico* das cadeias de oligonucleótidos para a construção do genossensor

A construção do genossensor em formato *sandwich*, com alvo no alergénio Cor a 14 da avelã (Figura 5), incluiu a seleção criteriosa de 4 componentes de ADN:

- 1) **Região Alvo Cor a 14 (Tp- sintético / Tg – amostra real)** – cadeia de oligonucleótidos alvo (analito), isto é, zona do genoma da Cor a 14 que será detetada pelo genossensor;
- 2) **Capture Probe (CP)** – cadeia de oligonucleótidos que hibridiza parcialmente com uma das pontas da região alvo, e que atua como elemento de bioreconhecimento;
- 3) **Signalling Probe (SP)** - cadeia de oligonucleótidos que hibridiza parcialmente a extremidade oposta da região alvo, fornecendo rigidez ao analito e mantendo a porção alvo livre para posterior hibridização com a CP;
- 4) **Primers F e R** – par de *primers* a utilizar no momento da PCR qualitativa e da PCR em tempo real, específicos para a amplificação da região alvo da Cor a 14.

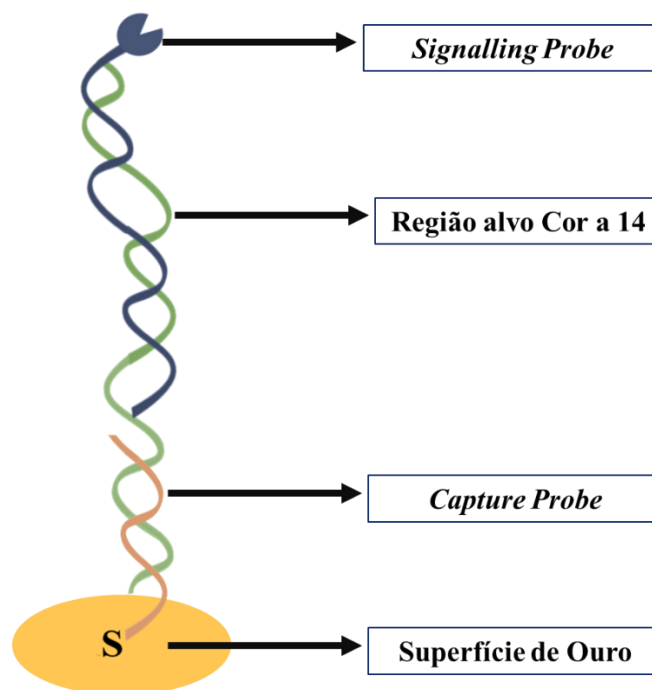
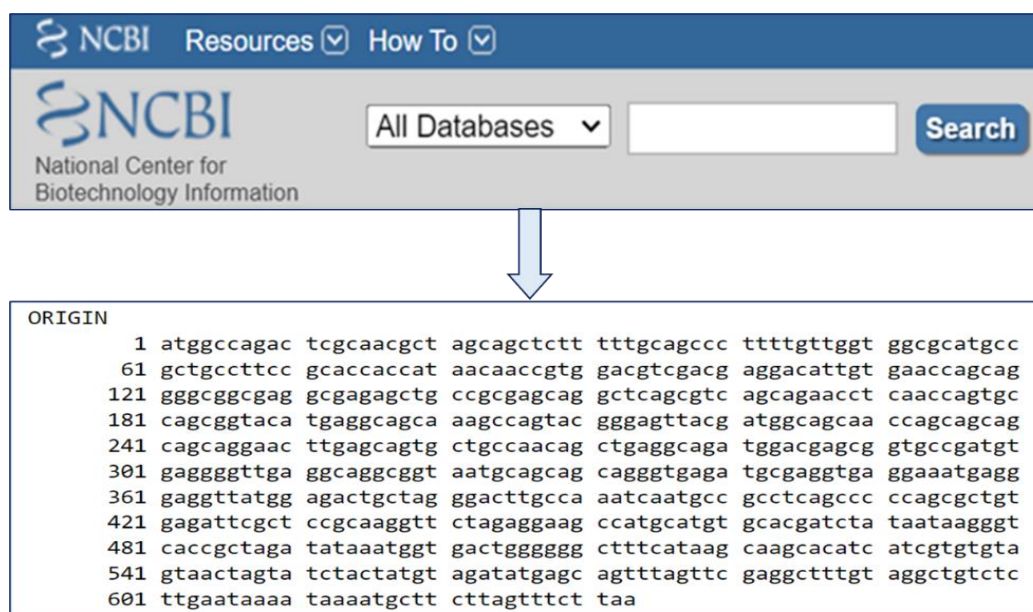


Figura 5. Esquema de hibridização das cadeias de oligonucleótidos: CP, SP e Tp/Tg.

Dado que a seleção da SP e da CP depende do alvo em questão, o primeiro passo consiste na seleção criteriosa da região alvo e dos *primers* adequados para a respetiva zona. O estudo *in silico* para a seleção das probes efetuou-se com recurso a várias ferramentas bioinformáticas. Numa primeira fase e com recurso ao NCBI – *National Center for Biotechnology Information* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), selecionou-se o gene que codifica a proteína alergénica Cor a 14 da avelã (Figura 6).



NCBI Resources How To

NCBI National Center for Biotechnology Information

All Databases Search

ORIGIN

```

1 atggccagac tcgcaacgct agcagctctt tttgcagccc ttttgttggg ggcgcatgcc
61 gctgccttcc gcaccaccat aacaaccgtg gacgtcgacg aggacattgt gaaccagcag
121 gggcggcgag gcgagagctg ccgcgagcag gctcagcgtc agcagaacct caaccagtgc
181 cagcgggtaca tgaggcagca aagccagtac gggagttacg atggcagcaa ccagcagcag
241 cagcaggaac ttgagcagtg ctgccaacag ctgaggcaga tggacgagcg gtgccgatgt
301 gaggggttga ggcaggcggg aatgcagcag cagggtgaga tgcgaggtga ggaaatgagg
361 gaggttatgg agactgctag ggacttgcca aatcaatgcc gcctcagccc ccagcgcctgt
421 gagattcgct ccgcaaggtt ctagaggaag ccatgcatgt gcacgatcta taataagggt
481 caccgctaga tataaatggt gactgggggg ctttcataag caagcacatc atcgtgtgta
541 gtaactagta tctactatgt agatatgagc agtttagttc gaggctttgt aggctgtctc
601 ttgaataaaa taaaatgctt cttagtttct taa

```

Figura 6. Resultado da pesquisa no NCBI para o gene que codifica a proteína alergénica Cor a 14 (nº de acesso do NCBI - FJ358504.1).

Utilizando o gene da Cor a 14, procedeu-se à seleção dos *primers* com recurso ao *software* primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Esta seleção atendeu a alguns critérios, nomeadamente a escolha de *primers forward* (F) e *reverse* (R) com temperaturas de hibridização (*temperature of annealing*) semelhantes, e com um conteúdo equilibrado em guanina-citosina (de pelo menos 30 %), que permita uma temperatura de hibridização entre os 60 °C-65 °C, evitando em simultâneo a auto-complementaridade ou formação de estruturas secundárias (*hairpin*¹) dos *primers*. Paralelamente, é fundamental que os *primers* sejam específicos para o alvo, isto é, que amplifiquem apenas a região alvo, evitando fenómenos de reatividade cruzada com outras espécies [105]. Desta forma, fez-se uma análise *in silico* com recurso ao *software* Nucleotide BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=%20blastn&PAGE%20_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) do par de *primers* representado na Figura 7, os quais correspondiam aos critérios referidos anteriormente.

¹ *Hairpin* – estrutura na qual ocorre hibridização de pares de bases intramoleculares, numa cadeia simples de ADN

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity
Forward primer	TTTCATAAGCAAGCACATCATCG	Plus	23	512	534	58.09	39.13	4.00
Reverse primer	ACAGCCTACAAAGCCTCGAACTA	Minus	23	597	575	61.63	47.83	4.00
Product length	86							

Figura 7. Par de *primers* selecionado através do *software* primer-BLAST.

O Nucleotide BLAST permite comparar a sequência do fragmento de ADN alvo com as sequências de outras espécies presentes no banco de dados (NCBI), mostrando o seu nível de similaridade e a zona onde estas coincidem. Neste caso, para o gene que codifica a Cor a 14, surgiram cinco sequências com semelhanças (Figura 8A). Os dois primeiros resultados, com uma similaridade de 100 % correspondem exatamente ao alvo Cor a 14 - avelã. Os dois seguintes, com 67 % e 64 %, correspondem à noz (*Juglans regia*), e finalmente com uma semelhança de 64% surgiu a noz pecã (*Carya illinoensis*). Já para a zona alvo escolhida, correspondente aos *primers* selecionados, nenhuma semelhança com outra espécie presente no banco de dados foi encontrada (Figura 8 B), com a exceção do próprio alvo: Cor a 14 (albumina 2S).

A

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Corylus avellana 2S albumin mRNA complete cds	<i>Corylus avellana</i>	1170	1170	100%	0.0	100.00%	633	FJ358504.1
<input checked="" type="checkbox"/> Corylus avellana genome assembly chromosome ca3	<i>Corylus avellana</i>	1164	1738	100%	0.0	99.84%	39770678	LR899425.1
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Juglans regia 2S sulfur-rich seed storage protein 2 (LOC108993506) mRNA	<i>Juglans regia</i>	324	324	67%	7e-84	80.78%	722	XM_018968462.2
<input checked="" type="checkbox"/> Juglans regia 2S albumin seed storage protein precursor mRNA partial cds	<i>Juglans regia</i>	305	305	64%	2e-78	80.62%	649	U66866.1
<input checked="" type="checkbox"/> Carya illinoensis putative allergen I1 mRNA complete cds	<i>Carya illinoensis</i>	267	267	64%	1e-66	78.95%	432	AY192569.1

B

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Corylus avellana genome assembly chromosome ca3	<i>Corylus avellana</i>	159	159	100%	2e-35	100.00%	39770678	LR899425.1
<input checked="" type="checkbox"/> Corylus avellana 2S albumin mRNA complete cds	<i>Corylus avellana</i>	159	159	100%	2e-35	100.00%	633	FJ358504.1

Figura 8. Aplicação do Nucleotide BLAST no NCBI para avaliar a especificidade: A) do gene que codifica a proteína alergénica Cor a 14; B) a zona escolhida como alvo.

Por último, avaliou-se a ausência de auto-complementaridade e/ou formação de *hairpins* com o programa Oligocalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>). Uma vez selecionados os *primers*, e consequentemente a zona alvo, efetuou-se a seleção da SP e da CP. Como

referido anteriormente, estas constituem regiões complementares ao alvo, no entanto, a sua utilização aquando da construção de um genossensor implica alguns cuidados.

No caso da CP, é essencial eleger uma estratégia adequada para a sua imobilização na superfície transdutora. Dado que a superfície transdutora utilizada neste trabalho consiste num filme de ouro, a técnica escolhida foi a imobilização por ligação covalente, com recurso a um tiol, tal como referido na secção 1.5.4.1.2.1 [79]. Assim, a CP selecionada consiste numa cadeia de oligonucleótidos com 26 pares de bases, funcionalizada com um grupo tiol na sua extremidade 3', e complementar à extremidade 5' da região alvo. Relativamente à SP, e uma vez que estamos perante uma transdução ótica por SPR considerada "*label-free*", a sua funcionalização não é fundamental. No entanto, a funcionalização da SP será importante para o desenvolvimento de um genossensor com transdução eletroquímica [106]. Assim, a SP selecionada para o trabalho consiste numa cadeia de oligonucleótidos com 60 pares de bases, funcionalizada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) na extremidade 5', e complementar à extremidade 3' da região alvo. As diferentes cadeias de oligonucleótidos consideradas para a construção do genossensor (Tabela 6), nomeadamente a região alvo (template), a CP, a SP e os *primers* utilizados na amplificação por PCR foram sintetizados na Eurofins Genomics (Ebersberg, Alemanha).

Tabela 6. Sequência genética da região alvo (template Tp/Tg), da *capture probe* (CP), da *signalling probe* (SP) e dos respetivos *primers*.

	Sequência 5' → 3'
Região alvo Cor a 14 (Tp/Tg)	TTTCATAAGCAAGCACATCATCGTGTGTAGTAACTAGTATCTACTATGTA GATATGAGCAGTTTAGTTCCGAGGCTTTGTAGGCTGT
Capture Probe (CP)	ACACGATGATGTGCTTGCTTATGAAA-Tiol C3
Signalling Probe (SP)	FITC-ACAGCCTACAAAGCCTCGAACTAACTGCTCATATCTACAT AGTAGATACTAGTTACTAC
Primer Cor 14-F_{geno}	TTTCATAAGCAAGCACATCATCG
Primer Cor 14-R	ACAGCCTACAAAGCCTCGAACTA

A escolha dos *primers* e das sondas é realizada a partir de sequências de ADN depositadas nas bases de dados (ex: NCBI). As sequências que codificam os genes disponibilizadas em bases de dados podem estar incompletas, ou não traduzir corretamente o alinhamento real dos nucleótidos tal como são expressos pelos genes das respetivas espécies. Consequentemente, é essencial verificar experimentalmente se todos os elementos de construção do genossensor, bem como os *primers* a usar em PCR funcionam corretamente. Além disso, é necessário validar experimentalmente a especificidade da região alvo, através de estudos de reatividade cruzada com os respetivos *primers*. Como o genossensor será aplicado a produtos de PCR, os *primers*

utilizados nestas reações têm de ser altamente específicos. Para tal, estudou-se a ausência de reatividade cruzada dos *primers* com uma série (n=38) de espécies vegetais com proximidade genética à avelã e com elevada probabilidade de existir como ingredientes ou contaminações em matrizes alimentares (resultados apresentados nas secções 4.3 e 4.4).

3.2 Reagentes e soluções

3.2.1 PCR/PCR em tempo real

Para a extração de ADN, tanto das diversas espécies alimentares consideradas no estudo de reatividade cruzada como nas amostras de avelã, foi utilizado um kit comercial, Nucleospin® Food kit da Macherey-Nagel (Düren, Alemanha). Este kit de extração de ADN contém colunas de sílica e todos os reagentes necessários para a extração: solução de lise CF, proteinase K (10 mg mL⁻¹), solução C4, etanol 100%, tampão CQW, solução C5 e solução de eluição.

Para a PCR qualitativa dos extratos de ADN das várias espécies em estudo foram utilizados os seguintes reagentes: água de PCR (livre de RNases e Adnses) (Sigma Aldrich - Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), dNTP 10 mmol L⁻¹ (Genaxxon Bioscience, Ulm, Alemanha), solução tampão sem Mg (670 mmol L⁻¹ Tris-HCl, pH 8,8, 160 mmol L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 0,1% Tween 20), solução tampão com Mg (670 mmol L⁻¹ Tris-HCl, pH 8,8, 160 mmol L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 0,1% Tween 20, MgCl₂ 25 mmol L⁻¹), enzima Taq polimerase 5 U µL⁻¹ (SuperHot Taq ADN Polymerase™, Genaxxon Bioscience, Ulm, Alemanha), *primers* 10 µmol L⁻¹ (cuja sequência se encontra representada na Tabela 7) e MgCl₂ (25 mM). De referir que as soluções tampão, o MgCl₂ e a enzima fazem parte do kit SuperHot Taq ADN Polymerase™ (Genaxxon Bioscience, Ulm, Alemanha).

Tabela 7. *Primers* utilizados em PCR qualitativa e/ou PCR em tempo real.

Gene	<i>Primers</i>	Sequência (5'→3')	Fragmento (pb)
Cor a 14	Cor 14-F _{geno} Cor 14-R	TTTCATAAGCAAGCACATCATCGACAGCC TACAAAGCCTCGAACTA	86
18S ribossomal RNA	EG-F EG-R	TCGATGGTAGGAATAGTGGCCTACTTGC TGCCTTCTTTGGATGTGGTA	109
18S ribossomal RNA	18SRG-F 18SRG-R	ATGGTAGCTTTCAACTATCCCGTCACTCT TTGCCGATGGTGTAGTT	113
18S ribossomal RNA	18SEU-F 18SEU-R	TCTGCCCTATCAACTTTTCGATGG TAATTTGCGCGCCTGCTG	140

Relativamente à PCR em tempo real, para além dos *primers* Cor 14-F_{geno}/Cor 14-R e da água de PCR (livre de RNases e Adnses), utilizou-se 1x corante Sso Fast *Evagreen*® supermix (Biorad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

3.2.2 Ativação CP / hidratação das probes

Para a ativação da CP foram utilizados: etanol 98% (Sigma-Aldrich), uma solução de hidrocloreto de Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP-HCl) 10 mM em tampão TE (Tris-EDTA) a pH 8,0, acetato de sódio (NaAc, >99%, Sigma-Aldrich), acetato de magnésio (MgAc) e água de PCR (Sigma Aldrich - Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). A água de PCR é ainda utilizada para a hidratação de todas as cadeias de oligonucleótidos: Tp (alvo), SP (*signalling probe*) e CP (*capture probe*). O procedimento de hidratação das cadeias de oligonucleótidos, bem como o de ativação da CP encontram-se descritos no Anexo I.

3.2.3 SPR

Para as experiências de SPR foram utilizadas as seguintes soluções: 0,5% SDS degaseificado, HCl 0,1 mol L⁻¹, etanol 96% (Sigma-Aldrich), NaOH 0,1 mol L⁻¹, água ultrapura, *running buffer* 2x SSPE (*saline sodium phosphate EDTA buffer*) a pH 7,4 (preparado com NaCl 0,3 mol L⁻¹ (Sigma-Aldrich), NaH₂PO₄ 20 mmol L⁻¹ (Sigma-Aldrich) e EDTA 0,2 mmol L⁻¹ (Sigma-Aldrich)). Todas estas as soluções foram preparadas com água ultrapura Millipore (resistividade = 18 MΩ .cm), purificada através do sistema Milli-Q. Todas as soluções de CP, p-ATP, alvo sintético, SP e extratos de avelã realizadas com a finalidade de serem injetadas no SPR Autolab foram preparadas em *running buffer* 2x SSPE, pH 7,4.

3.3 Material e equipamentos

As soluções foram preparadas com os seguintes materiais: pipetas monocanal mecânicas, tubos autoclavados, frascos, etc, duas centrifugas (HERMLE e Fresco™ 17, Thermo Scientific, Osterode am Harz, Alemanha), um medidor de pH com elétrodo de vidro (Metrohm, Herisau, Suíça), uma balança analítica AG245, com precisão ± 0,00001 g (Mettler Toledo, EUA) e um termobloco (Eppendorf Thermomixer Comfort, Hamburg, Alemanha).

Todo o material e consumíveis usados em biologia molecular são livres de DNase e RNase (estéreis) ou autoclavados (121 °C, 15 min). As superfícies e restante material foram quimicamente descontaminados com hipoclorito de sódio e detergentes, ou com soluções alcalinas comerciais que se destinam a destruir resíduos de ADN e RNA. Adicionalmente, foram seguidos todos os procedimento recomendados para biologia molecular, os quais são indispensáveis à correta manipulação de material

biológico e sensível (ADN), tal como uso de luvas, batas limpas e máscara, especialmente na sala das câmaras de PCR durante a preparação das reações.

3.3.1.1 Equipamento para PCR

As PCR qualitativas correram em dois termocicladores, MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) e *SimpliAmp™ Thermal Cycler* (Applied Biosystems™, ThermoFisher Scientific, EUA). A PCR em tempo real foi realizada num termociclador CFX96 Real-Time PCR System (BioRad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Para o processamento do sinal de fluorescência foi utilizado o *software* Bio-Rad CFX Manager 3.1 (BioRad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

3.3.1.2 Equipamento de SPR

As experiências de SPR foram realizadas utilizando o SPR Autolab ESPRIT (KEI bv, Ridderkerk, Utrecht, Países Baixos). A temperatura do sistema é controlada e mantida à temperatura constante de 25 ± 2 °C, de forma a garantir resultados reprodutíveis, utilizando um banho de água Julabo F32-HE (Julabo GmbH, Seelbach, Alemanha). Os sensores SPR (Au-SPR) são constituídos por um disco de vidro coberto com uma fina camada de ouro com espessura de aproximadamente 50 nm (KEI bv, Ridderkerk, Utrecht, Países Baixos), e controlado pelo *software* KEI SPR Data Acquisition (versão 4.4, KEI bv, Ridderkerk, Utrecht, Países Baixos). O equipamento apresenta um prisma hemisfério no qual a luz incide. A luz é gerada num díodo de arsenieto de gálio a um comprimento de onda fixo de 670 nm, interatua com o sensor Au-SPR. A modulação do ângulo de incidência é controlada por um espelho, permitindo regular o plano do feixe de luz polarizada no sensor Au-SPR. O instrumento contém dois canais independentes com um amostrador robótico automático integrado através do qual é possível injetar as soluções presentes na placa de 384 poços, no sensor Au-SPR. O controlo do volume, frequência e velocidade de mistura são garantidos por duas agulhas que injetam as soluções em canais de medição independentes. O condicionamento de equipamento aquando de cada utilização encontra-se descrito no Anexo II.

3.4 Execução experimental

3.4.1 Extração de ADN (preparação dos extratos)

As extrações de ADN de todas as espécies alimentares utilizadas ao longo deste trabalho, tal como previamente referido, foram realizadas com recurso ao kit comercial, *Nucleospin® Food kit* da Macherey-Nagel (Düren, Alemanha

Cerca de 200 mg de amostra, previamente homogeneizados, foram pesados para tubos de reação autoclavados de 2,0 mL. Seguidamente, de modo a promover a lise celular, foram adicionados 550 µL de tampão de lise CF pré aquecido a 65 °C e 10 µL de solução de proteinase K (10 mg mL⁻¹). Efetuou-se uma agitação vigorosa por vórtex, seguida de uma incubação num termobloco a 65 °C, durante 60 minutos, a uma agitação constante de 950 rpm. Depois, adicionaram-se 2 µL de RNase (2 mg mL⁻¹), seguindo-se vórtex suave e incubação à temperatura ambiente por 5 minutos. Prontamente, realizou-se uma primeira centrifugação a 17.000 xg e 4 °C durante 10 minutos, transferindo o sobrenadante para um tubo autoclavado de 1,5 mL, seguida de uma segunda centrifugação durante 5 minutos nas mesmas condições, de forma a eliminar qualquer material que pudesse ainda estar em suspensão.

Numa segunda fase, com o intuito de ajustar as condições de ligação do ADN à coluna de sílica, pipetaram-se cerca de 500 µL do sobrenadante para um novo tubo de reação autoclavado de 2,0 mL, adicionando volumes iguais (500 µL) de C4 e de etanol, e homogeneizando o conteúdo de cada tubo por agitação por inversão. Posteriormente, transferiu-se a mistura para uma coluna de sílica e centrifugou-se a 11.000 xg durante 1 minuto à temperatura ambiente. Estando este passo condicionado pelo volume máximo da coluna ser 750 µL, foram realizados vários carregamentos até que todo volume tivesse passado na coluna.

De seguida, cada coluna foi lavada 3 vezes com 400 µL de CQW, 700 µL de C5 e 200 µL de C5, intercalando as lavagens com centrifugações a 11.000 xg à temperatura ambiente, sendo as duas primeiras durante 1 minuto e a última durante 2 minutos, de forma a secar bem as colunas dos resíduos de etanol das soluções de lavagem. Finalmente, procedeu-se à eluição do ADN para um novo tubo autoclavado de 1,5 mL com 100 µL de solução de eluição (CE) pré-aquecida a 70 °C, seguida de uma incubação por 5 minutos à temperatura ambiente e posterior centrifugação (11.000 xg a temperatura ambiente) durante 1 minuto. Por fim, os extratos obtidos foram armazenados a -20 °C até serem utilizados.

3.4.2 Determinação da concentração e pureza dos extratos de ADN

A pureza e concentração dos extratos de ADN foram determinados por espectrofotometria UV/Vis com recurso a um leitor de placas e a um dispositivo de volumes reduzidos (Synergy HT multimodo Take3, BioTek Instruments®, Inc., Vermont, EUA). Foram colocados 4 µL de cada extrato de ADN em duplicado no dispositivo Take3 e foi registado o valor de absorvância a 260 (ADN), 280 (proteínas) e 320 nm (interferentes). Os resultados foram processados automaticamente com o protocolo para ácidos nucleicos (ADN de cadeia dupla), considerando que absorvância de 1 (260 nm) num percurso ótico de 1 cm corresponde a 50 ng/µL de ADN. A razão de A_{260}/A_{280} corresponde à pureza dos extratos, devendo este valor ser o mais próximo possível de 1,8, mas sendo considerado adequado entre 1,6-2,0. Valores >1,8 indicam contaminação por ARN e valores <1,8 contaminação por proteínas.

A determinação da pureza e concentração dos extratos de ADN foi realizada para todos os extratos utilizados ao longo do trabalho.

3.4.3 PCR qualitativa

Foram realizadas PCR qualitativas, para os pares de *primers*: Cor 14-F_{geno}/Cor 14-R, EG-F/EG-R, 18SRG-F/18SRG-R e 18SEU-F/18SEU-R. Para cada ensaio, preparou-se uma mistura reacional composta por água de PCR, dNTP, tampão sem Mg ou tampão com Mg dependendo do par de *primers* em questão, enzima Taq polimerase, os respetivos *primers* F/R, MgCl₂, e o extrato de ADN alvo, para um volume final de 25 µL. As condições dependem do conjunto de *primers* a utilizar, encontrando-se descritas na Tabela 8.

Tabela 8. Quantidade de reagentes utilizados para cada par de *primers* da PCR qualitativa.

Reagentes (µL)	<i>Primers</i>			
	Cor 14 F _{geno} / Cor 14-R	EG-F/EG-R	18SRG-F/ 18SRG-R	18SEU-F/ 18SEU-R
Água de PCR	16,8	16,4	15,6	14,8
Tampão c/Mg	2,5	2,5	-	-
Tampão s/Mg	-	-	2,5	2,5
MgCl ₂	0,5	0,5	1,5	1,5
dNTP	2,0	2,0	2,0	2,0
<i>Primer F</i>	0,5	0,7	0,6	1,0
<i>Primer R</i>	0,5	0,7	0,6	1,0
Taq	0,2	0,2	0,2	0,2
V _{ADN}	2,0	2,0	2,0	2,0
V _{TOTAL}	25,0			

As várias reações de PCR foram realizadas com recurso a dois termocicladores disponíveis, sendo que em todas foi incluído um controlo negativo (CN), onde o volume de ADN alvo é substituído por água de PCR, de forma a monitorizar e/ou detetar quaisquer possíveis contaminações durante a preparação da PCR. Na Tabela 9 encontram-se descritas as condições de tempo e temperatura utilizadas na PCR qualitativa de cada par de *primers*. Neste trabalho foram otimizadas as condições de amplificação para o par de primers Cor 14-F_{geno}/Cor 14-R.

Tabela 9. Condições de tempo/temperatura utilizadas para a PCR qualitativa dos diferentes pares de *primers*.

Etapas		<i>Primers</i>		Cor 14-F _{geno} / Cor 14-R		EG-F/EG-R		18SRG- F/18SRG-R		18SEU-F/ 18SEU-R	
Desnaturação		95°C	5 min	95°C	5 min	95°C	5 min	95°C	5 min	95°C	5 min
Amplificação	Desnaturação	95°C	30 s	95°C	30 s	95°C	30 s	95°C	30 s	95°C	30 s
	Hibridização	62°C	30 s	63°C	30 s	65°C	30 s	60°C	30 s	60°C	30 s
	Extensão	72°C	30s	72°C	30s	72°C	30s	72°C	30s	72°C	30s
Nº de ciclos		40		35		33		35			
Extensão final		72°C	5 min	72°C	5 min	72°C	5 min	72°C	5 min	72°C	5 min

3.4.4 Eletroforese

Após realizar a PCR, os produtos de amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% corado com 1x GelRed (Biotium, Hayward, CA, EUA) (utilizado para permitir a visualização do resultado da eletroforese sob luz ultravioleta) em tampão 1x SGTB (Grisp, Porto, Portugal). A cada 20 µL de produto de PCR ou 2 µL de marcador de peso molecular foram adicionados 4 µL de corante de carregamento. De seguida, a totalidade do volume de cada produto corado (24 µL) foi transferido para o gel de agarose e submetido a eletroforese durante 25 minutos a 200 V. Cada corrida de eletroforese é acompanhada por um marcador de peso molecular (também corado com corante de carregamento), que estabelece um padrão de peso molecular (DNA marker 100 bp, Biotium, Fremont, CA, EUA) servindo assim como referência.

3.4.5 Construção do genossensor

O esquema simplificado do procedimento seguido para a construção do genossensor está representado na Figura 9. Este pode ser dividido essencialmente em três etapas:

- 1) a construção do elemento de bioreconhecimento;
- 2) a hibridização da porção alvo com a SP;

- 3) exposição do analito à superfície sensora (avaliação da performance analítica).

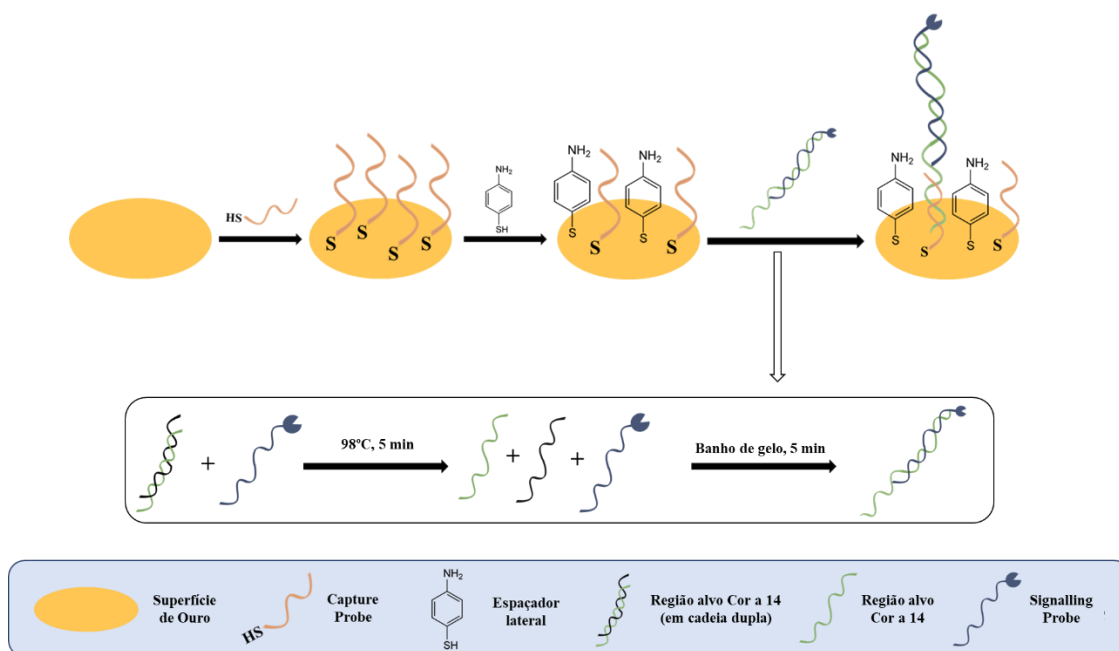


Figura 9. Representação esquemática da construção do elemento de bioconhecimento pelo método de hibridização em *sandwich*.

3.4.5.1 Construção do elemento de bioconhecimento

A construção do elemento de bioconhecimento, realiza-se em dois passos: a imobilização da CP e a imobilização do espaçador lateral (p-ATP). Inicialmente, fez-se passar a solução de *running buffer* pela superfície do Au-SPR (2x SSPE). Este passo permite uma estabilização da resposta do sistema e a consequente determinação da linha de base. De seguida, adicionou-se a solução de CP (com diferentes concentrações: 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) até que o ângulo SPR não varie em função do tempo, para garantir um máximo de imobilização. Após a imobilização da CP realizou-se uma limpeza com 2x SSPE, para que o excesso de CP que não ficou imobilizado na superfície fosse removido.

Numa segunda fase, adicionou-se a solução de p-ATP (com diferentes concentrações: 1,0, 1,5, 2,0 mmol L^{-1}), igualmente seguida de uma limpeza com o *running buffer* (2x SSPE), para retirar qualquer excesso de p-ATP que não ficasse imobilizado. Desta forma, a construção do elemento de bioconhecimento é dada como finalizada, tendo-se formado na superfície do disco de ouro uma monocamada binária auto-montada (SAM - “*self-assembled monolayer*”) de CP e p-ATP.

Na Figura 10 encontra-se representado o sensograma representativo dos vários passos de construção do elemento de bioreconhecimento acima descritos.

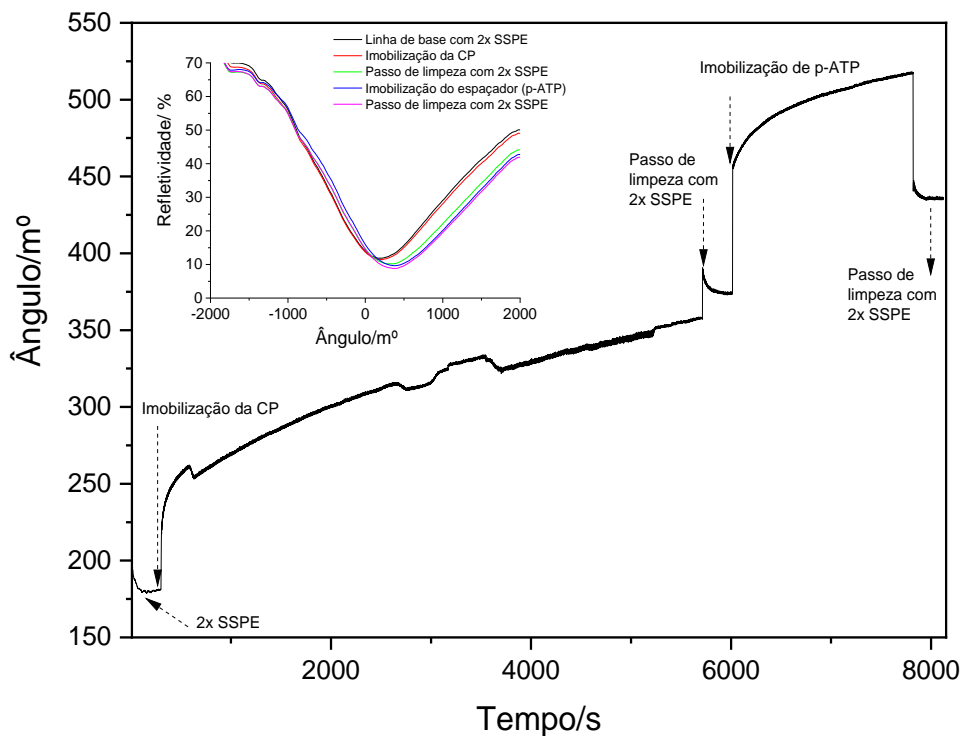


Figura 10. Sensograma representativo dos passos da construção do elemento de bioreconhecimento.

A duração de cada um dos passos da montagem do elemento de bioreconhecimento, assim como as concentrações das soluções utilizadas/estudadas ao longo do trabalho encontram-se na Tabela 10. A duração dos passos de montagem do elemento de bioreconhecimento foi selecionada de forma a maximizar e permitir que o ensaio, incluindo construção do elemento de bioreconhecimento e performance analítica do genossensor, não exceda 1 dia útil de trabalho (8-10 horas).

Tabela 10. Etapas da montagem do elemento de bioreconhecimento e respetivas soluções utilizadas e tempo de duração.

Etapa	Solução	Tempo/s
Linha de base	2x SSPE	300
Imobilização da CP	CP	0,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$
		0,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$
		0,75 $\mu\text{mol L}^{-1}$
		1,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$
Lavagem	2x SSPE	300
Imobilização do espaçador	p-ATP	1,0 mmol L^{-1}
		1,5 mmol L^{-1}
		2,0 mmol L^{-1}
Lavagem	2x SSPE	300

3.4.5.2 Hibridização do alvo com SP

A hibridização do elemento de bioreconhecimento com o analito de forma a minimizar interações não específicas requer um pré-tratamento, que consiste na hibridização parcial do analito com a SP. Tal como referido na secção 1.5.4.1.2.3, esta hibridização confere rigidez à cadeia alvo e mantém uma das extremidades da porção alvo livre para se ligar à CP imobilizada na superfície transdutora. Este passo é essencial na hibridização com os produtos de PCR, uma vez que estes se encontram sob a forma de cadeia dupla. A hibridização é realizada para todos os analitos estudados ao longo deste trabalho, isto é, o alvo sintético, os produtos de PCR de extratos de variedades de avelã e os produtos de PCR de extratos de misturas modelo de avelã em trigo. As soluções padrão com alvo sintético foram preparadas através de diluições seriadas, com concentrações entre $1,00 \times 10^{-18}$ mol L⁻¹ e $1,00 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹, e cada uma delas com uma concentração de $0,15 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SP. As soluções padrão com o analito, nomeadamente produtos de PCR de avelã foram preparadas nas mesmas condições, contudo com concentrações entre $1,00 \times 10^{-19}$ mol L⁻¹ e $1,00 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹. Os produtos de PCR dos extratos de misturas modelo de avelã em trigo foram preparadas considerando a concentração de SP ($0,15 \mu\text{mol L}^{-1}$) e 2x SSPE, nos volumes necessários para as concentrações pretendidas. A *signalling probe* é utilizada em excesso para que a extensão da sua hibridização com o analito seja garantida e maximizada.

As soluções foram posteriormente aquecidas até atingir a temperatura de 98 °C, durante 5 minutos, recorrendo a um termociclador. De seguida, as soluções foram colocadas num banho de gelo por 5 minutos, e finalmente armazenadas a 4 °C (no frigorífico) até serem utilizadas. As soluções de alvo sintético foram utilizadas num período máximo de 5 dias após serem preparadas, enquanto as soluções de produtos de PCR são utilizadas no mesmo dia em que foram preparadas.

3.4.5.3 Performance analítica do genossensor

A avaliação da performance analítica foi realizada através do registo do ângulo SPR em função das concentrações crescentes do analito adicionado. O método foi inicialmente otimizado com o analito sintético e posteriormente testado com os produtos de PCR amplificados a partir dos extratos de avelã.

Inicialmente, estabeleceu-se a linha de base, fazendo passar a solução tampão 2x SSPE na superfície do sensor. Após completa estabilização procedeu-se à adição da porção alvo hibridizada com a SP (SP-Tp ou SP-Tg), seguida de uma série de três limpezas com 2x SSPE. Na Figura 11 encontra-se representado o sensograma

registado relativo aos vários passos envolvidos na performance analítica do genossensor.

A variação do ângulo resultante da adição da porção alvo é calculada através da subtração do valor da linha de base determinado inicialmente (através da passagem de 2x SSPE no sistema), ao valor do ângulo resultante da adição da porção alvo de Cor a 14 (sintético/produtos de PCR). A curva de calibração consiste assim na representação desta variação de ângulo de ressonância causada pela adição de cada padrão em função do logaritmo da concentração desse mesmo padrão.

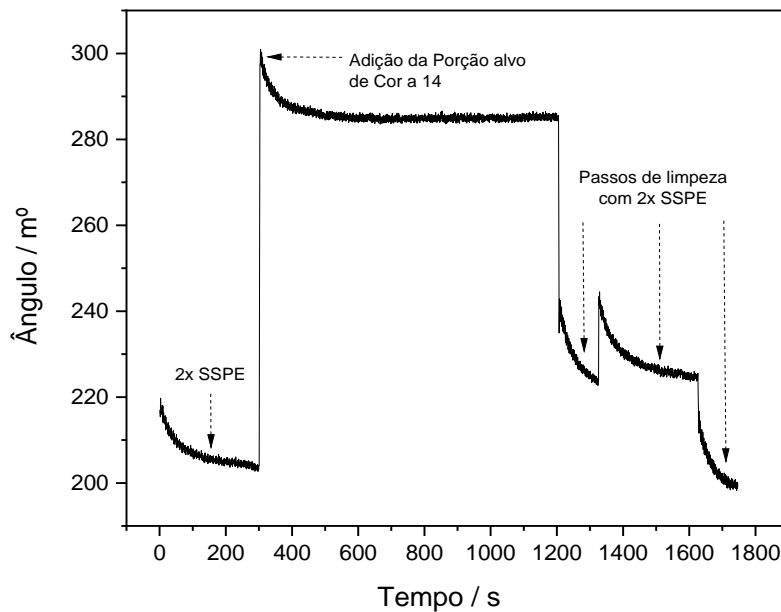


Figura 11. Sensograma representativo dos passos de performance analítica do genossensor.

Na Tabela 11 encontram-se os parâmetros experimentais (tempo) para cada um dos passos da avaliação da performance analítica, assim como as soluções utilizadas.

Tabela 11. Etapas da análise da performance analítica, respetivas soluções utilizadas e respetivos tempos de duração.

Etapa	Solução	Tempo/s
Linha de base	2x SSPE	300
Hibridização [SP-Tp]-CP ou [SP-Tg]-CP	[SP-Tp] ou [SP-Tg]	900
Lavagem	2x SSPE	120 + 300 + 120

3.4.6 Aplicação do genossensor em produtos de PCR (avelã)

Uma vez otimizados todos os parâmetros experimentais, testou-se o genossensor em amostras reais. Inicialmente estudou-se a performance analítica do genossensor em extratos de avelãs de diferentes variedades. De seguida, avaliou-se a aplicabilidade do genossensor com produtos de PCR obtidos a partir de uma matriz alimentar, neste caso, em misturas modelo de avelã em massa de trigo (esparguete).

Numa tentativa de maximizar a performance analítica do sistema, tal como referido na secção 1.5.4.1.2.2, recorreu-se a uma estratégia de pré-tratamento de amostra, nomeadamente a extração de ADN seguida de amplificação por PCR. Assim, todas as amostras (quer de variedades de avelã, quer de misturas modelo de avelã em massa de trigo) sofreram extração como descrito na secção 3.4.1, seguida por PCR qualitativa para extratos com concentrações de 50 ng mL⁻¹, tal como descrito na secção 3.4.3.

3.4.6.1 Aplicação em amostras de avelã

Neste estudo foram consideradas amostras de oito variedades diferentes de avelã (Tabela 12). As soluções padrão correspondentes a cada uma das variedades de avelã, foram preparadas por diluições seriadas dos respetivos produtos resultantes da PCR, com concentrações finais obtidas entre 1,00x10⁻¹⁹ mol L⁻¹ e 1,00x10⁻⁹ mol L⁻¹ (0,1 attomol L⁻¹ – 1 nanomol L⁻¹) + 0,15 µmol L⁻¹ de SP. O estudo da performance analítica do sistema foi seguido considerando o protocolo estabelecido na secção 3.4.5.

Tabela 12. Variedades de avelã estudadas neste trabalho.

Variedade de avelã
Paelet
Segorbe
Santa Maria de Jésus
Couplà
Camponica
Cosford
Gunslebert
Avelã comercial (Italiana)

3.4.6.2 Aplicação em misturas modelo de avelã em massa de trigo

Para a aplicação do genossensor numa matriz alimentar, prepararam-se 10 misturas modelo de avelã em massa de trigo (esparguete constituída por sêmola de trigo duro, podendo conter vestígios de ovo), com níveis de concentração entre 10-500.000 mg kg⁻¹ (Tabela 13). As sementes de avelã foram removidas da casca e moídas

com recurso a um moinho de facas de laboratório Grindomix GM200 (Retsch, Haan, Alemanha). Para a primeira mistura modelo ($500.000 \text{ mg kg}^{-1}$), 100 g de avelã foram adicionadas a 100 g de material de trigo (massa) e misturados vigorosamente, para garantir uma boa homogeneização da mistura. As seguintes misturas foram obtidas por diluição seriada da primeira mistura em massa de trigo, através de adições sucessivas de material de trigo até ao último nível, 10 mg kg^{-1} . Depois de preparadas, as misturas modelo foram armazenadas em frascos de plástico (Figura 12) e congeladas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ até serem utilizadas.

Tabela 13. Proporções de avelã e de massa de trigo utilizadas na preparação das misturas modelo.

Porcentagem de avelã em massa de trigo	Avelã em massa de trigo/ mg kg^{-1}
50	500.000
10	100.000
5	50.000
1	10.000
0,5	5.000
0,1	1.000
0,05	500
0,01	100
0,005	50
0,001	10

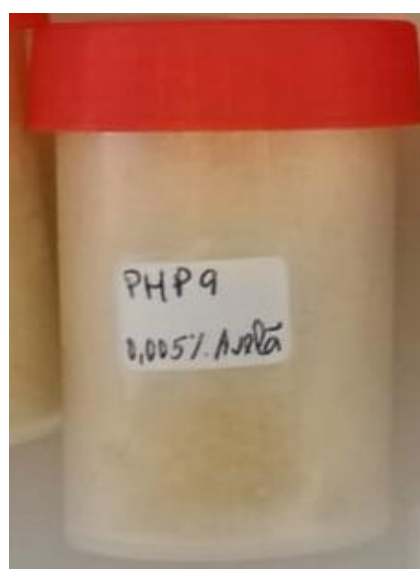
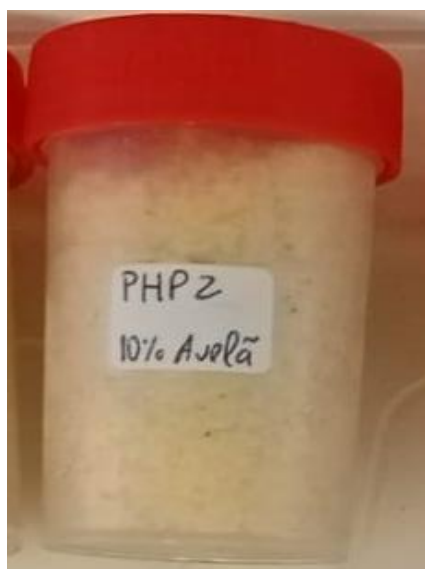


Figura 12. Exemplos de misturas modelo de avelã em massa de trigo utilizadas (10% de avelã em massa de trigo; 0,005% de avelã em massa de trigo).

As adições das amostras à *cuvette* do SPR são realizadas em volumes de 50 μL . Assim, a PCR qualitativa foi realizada para um volume final de 100 μL , de forma obter volume de amostra suficiente para os 2 canais. Adicionou-se SP (para uma concentração final de 0,15 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e 2x SSPE, de modo a obter a concentração pretendida.

Finalmente, foi seguido o protocolo descrito na secção 3.4.5, sendo que os produtos de PCR foram adicionados no sentido de aumento em percentagem de avelã na massa do produto total.

Tabela 14. Quantidade de reagentes utilizados para cada par de *primers* da PCR qualitativa.

Reagentes (μL)	<i>Primers</i>
	Cor 14-F _{geno} /Cor 14-R
Água de PCR	67,2
Tampão c/Mg	10
MgCl ₂	2,0
dNTP	8,0
<i>Primer F</i>	2,0
<i>Primer R</i>	2,0
Taq	0,8
V _{ADN}	8,0
V _{TOTAL}	100,0

3.4.7 PCR em tempo real

Neste trabalho, desenvolveu-se um sistema de PCR em tempo real com recurso ao corante universal *EvaGreen*. Nesta reação, recorreu-se a uma mistura reacional com o volume final de 20 μL contendo água de PCR, 1x corante Sso Fast *Evagreen*[®] supermix (Biorad Laboratories, Hercules, CA, EUA), os *primers* Cor 14-F_{geno}/Cor 14-R e o extrato de ADN da mistura modelo de avelã em massa de trigo. A proporção de reagentes utilizados e o programa de temperaturas encontram-se descritos nas Tabela 15 e 16.

Tabela 15. Quantidade de reagentes utilizados para a PCR em tempo real com *EvaGreen*.

Reagentes	Volume (μL)
Água de PCR	6,8
Corante <i>EvaGreen</i>	10,0
<i>Primer</i> Cor 14-F _{geno}	0,6
<i>Primer</i> Cor 14-R	0,6
V _{ADN}	2,0
V Total	20,0

Tabela 16. Condições de temperatura utilizadas nas amplificações por PCR em tempo real com EvaGreen.

Primers Etapas		Cor 14-F_{geno} / Cor 14-R	
Desnaturação		95 °C	5 min
Amplificação	Desnaturação	95 °C	10 s
	Hibridização	62 °C	10 s
	Extensão	72 °C	20 s
Nº de ciclos		50	
Curva de desnaturação		95 °C	1 min
		65-95°C	0,2 °C/10 s

Foi ainda incluído um controlo negativo, com objetivo de garantir a ausência de contaminações durante a preparação do ensaio. A PCR em tempo real foi aplicada às misturas modelo de avelã em trigo, funcionando essencialmente como ferramenta de validação do genossensor.

4. Resultados e discussão

4.1 Avaliação da qualidade dos extratos

Inicialmente, foram selecionadas diferentes espécies de plantas, com o intuito de testar experimentalmente a especificidade dos *primers* Cor 14-F_{geno}/ Cor 14-R. Esta seleção foi feita com base na proximidade genética com a espécie alvo (avelã) e com a probabilidade de existência das mesmas em matrizes alimentares, incluindo diversos frutos de casca rijá, cereais/sementes, entre outros. Após a extração do ADN das espécies determinou-se a concentração e capacidade de amplificação dos extratos. Apesar dos parâmetros de concentração poderem ser os adequados, é necessário testar a capacidade de amplificação dos extratos, de forma a evitar que existam falsos negativos. Para tal, os extratos foram amplificados por PCR qualitativa com recurso a *primers* com alvo numa região eucariota universal. Atualmente, não existe um conjunto de *primers* que seja totalmente universal para todas as espécies, pelo que se pode recorrer a mais do que um conjunto de *primers* para assegurar uma boa avaliação dos extratos, nomeadamente os *primers* EG-F/EG-R, 18SRG-F/18SRG-R e 18SEU-F/18SEU-R.

Através da Figura 13 é possível observar que ocorreu amplificação da maioria dos extratos com os *primers* EG-F/EG-R, como era desejável. Por outro lado, espécies como a noz e o arroz originaram bandas menos intensas que as restantes. Já o extrato de noz pecã não sofreu qualquer amplificação nesta região eucariota. Posto isto, surgiu a necessidade de testar estas 3 espécies com *primers* com alvo numa nova região eucariota universal: 18SRG.

Após pesquisa mais aprofundada, acrescentaram-se novas espécies ao estudo de reatividade cruzada (castanha, feijão, grão-de-bico e ervilha), expandindo assim o leque de espécies para um total de 38 (a totalidade de espécies estudadas encontram-se descritas na Tabela 17). Na Figura 14 observa-se que para todas as novas espécies estudadas ocorreu a amplificação dos respetivos extratos, no entanto, os extratos de noz e de noz pecã continuaram a não amplificar. Posto isto, realizou-se uma nova extração de ADN em amostras de noz e noz pecã, e testou-se ainda com um terceiro par de *primers* de eucariota: 18SEU-F/R. Finalmente, os extratos de noz e de noz pecã amplificaram com este terceiro par de *primers*, como é possível observar na Figura 15.

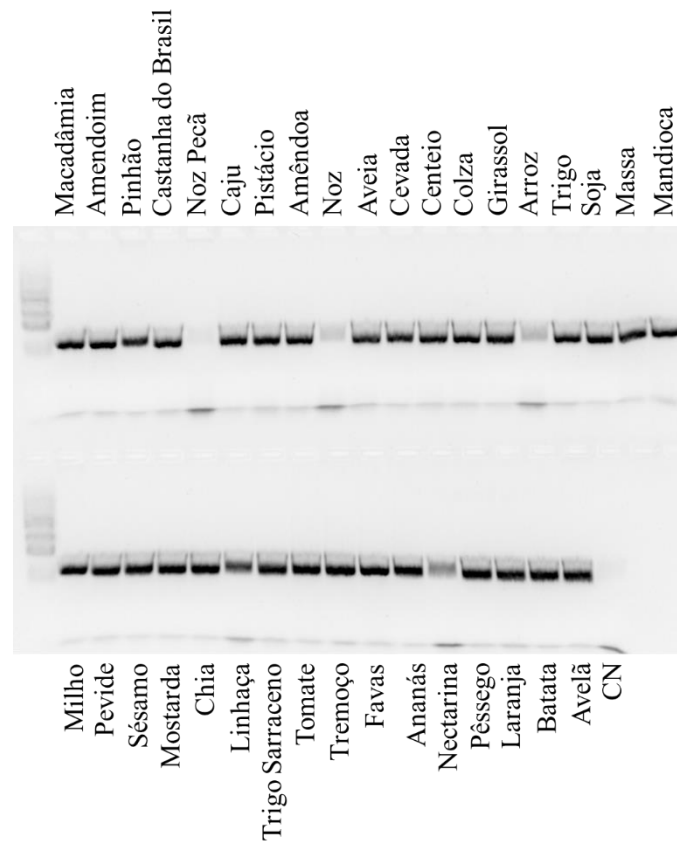


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* EG-F/EG-R (109 pb), para extratos de espécies a serem testados na avaliação da reatividade cruzada.

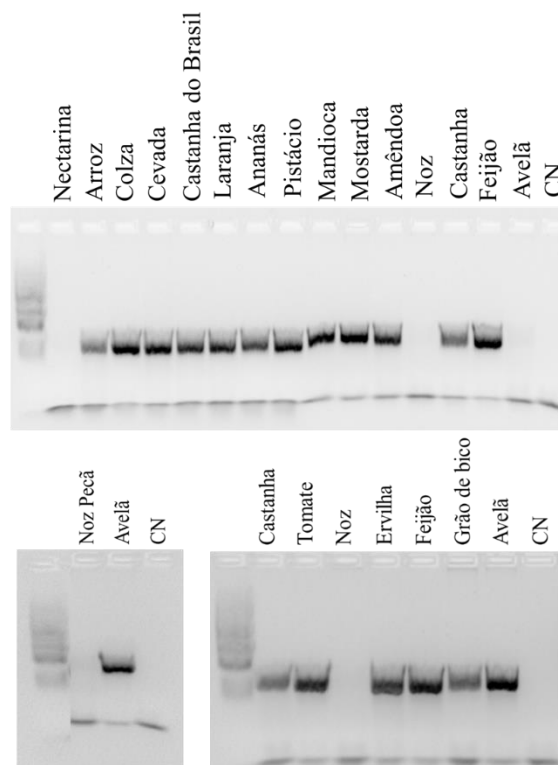


Figura 14. Eletroforeses em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* 18SRG-F/18SRG-R (113 pb), para extratos de espécies a serem testados na avaliação da reatividade cruzada.

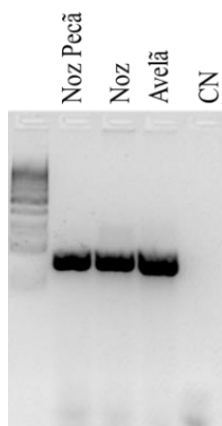


Figura 15. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* 18SEU-F/18SEU-R (140 pb), para os extratos de noz e noz pecã a serem testados na avaliação da reatividade cruzada.

Uma vez testados os extratos das espécies selecionadas, foi possível confirmar que em todos ocorreu uma amplificação por PCR para pelo menos um dos pares de *primers* com alvo numa região eucariota universal (EG, 18SRG ou 18SEU). Assegurou-se assim a capacidade de amplificação dos extratos, e avançou-se com os mesmos para os testes de reatividade cruzada.

4.2 Otimização das condições da PCR qualitativa para Cor a 14

A PCR qualitativa, específica para a região alvo que codifica a Cor a 14, exigiu a otimização das suas condições experimentais, nomeadamente a seleção de uma temperatura de hibridização dos *primers*, de modo a maximizar a extensão da reação de amplificação. Sendo o mais habitual a utilização da média destas temperaturas, foram estudadas três temperaturas como potenciais escolhas: 57 °C, 59 °C e 61 °C. Foi realizada uma PCR qualitativa em gradiente, para cada temperatura com seis diluições de um mesmo extrato inicial de ADN de avelã (50 mg L⁻¹), com concentrações finais de 100 ng L⁻¹, 10 ng L⁻¹, 1 ng L⁻¹, 0,1 ng L⁻¹, 0,01 ng L⁻¹ e 0,001 ng L⁻¹ (Figura 16).

Os resultados obtidos, representados na Figura 16, sugerem que quanto mais elevada a temperatura utilizada no passo de amplificação destes *primers*, maior o rendimento da reação de amplificação, corroborado pelo aparecimento de uma banda para a concentração de 1 pg à temperatura de 61 °C, que não está presente às outras temperaturas. Posto isto, a temperatura selecionada foi de 62 °C, sendo a mesma aplicada no decorrer do restante trabalho, em todas as PCR qualitativas realizadas com os *primers* Cor a 14.

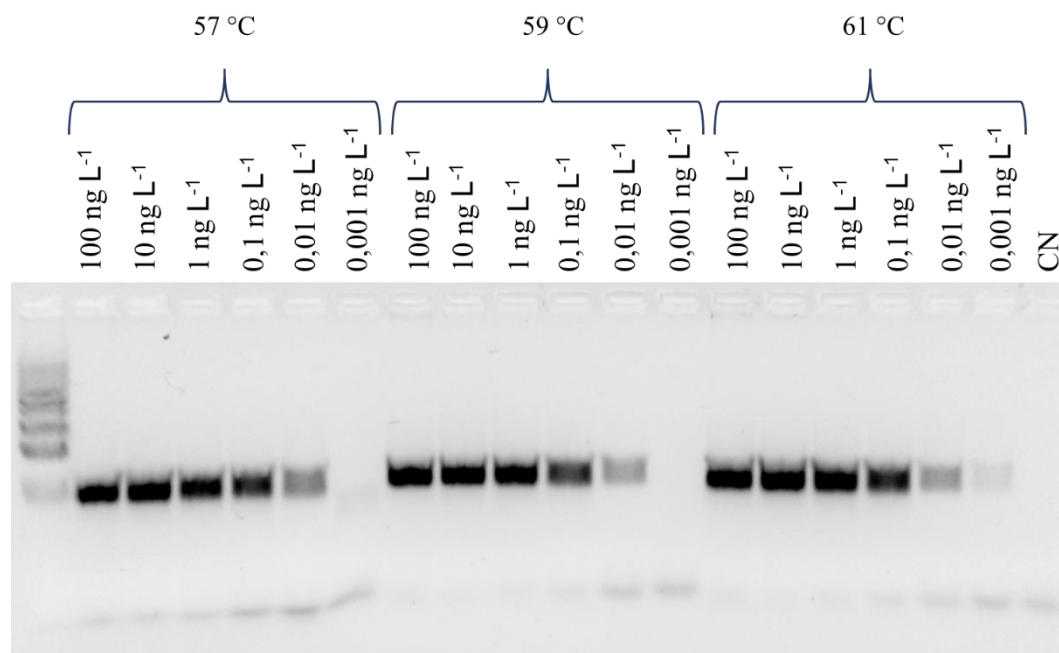


Figura 16. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Cor 14-F_{geno}/Cor 14-R para várias concentrações de extratos de avelã, a diferentes temperaturas para otimização da temperatura de amplificação.

4.3 Estudos de reatividade cruzada (especificidade dos *primers*)

Uma vez garantida a qualidade dos extratos das espécies, e otimizadas as condições experimentais da PCR, procedeu-se à avaliação da especificidade dos *primers* Cor 14-F_{geno}/Cor 14-R. Numa fase inicial, doze das espécies testadas apresentaram bandas muito ténues na presença dos *primers* Cor 14-F_{geno}/Cor 14-R. Isto ocorreu para os extratos de mostarda, tomate, ananás, laranja, castanha do Brasil, pistácio, amêndoa, noz, cevada, colza, arroz e mandioca, como é possível observar na Figura 17 através de aparecimento de bandas na zona dos 86 pb.

De forma a confirmar se as bandas ténues podiam ter sido originadas pela existência de potenciais reatividades cruzadas, foram feitas novas diluições a partir dos extratos para estas espécies e repetiu-se a PCR qualitativa. Com as novas diluições, não ocorreu amplificação para nenhuma das espécies testadas o que confirmou a suspeita inicial de uma contaminação acidental, e simultaneamente provou a inexistência de reatividade cruzada destas espécies (Figura 18).

Uma vez avaliadas todas as espécies selecionadas, o par de *primers* Cor 14-F_{geno}/Cor 14-R foi considerado específico para o alvo avelã, sendo utilizados para prosseguir com o trabalho.

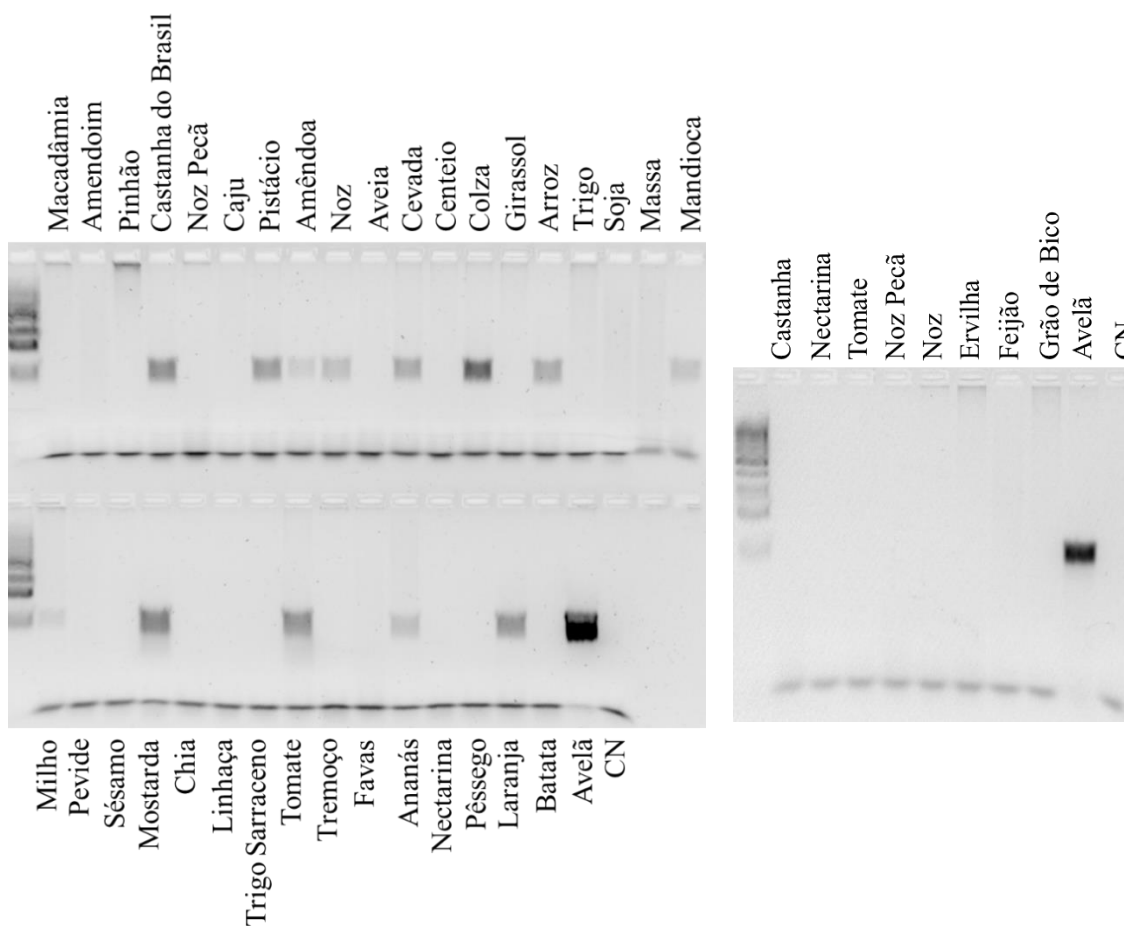


Figura 17. Eletroforeses em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Cor 14-F_{geno}/Cor 14-R dos extratos das amostras de reatividade cruzada.



Figura 18. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Cor 14-F_{geno}/Cor 14-R dos extratos das amostras de reatividade cruzada.

Na Tabela 17 encontra-se um resumo dos resultados obtidos para a PCR qualitativa dos extratos das trinta e nove espécies em estudo (incluindo o alvo avelã), para os quatro pares de *primers*: 18SRG-F/R, EG-F/R, 18SEU-F/R e Cor 14-F_{geno}/Cor 14-R. O sinal (+) indica que ocorreu amplificação do extrato, o sinal (-) indica que não ocorreu amplificação do extrato, e os espaços a cinza representam valores em falta (no caso dos *primers* da zona eucariota, para garantir que os extratos são amplificáveis, só é necessária amplificação com um dos pares de *primers* de eucariota).

Tabela 17. Resumo das PCR qualitativas para os pares de primers 18 SRG F/R, EG F/R e Cor 14-F_{geno}/Cor 14-R (* 18SEU-F/R).

	Espécie	EG-F/R	18SRG-F/R (ou 18SEU-F/R)	Cor 14-F _{geno} / Cor 14-R
Frutos Secos	Avelã	+	+	+
	Amendoim	+		-
	Castanha do Brasil	+	+	-
	Noz pecã	-	+	-
	Pinhão	+		-
	Pistácio	+	+	-
	Amêndoa	+	+	-
	Macadâmia	+		-
	Caju	+		-
	Castanha		+	-
	Noz	+	+	-
	Frutas	Ananás	+	+
Nectarina		+	-	-
Laranja		+	+	-
Pêssego		+		-
Tomate		+	+	-
Cereais / Sementes	Trigo	+		-
	Centeio	+		-
	Cevada	+	+	-
	Colza	+	+	-
	Girassol	+		-
	Sésamo	+		-
	Linhaça	+		-
	Trigo Sarraceno	+		-
	Chia	+		-
	Milho	+		-
	Pevide	+		-
	Arroz	+	+	-
	Aveia	+		-
Leguminosas	Favas	+		-
	Feijão		+	-
	Grão de bico		+	-
	Tremoço	+		-
	Ervilha		+	-
Outros	Soja	+		-
	Batata	+		-
	Mandioca	+	+	-
	Massa	+		-
	Mostarda	+	+	-

4.4 Otimização das condições experimentais do genossensor

Elaborou-se um protocolo de otimização da performance analítica do genossensor com recurso a cadeias de ADN alvo sintético. Para isso, fez-se variar a concentração dos elementos CP e p-ATP (os principais componentes do elemento de bioreconhecimento) de forma a avaliar o seu efeito na sensibilidade, linearidade e intervalo dinâmico de resposta linear do genossensor. Foram estudados quatro valores de concentração para a CP (0,25, 0,5, 0,75 e 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$), e três valores de concentração para o p-ATP (1,0, 1,5 e 2,0 mmol L^{-1}).

4.4.1 Otimização da concentração de CP

Avaliou-se o efeito da concentração de CP através da realização de 4 tipos de ensaio, para 4 concentrações distintas de CP (0,25, 0,50, 0,75 e 1,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$), onde as restantes condições experimentais permaneceram constantes (concentração de p-ATP 1,5 mmol L^{-1} e concentração de SP 0,15 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Os sensogramas obtidos para a imobilização de cada uma das concentrações de CP utilizadas encontram-se representados na Figura 19A. As curvas de calibração, obtidas por interação do elemento de bioreconhecimento com as diferentes concentrações de alvo sintético Cor a 14 (1,00x10⁻¹⁵ mol L^{-1} e 1,00x10⁻⁹ mol L^{-1}), encontram-se representadas na Figura 19B. Os respetivos parâmetros analíticos (declive, ordenada na origem, coeficiente de correlação e intervalo linear de resposta) encontram-se representados na Tabela 18.

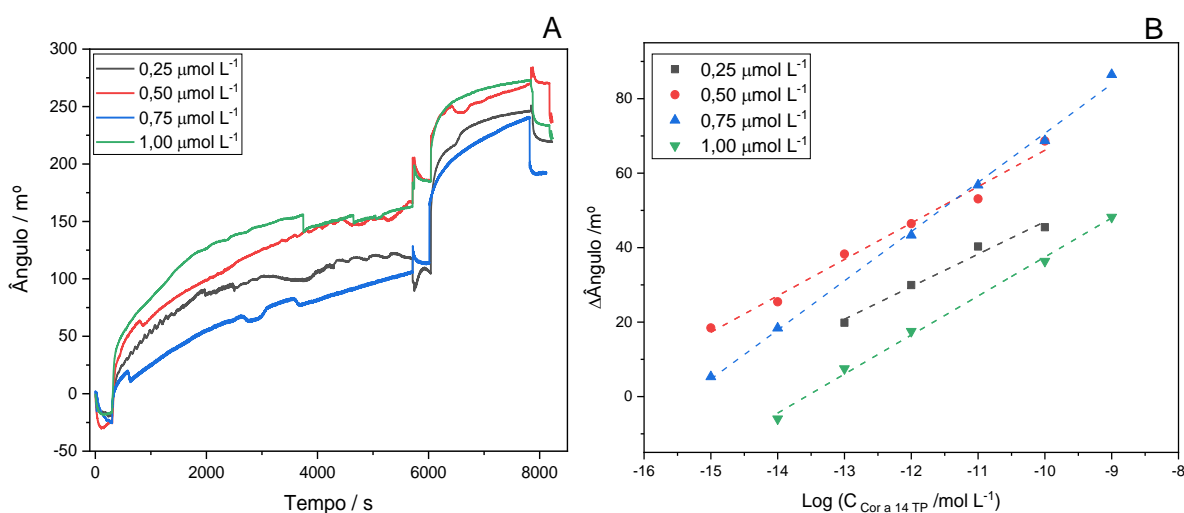


Figura 19. A) Sensogramas obtidos para a imobilização no disco de ouro do SPR de 0,25, 0,5, 0,75 e 1,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CP, seguida da imobilização de p-ATP 1,5 mmol L^{-1} . **B)** Curvas de calibração obtidas para a imobilização no disco de ouro do SPR de 0,25, 0,5, 0,75 ou 1,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CP seguida da imobilização de p-ATP 1,5 mmol L^{-1} (num intervalo analítico de 1,00x10⁻¹⁵ mol L^{-1} a 1,00x10⁻⁹ mol L^{-1} de alvo sintético Cor a 14).

Tabela 18. Parâmetros analíticos (declive, ordenada na origem, R^2 e intervalo linear) das curvas de calibração obtidas para as diferentes concentrações de CP.

Concentração CP ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Declive ($\text{m}^\circ \text{década}^{-1}$)	Ordenada na origem (m°)	R^2	Intervalo de linearidade (mol L^{-1})
0,25	$8,73 \pm 0,87$	$134,27 \pm 10,05$	0,9805	$1,00 \times 10^{-13}$ a $1,00 \times 10^{-10}$
0,50	$9,77 \pm 0,57$	$163,86 \pm 7,23$	0,9864	$1,00 \times 10^{-15}$ a $1,00 \times 10^{-11}$
0,75	$15,06 \pm 0,73$	$221,50 \pm 8,10$	0,9974	$1,00 \times 10^{-15}$ a $1,00 \times 10^{-9}$
1,00	$10,48 \pm 0,36$	$142,28 \pm 4,28$	0,9964	$1,00 \times 10^{-14}$ a $1,00 \times 10^{-9}$

A adição da porção alvo sintética de ADN da Cor a 14 aos elementos de bioreconhecimento contendo diferentes concentrações de CP apresentaram resposta linear relativamente à variação do ângulo de refração ($\Delta\text{ângulo}/\text{m}^\circ$) em função do logaritmo da concentração de porção alvo sintético de Cor a 14.

Comparando os perfis de imobilização representados na Fig.19 A, verifica-se que o $\Delta\text{ângulo}$ aumenta com o aumento da concentração da CP ($0,25 \rightarrow 0,50 \rightarrow 1,00 \mu\text{mol L}^{-1}$), contudo a imobilização da concentração de $0,75 \mu\text{mol L}^{-1}$ dá origem a um valor mais baixo de $\Delta\text{ângulo}$ de SPR. A correlação encontrada entre a concentração de CP e a performance analítica do genossensor (Figura 19B) permite concluir que o mínimo obtido $\Delta\text{ângulo}$ durante a imobilização da CP permitirá obter uma sensibilidade mais elevada. Em particular, a imobilização de $0,75 \mu\text{mol L}^{-1}$ apresentou a sensibilidade mais elevada, com um valor de $15,06 \text{ m}^\circ \text{década}^{-1}$, o coeficiente de correlação mais elevado, com um valor de 0,9974, e uma resposta linear em todo o intervalo de concentrações de alvo estudada ($1,00 \times 10^{-15}$ a $1,00 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$). Estas condições experimentais permitiram obter uma sensibilidade aproximadamente 2x mais elevada comparativamente com a concentração mais baixa de CP considerada ($0,50 \mu\text{mol L}^{-1}$) e 0,5x comparativamente com a concentração mais elevada de CP ($1,00 \mu\text{mol L}^{-1}$).

4.4.2 Otimização da concentração de espaçador lateral

Após se seleccionar a concentração de CP que permitiu obter a performance analítica mais elevada do sensor ($0,75 \mu\text{mol L}^{-1}$), o passo seguinte consistiu na otimização da concentração do espaçador lateral considerado na construção do elemento de bioreconhecimento. Para o presente estudo considerou-se 3 concentrações de p-ATP (1,0, 1,5 e $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$). A concentração de SP considerada neste passo foi novamente $0,15 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os sensogramas obtidos para cada uma das concentrações de p-ATP encontram-se representados na Figura 20A. As respetivas curvas de calibração obtidas encontram-se representadas na Figura 20B, cujos parâmetros analíticos (declive, ordenada na origem, coeficiente de correlação e intervalo de linearidade das curvas de calibração) se encontram descritos na Tabela 19.

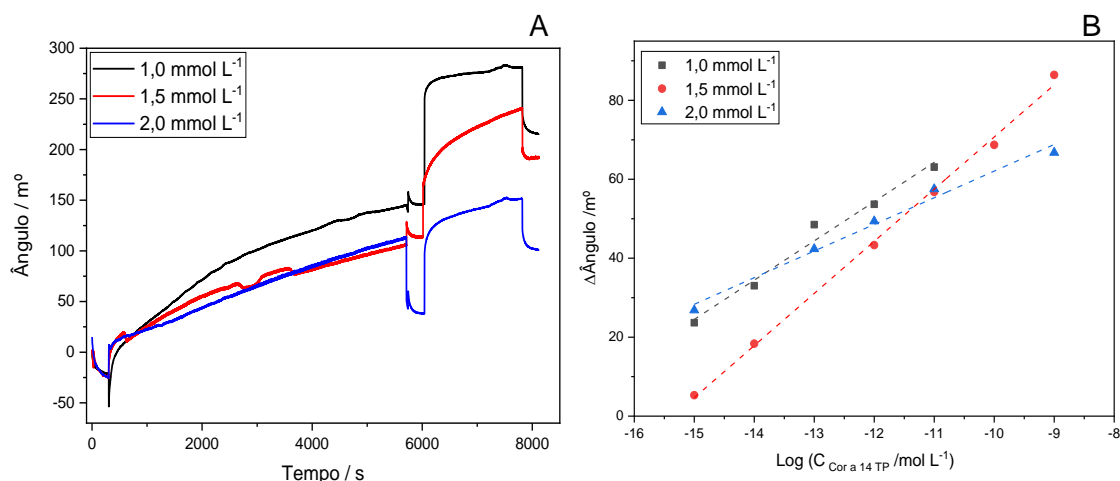


Figura 20. A) Sensorgramas obtidos para a imobilização no disco de ouro do SPR de 0,75 de CP $\mu\text{mol L}^{-1}$, seguida da imobilização de 1,0, 1,5 e 2,0 mmol L^{-1} de p-ATP. **B)** Curvas de calibração obtidas para a imobilização no disco de ouro do SPR de 0,75 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de CP seguida da imobilização de p-ATP 1,0, 1,5 ou 2,0 mmol L^{-1} (num intervalo analítico de $1,00 \times 10^{-15} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,00 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ de alvo sintético Cor a 14).

Tabela 19. Parâmetros analíticos (declive, ordenada na origem, R^2 e intervalo linear) das curvas de calibração obtidas para as diferentes concentrações de p-ATP.

Concentração p-ATP (mmol L^{-1})	Declive ($\text{m}^\circ \text{ década}^{-1}$)	Ordenada na origem (m°)	R^2	Intervalo linear (mol L^{-1})
1,0	$9,94 \pm 0,84$	$173,67 \pm 11,05$	0,9788	$1,00 \times 10^{-15}$ a $1,00 \times 10^{-11}$
1,5	$15,06 \pm 0,73$	$221,50 \pm 8,10$	0,9974	$1,00 \times 10^{-15}$ a $1,00 \times 10^{-9}$
2,0	$6,75 \pm 0,45$	$129,55 \pm 5,50$	0,9867	$1,00 \times 10^{-15}$ a $1,00 \times 10^{-9}$

Comparando os três elementos de bioreconhecimento construídos, aquele no qual se utilizou a solução de p-ATP com concentração $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ apresentou a melhor performance analítica, com sensibilidade de $15,06 \text{ m}^\circ \text{ década}^{-1}$, coeficiente de correlação de 0,9974, e um intervalo linear de resposta de $1,00 \times 10^{-15} - 1,00 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ ($1 \text{ fmol L}^{-1} - 1 \text{ nmol L}^{-1}$) de analito. Portanto, verifica-se que todos os parâmetros avaliados foram otimizados para a concentração intermédia de espaçador lateral de $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$. A concentração baixa do espaçador lateral ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$) poderá favorecer um aumento da mobilidade lateral das cadeias da CP imobilizadas na superfície do sensor Au-SPR, podendo assim promover a formação de agregados de ADN. Consequentemente, as cadeias passariam a estar menos disponíveis para hibridizar com o analito alvo. Por outro lado, um excesso de espaçador lateral poderá levar a uma acumulação excessiva de p-ATP na superfície do transdutor, promovendo assim a possível libertação da CP inicialmente imobilizada. Este processo favorecerá a diminuição na eficiência da imobilização da CP na superfície, inibindo assim a hibridização com o alvo.

4.4.3 Determinação dos parâmetros analíticos da curva de calibração (alvo Cor a 14 sintético)

Os parâmetros da performance analítica, em particular o LOD (limite de deteção) do genossensor foram determinados para o intervalo de concentrações de Cor a 14 compreendidos entre $1,00 \times 10^{-18}$ e $1,00 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹. Na Figura 21A estão representados os sensogramas obtidos a partir da adição com concentração crescente de Cor a 14. Na Figura 21B encontra-se representada a curva de calibração obtida tendo em conta um quadruplicado da medição, cujo erro se apresenta sob a forma de uma barra de erro ($\pm 5,0\%$). Na Tabela 20 estão representados os parâmetros analíticos obtidos a partir da curva de calibração representada na Figura 21B, em particular, a sensibilidade, ordenada na origem, coeficiente de correlação, intervalo de linearidade, limite de deteção. A hibridização da cadeia alvo da Cor a 14 (sintética) em 2XSSPE pH 7,4 com a cadeia complementar (CP) imobilizada na superfície de ouro (Au-SPR) provocou um deslocamento de $23,15 \pm 1,13$ m⁰ década⁻¹ no índice de refração da interface metálica.

O limite de deteção foi calculado através do método usado para os eléctrodos seletivo, seguindo as recomendações da International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) [107]. Neste método, são identificados dois ritmos de crescimento na curva de calibração e a sua interceção corresponde ao limite de deteção do método. Neste caso, foi obtido um LOD de $1,99 \times 10^{-17}$ mol L⁻¹ (19,9 amol L⁻¹).

As interações inespecíficas do alvo com a superfície do sensor foram avaliadas através da construção de um controlo, isto é, pela construção de um elemento de bioreconhecimento onde não se incluiu a etapa de imobilização da CP. De seguida, seguiu-se o procedimento de adição das soluções padrão com concentração crescente contendo as cadeias alvo de Cor a 14 sintética (representado através do inset na Figura 21B).

Tabela 20. Parâmetros analíticos (declive, declive do quadruplicado, ordenada na origem, R², intervalo linear e LOD) da curva de calibração representada na Figura 21.

Declive (m⁰ década⁻¹)	23,15 ± 1
Ordenada na origem (m⁰)	430,41 ± 15
R²	0,9929
Intervalo dinâmico de resposta linear (mol L⁻¹)	$1,00 \times 10^{-16}$ a $1,00 \times 10^{-10}$
Limite de deteção (LOD)	19,9 amol L ⁻¹ / $1,99 \times 10^{-17}$ mol L ⁻¹

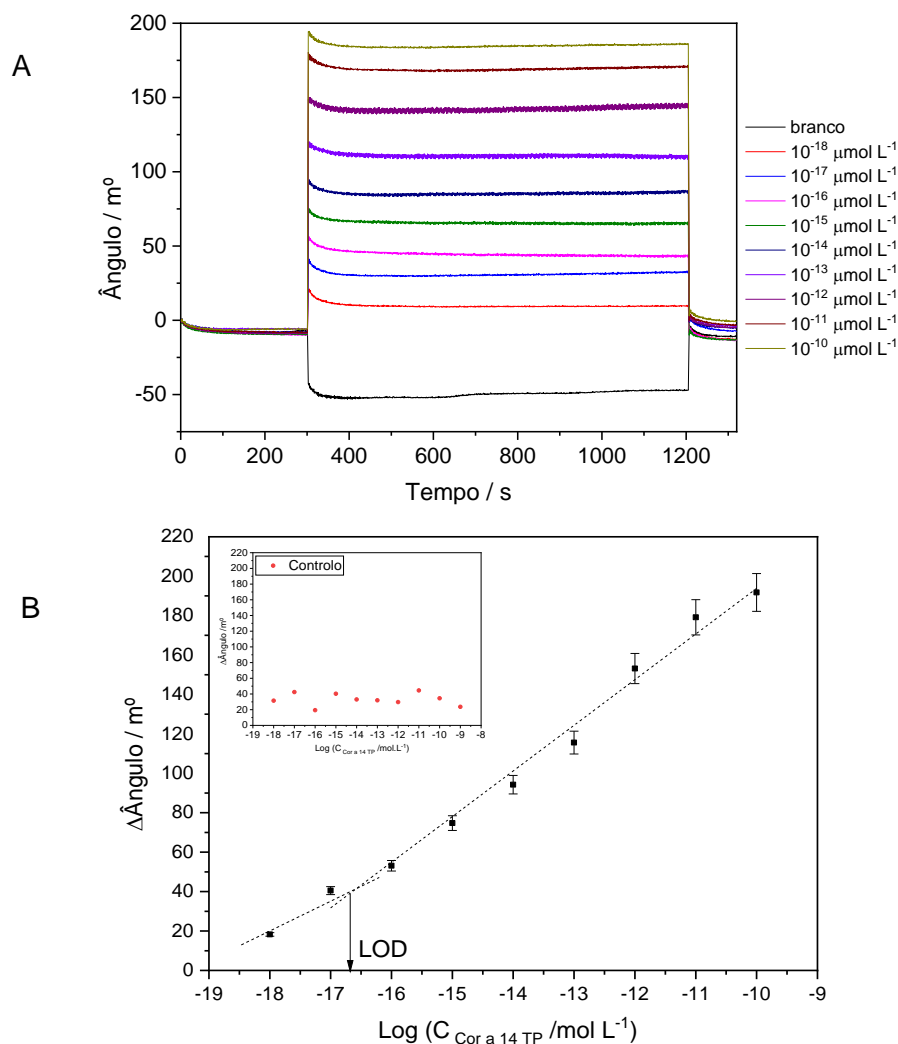


Figura 21. A) Sensogramas obtidos para a performance analítica do genossensor construído com 0,75 μmol L⁻¹ de CP e 1,5 mmol L⁻¹ de p-ATP, para um intervalo de concentrações de Cor a 14 entre 1,00x10⁻¹⁸ μmol L⁻¹ e 1,00x10⁻¹⁰ μmol L⁻¹ e **B)** respectiva curva de calibração obtida com concentrações de alvo sintético entre [1,00x10⁻¹⁸ a 1,00x10⁻¹⁰] mol L⁻¹.

A resposta obtida no controlo é aleatória e não linear, isto é, independente da concentração de analito alvo adicionado, cujo valor varia entre os 19,38 m° e os 44,60 m°. Assumindo que os resultados se apresentam através de uma distribuição normal, o intervalo de valores para um grau de confiança de 95% é dado pela equação 1:

$$X_{médio} \pm 2 \times \sigma \quad \text{Equação 1}$$

A resposta obtida no controlo, para um total de 10 medições apresentou um valor médio ($X_{médio}$) de 33,01 m°, um desvio padrão (σ) de 7,68 m°. Deste modo, segundo a equação 1, a resposta obtida no controlo varia num intervalo de [17,64 – 48,37] m°.

Uma vez que o LOD corresponde a uma resposta de $[43,78 \pm 5\%]$, sendo 5% o valor estimado para o erro obtido na reta de calibração, este equivale a uma resposta entre **[41,59 – 45,97] m⁰**. Assim, o LOD encontra-se contido no intervalo estimado para o sinal obtido no controlo, correspondente ao sinal relativo às interações inespecíficas, cuja contribuição foi considerada negligenciável.

4.5 Aplicação do genossensor a amostras de avelã

4.5.1 Performance analítica do genossensor – amostras de avelã (*Corylus avellana*)

Após a otimização das condições experimentais do sistema de deteção para o alvo sintético, foi essencial verificar se o bioreceptor sintético hibridiza com os produtos de PCR amplificados a partir de amostras reais, nomeadamente se hibridiza com produtos de PCR amplificados de avelã proveniente de diferentes variedades (Paeulet, Segorbe, Santa Maria de Jésus, Couplà, Camponica, Cosford, Gunslebert e Avelã comercial italiana). Para tal, estudou-se a performance analítica do sistema considerando as condições experimentais otimizadas na secção 4.4 para as oito variedades de avelã (Figura 22).

Analisando a Figura 22 e a Tabela 21 é possível observar que os sensores responderam à presença dos produtos de PCR das diversas variedades de avelã de forma linear para a variação de ângulo (m⁰) em função do logaritmo da concentração de alvo (Tg). O coeficiente de correlação (R²) variou entre 0,9726 e 0,9941, com sensibilidade a variar entre $12,01 \pm 0,49$ m⁰ década⁻¹ e $17,63 \pm 1,21$ m⁰ década⁻¹. Sendo assim, concluiu-se que o elemento de bioreconhecimento desenvolvido hibridiza com produtos de PCR amplificados em amostras reais, nomeadamente, com produtos PCR amplificados de diferentes variedades de avelã da espécie *Corylus avellana* (com a variedade Camponica e Cosford a apresentar as performances analíticas mais baixas).

Tabela 21. Parâmetros analíticos (declive, ordenada na origem, R² e intervalo linear) das curvas de calibração obtidas para as diferentes variedades de avelã.

Amostra de avelã	Declive (m ⁰ década ⁻¹)	Ordenada na origem (m ⁰)	R ²	Intervalo linear (mol L ⁻¹)
Paeulet	16,41 ± 0,52	325,47 ± 7,24	0,9941	1,00x10 ⁻¹⁹ a 1,00x10 ⁻⁹
Segorbe	17,26 ± 0,74	362,304 ± 11,05	0,9889	1,00x10 ⁻¹⁹ a 1,00x10 ⁻¹⁰
Santa Maria de Jésus	16,72 ± 0,52	352,77 ± 7,47	0,9914	1,00x10 ⁻¹⁹ a 1,00x10 ⁻⁹
Couplà	17,63 ± 1,21	349,77 ± 16,57	0,9726	1,00x10 ⁻¹⁸ a 1,00x10 ⁻⁹
Camponica	13,23 ± 0,57	268,27 ± 8,55	0,9889	1,00x10 ⁻¹⁹ a 1,00x10 ⁻¹⁰
Cosford	12,01 ± 0,49	270,74 ± 7,07	0,9884	1,00x10 ⁻¹⁹ a 1,00x10 ⁻¹⁰
Gunslebert	16,94 ± 0,68	341,23 ± 9,50	0,9903	1,00x10 ⁻¹⁹ a 1,00x10 ⁻⁹
Avelã comercial (Italiana)	14,20 ± 0,66	291,96 ± 9,62	0,9853	1,00x10 ⁻¹⁹ a 1,00x10 ⁻⁹

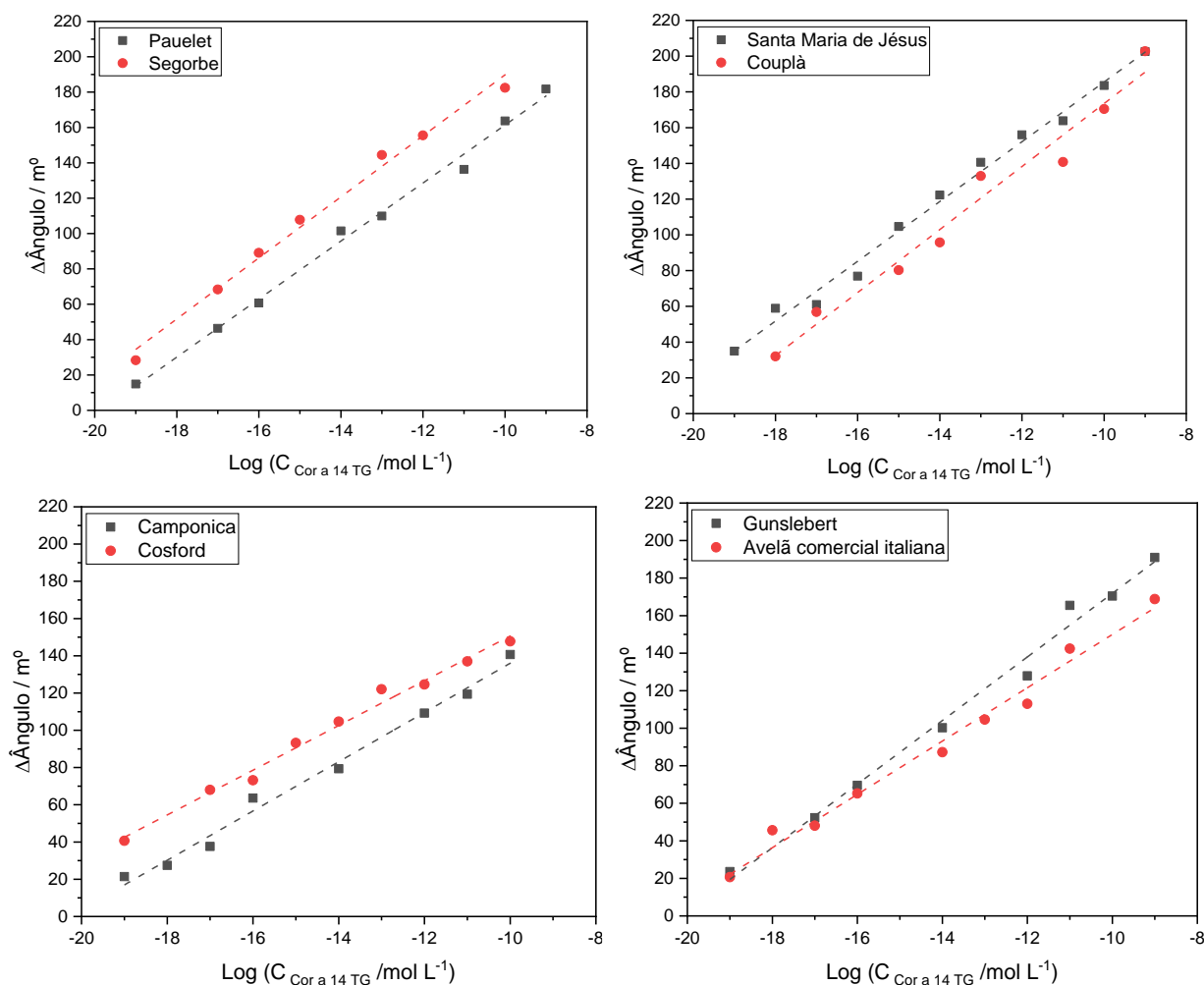


Figura 22. Curvas de calibração obtidas para as diferentes variedades de avelã, resultantes de uma imobilização de $0,75 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CP e de $1,5 \text{mmol L}^{-1}$ de p-ATP.²

Na Figura 23 estão representados graficamente os declives (média e respetivo intervalo definido pelo desvio padrão associado à média) correspondentes às curvas de calibração obtidas para as oito variedades de avelã (cujos valores se encontram na Tabela 21). Através da análise da Figura 23, é possível concluir que não existe diferença significativa entre os declives obtidos para as variedades Couplà, Segorbe, Gunslebert, Santa Maria de Jéus e Paualet, uma vez que existe interceção do intervalo de valores calculado para os respetivos declives (sensibilidade) destas 5 variedades de avelã. No entanto, os declives obtidos para variedades são estatisticamente diferentes dos obtidos para as variedades Camponica e Avelã comercial, que por sua vez são diferentes do declive obtido para variedade Cosford.

² De modo a facilitar a análise visual dos resultados, foram representadas 2 curvas de calibração por gráfico, evitando sobreposição das 8 curvas num único gráfico

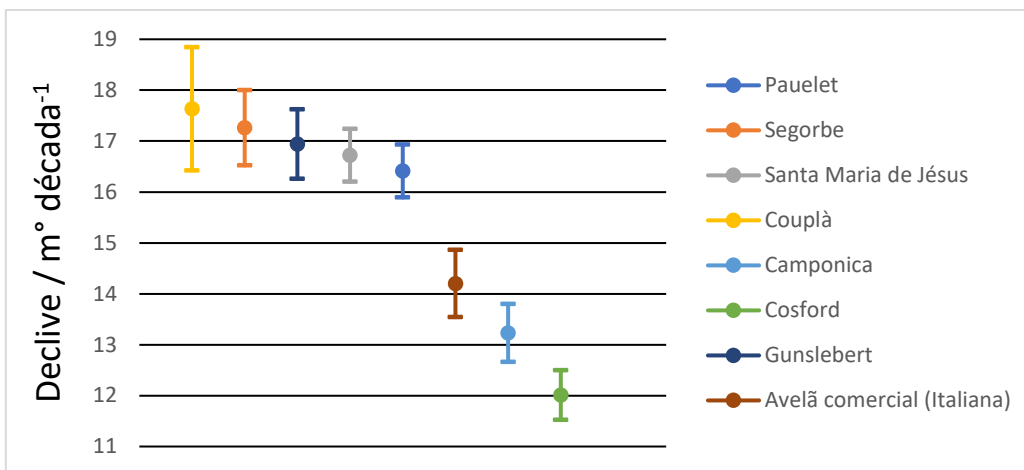


Figura 23. Declives das curvas de calibração obtidas para as oito variedades de avelã. Intervalo de valores obtido através da equação $m \pm \sigma_m$ (m - declive; σ_m - desvio padrão do declive da reta).

4.5.2 Efeito do tamanho da cadeia alvo (analito)

Neste estudo, o principal objetivo foi avaliar o efeito do tamanho da cadeia alvo no bioreconhecimento, e conseqüentemente na performance analítica do genossensor. Para tal, realizou-se a PCR para duas variedades de avelã: Santa Maria de Jesús e Gunslebert, utilizando um *primer* F diferente (Cor 14-F no lugar do Cor 14-F_{geno}), mantendo o *primer* R (Cor 14-R). De seguida, considerando as condições experimentais otimizadas na secção 4.4, estudou-se a performance analítica do sistema. Como é possível verificar através da Figura 24, a utilização deste novo *primer*, Cor 14-F, originou produtos na direção 5' da nossa porção alvo, correspondente à extremidade que hibridiza com a CP.

Cor 14-F _{geno} – 5' TTT CATAAGCAAGCACATCATCG 3'	vs	Cor 14-F – 5' AGGGT CACC GCTAGATATAAATGG 3'
Produto com 86 pares de bases	vs	Produto com 122 pares de bases
<pre> 5' ATGGCCAGACTCGCAACGCTAGCAGCTCTTTTTC CAGCCCTTTTGTGGTGGCGCATGCCGCTGCCTTC CGCACCACCATAACAACCGTGGACGTCGACGAGGA CATTGTGAACCAGCAGGGGCGCGAGGCGAGAGCT GCCGCGAGCAGGCTCAGCGTCAGCAGAACCTCAAC CAGTGCCAGCGGTACATGAGGCAGCAAAGCCAGTA CGGGAGTTACGATGGCAGCAACCAGCAGCAGCAGC AGGAACTTGAGCAGTGTGCCAACAGCTGAGGCAG ATGGACGAGCGGTGCCGATGTGAGGGTTGAGGCA GGCGGTAATGCAGCAGCAGGGTGAGATGCGAGGTG AGGAAATGAGGGAGGTTATGGAGACTGCTAGGGAC TTGCCAAATCAATGCCGCCTCAGCCCCAGCGCTG TGAGATTTCGCTCCGCAAGGTTCTAGAGGAAGCCAT GCATGTGCACGATCTATAATAAGGGT CACC GCTAG ATATAAATGGTGACTGGGGGCTTTCATAAGCAAG CACATCATCGTGTGTAGTAAC TAGTATCTACTATG TAGATATGAGCAGTTTAGTTCGAGGCTTTGTAGGC TGTCTCTTGAATAAAAATAAAAATGCTTCTTAGTTTC TTAA3' </pre>		<pre> 5' ATGGCCAGACTCGCAACGCTAGCAGCTCTTTTTC CAGCCCTTTTGTGGTGGCGCATGCCGCTGCCTTC CGCACCACCATAACAACCGTGGACGTCGACGAGGA CATTGTGAACCAGCAGGGGCGCGAGGCGAGAGCT GCCGCGAGCAGGCTCAGCGTCAGCAGAACCTCAAC CAGTGCCAGCGGTACATGAGGCAGCAAAGCCAGTA CGGGAGTTACGATGGCAGCAACCAGCAGCAGCAGC AGGAACTTGAGCAGTGTGCCAACAGCTGAGGCAG ATGGACGAGCGGTGCCGATGTGAGGGTTGAGGCA GGCGGTAATGCAGCAGCAGGGTGAGATGCGAGGTG AGGAAATGAGGGAGGTTATGGAGACTGCTAGGGAC TTGCCAAATCAATGCCGCCTCAGCCCCAGCGCTG TGAGATTTCGCTCCGCAAGGTTCTAGAGGAAGCCAT GCATGTGCACGATCTATAATAAGGGT CACC GCTAG ATATAAATGGTGACTGGGGGCTTTCATAAGCAAG CACATCATCGTGTGTAGTAAC TAGTATCTACTATG TAGATATGAGCAGTTTAGTTCGAGGCTTTGTAGGC TGTCTCTTGAATAAAAATAAAAATGCTTCTTAGTTTC TTAA3' </pre>

Figura 24. Produtos de PCR utilizando os pares de primers Cor 14-F_{geno} e Cor 14-R (produto com 86 pb), e Cor 14-F e Cor 14-R (produto com 122 pb).

Na Figura 25 estão representadas as curvas de calibração obtidas para os produtos de PCR das duas variedades de avelã (Santa Maria de Jêsus e Gunslebert), com recurso a dois *primers* F diferentes, Cor 14-F_{geno} e Cor 14-F. Através da análise dos resultados representados na Figura 25 e na Tabela 22 é possível concluir que com a utilização do *primer* Cor 14-F, existe um decréscimo na resposta global da performance analítica do genossensor.

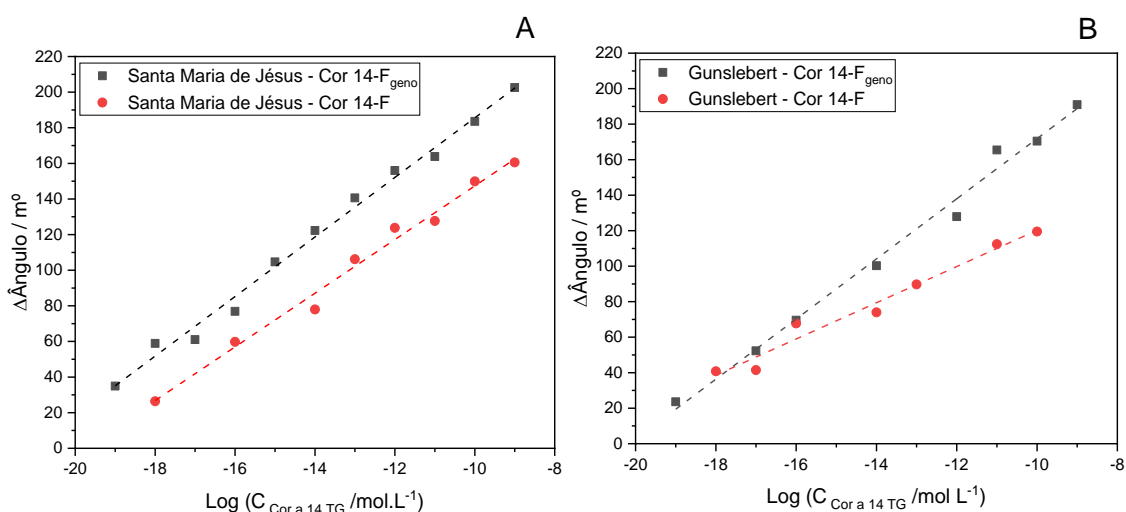


Figura 25. Curvas de calibração obtidas para os produtos de PCR com recurso a dois *primers* F diferentes Cor 14-F_{geno} e Cor 14-F, para duas variedades de avelã **A)** Santa Maria de Jêsus e **B)** Gunslebert.

Tabela 22. Parâmetros analíticos (declive, ordenada na origem, R² e intervalo linear) das curvas de calibração representadas na **Figura 25.**

Amostra de avelã	Declive (mº década ⁻¹)	Ordenada na origem (mº)	R ²	Intervalo dinâmico de resposta linear
Santa Maria de Jêsus (F _{geno})	16,72 ± 0,52	352,77 ± 7,47	0,9914	1,00x10 ⁻¹⁹ a 1,00x10 ⁻⁹ mol L ⁻¹ (0,1 amolar a 1 nmolar)
Santa Maria de Jêsus (F)	15,07 ± 0,68	298,03 ± 9,00	0,9878	
Gunslebert (F _{geno})	16,94 ± 0,68	341,23 ± 9,50	0,9903	
Gunslebert (F)	10,20 ± 0,79	222,22 ± 11,37	0,9710	1,00x10 ⁻¹⁸ a 1,00x10 ⁻¹⁰ mol L ⁻¹ (1 amolar a 0,1 nmolar)

Para ambas as variedades de avelã (Santa Maria de Jêsus e Gunslebert), ocorre uma diminuição simultânea da sensibilidade, do coeficiente de correlação, e do intervalo de resposta, ao utilizar o *primer* Cor 14-F. Na Figura 26 estão representados graficamente os declives correspondentes às curvas de calibração obtidas para os produtos de PCR das duas variedades de avelã, Santa Maria de Jêsus e Gunslebert com recurso a dois *primers* F diferentes, Cor 14-F_{geno} e Cor 14-F. Através da análise da Figura 26, é possível concluir que existe diferença significativa entre os declives obtidos aquando da utilização de diferentes *primers* F, quer para a variedade Santa Maria da

Jésus como para a variedade Gunslebert, uma vez que não existe interceção do intervalo de valores calculado para os respetivos declives.

A diminuição da performance analítica obtida para as variedades Santa Maria de Jésus e Gunslebert poderá indicar um aumento dos impedimentos estereoquímicos durante o processo de hibridização do alvo com a CP. Um produto de PCR mais longo, particularmente na extremidade que se liga ao elemento de bioreconhecimento resulta numa parte da cadeia de oligonucleótidos livre. Esta porção livre poderá inviabilizar a disponibilidade das cadeias das CP adjacentes, diminuindo a sensibilidade do sensor. Deste modo, este estudo corrobora a hipótese de que a PCR, ao restringir o tamanho das cadeias alvo de Cor a 14, irá facilitar a hibridização com o elemento de bioreconhecimento, diminuindo impedimentos estereoquímicos, e consequentemente melhorando a sensibilidade do genossensor [83].

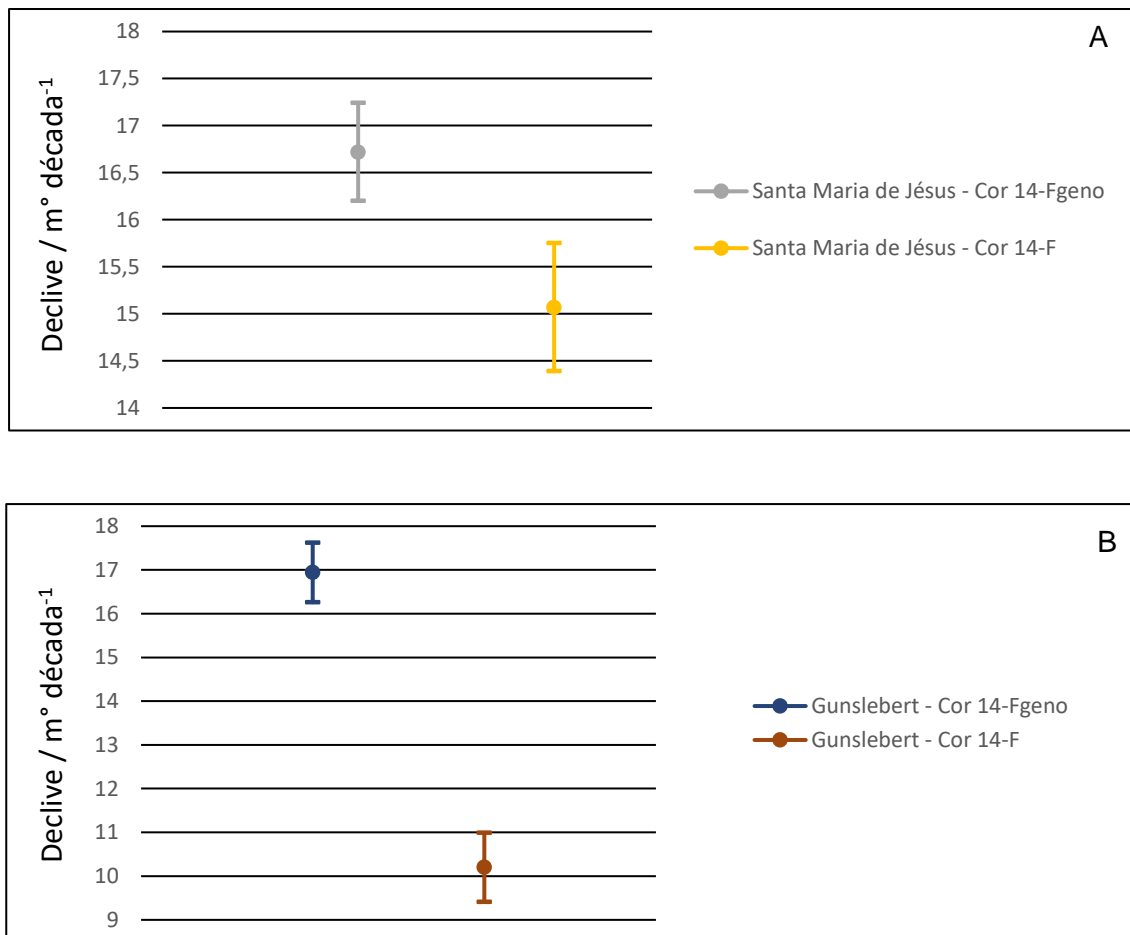


Figura 26. Declives das curvas de calibração **A)** Santa Maria de Jésus e **B)** Gunslebert. Intervalo de valores obtido através da equação $m \pm \sigma_m$ (m - declive; σ_m – desvio padrão do declive da reta).

4.6 Aplicação do genossensor ótico (SPR) a misturas modelo de avelã em massa de trigo

4.6.1 Avaliação da performance analítica do genossensor ótico (SPR)

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a performance do genossensor aplicado a amostras reais, nomeadamente na presença de outras espécies provenientes de uma matriz alimentar. Assim sendo, estudou-se a performance analítica do sistema considerando as condições experimentais otimizadas na secção 4.4. Os produtos de PCR de misturas modelo de avelã em massa de trigo, foram hibridizados com a CP imobilizada no sensor de Au (concentração otimizada na secção 4.4), aumentando a percentagem de avelã na massa de produto total (Figura 27). As medições foram realizadas em quadruplicado, tendo se obtido um erro de 5,0%. A curva de calibração relaciona o Δ ângulo (m^0) medido por SPR em função do logaritmo da concentração de avelã em massa de trigo ($mg\ kg^{-1}$). Na Tabela 23 estão representados os parâmetros analíticos obtidos a partir da curva de calibração representada na Figura 27A, em particular, a sensibilidade do método, ordenada na origem, coeficiente de correlação, intervalo de linearidade, limite de deteção.

A hibridização dos produtos de PCR (Cor a 14) em 2XSSPE pH 7,4 com a cadeia complementar (CP) imobilizada na superfície de ouro (Au-SPR) provocou um deslocamento de $[-17,69 \pm 1,15] m^0\ década^{-1}$ no índice de refração da interface metálica. Em valores absolutos, o declive obtido para as misturas modelo é inferior ao obtido aquando da otimização dos parâmetros experimentais, com recurso a alvo sintético ($[23,15 \pm 1,13] m^0\ década^{-1}$). Esta evidência sugere que a hibridização do elemento de bioreconhecimento com os produtos de PCR amplificados do alimento ocorrerá em menor extensão comparativamente com a hibridização estabelecida com o alvo sintético. Todavia, o valor da sensibilidade é semelhante à obtida para os produtos de PCR amplificados das oito variedades da avelã estudadas (Paeulet, Segorbe, Santa Maria de Jésus, Couplà, Camponica, Cosford, Gunslebert e Avelã comercial italiana), com valores entre $12,01 \pm 0,49 m^0\ década^{-1}$ e $17,63 \pm 1,21 m^0\ década^{-1}$.

Tabela 23. Parâmetros analíticos (declive, declive do quadruplicado, ordenada na origem, R^2 e intervalo linear) da curva de calibração representada na Figura 27.

Declive ($m^0\ década^{-1}$)	$-17,17 \pm 0,54$
Ordenada na origem (m^0)	$38,46 \pm 1,54$
R^2	0,9971
Intervalo linear (%)	0,001 – 1,0
Intervalo linear ($mg\ kg^{-1}$)	10 – 10 000
LOD (%)	0,001

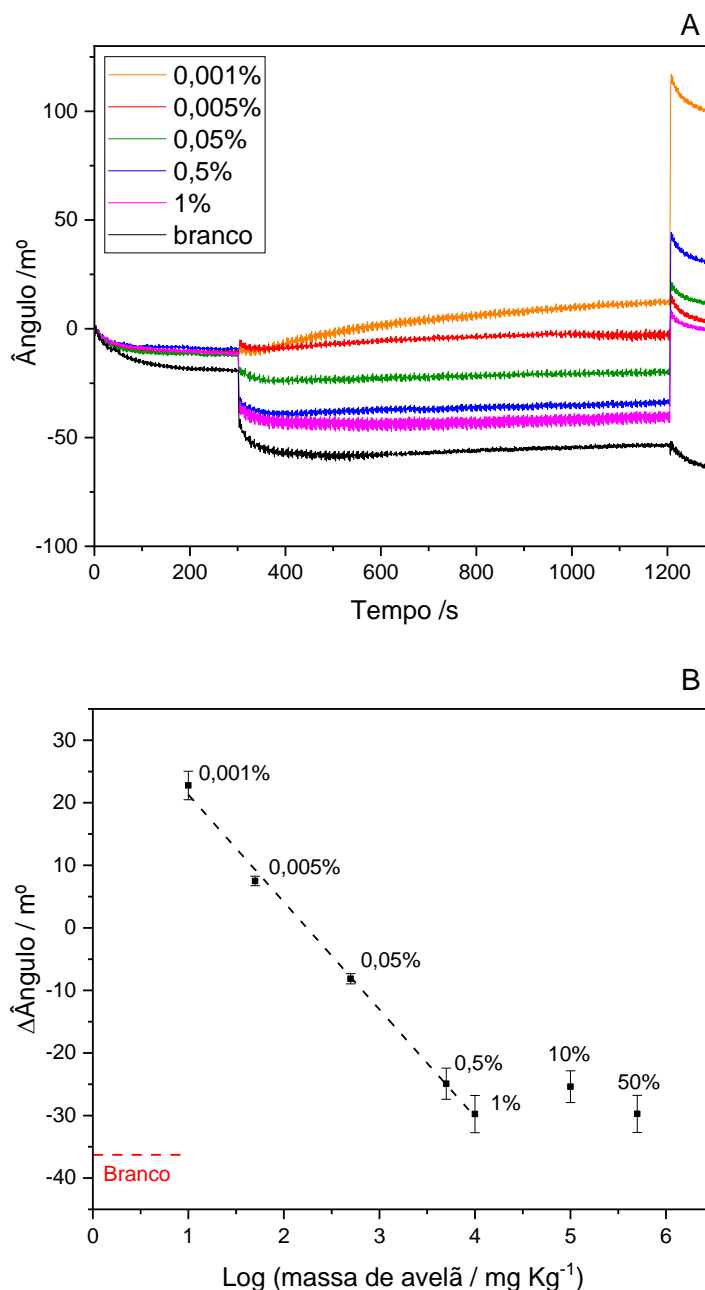


Figura 27. A) Sensogramas obtidos para a performance analítica do genossensor construído com $0,75 \mu\text{mol L}^{-1}$ de CP e $1,5 \text{mmol L}^{-1}$ de p-ATP, para um intervalo de concentrações avelã em massa de trigo entre 0,001% e 1% **B)** Curva de calibração obtida através de um quadruplicado com concentrações de avelã em massa de trigo entre 0,001% e 1%

A aplicação do genossensor a matrizes alimentares reais apresentou uma performance analítica com um declive com coeficiente negativo, contrariamente do que foi observado na hibridação Cor a 14 avelã construído em 2xSSPE (coeficiente positivo). Isto poderá indicar que à medida que a concentração de Cor a 14 aumenta no produto total, ocorrerá uma diminuição do índice de refração da amostra (possivelmente originado pelo efeito matriz).

A performance analítica referente à hibridização dos elementos obtidos por PCR amplificado de avelã presente em amostras reais (massa de trigo) apresenta um coeficiente de correlação (R^2) de 0,9971, para um intervalo dinâmico de resposta linear de 0,001% a 1%, correspondente a 10 mg kg^{-1} a $10\,000 \text{ mg kg}^{-1}$ de avelã em massa de trigo. Neste caso, o LOD corresponde à menor concentração considerada na preparação das misturas modelo de avelã em massa de trigo (contexto amostras complexas). Assim, foi obtido um LOD de 0,001% de avelã em massa de trigo, isto é 10 mg kg^{-1} . Acima de 1% o sensor parece saturar, sugerindo que a reação de hibridização estabelecida entre a CP e o alvo deixará de ocorrer e a resposta passa a ser aleatória.

4.6.2 Estudo do efeito da purificação de produtos de PCR

As misturas modelo de avelã em massa de trigo são consideradas matrizes complexas dado conterem diferentes espécies de trigo (trigo mole e trigo duro), ovos desidratados e água. Portanto, o trabalho incluiu um passo adicional que consistiu na realização da purificação dos extratos de ADN após se realizar a PCR qualitativa. Assim sendo, efetuou-se um estudo onde se testou o efeito da purificação dos extratos amplificados por PCR das misturas modelo de avelã em massa de trigo, como uma tentativa de melhorar a performance analítica do genossensor e o intervalo de linearidade, pela remoção de possíveis espécies interferentes. A purificação foi realizada com recurso ao “GRS PCR & Gel Band Purification Kit”, da GRiSP Research Solution (Porto, Portugal).

O procedimento introduzido relativo à purificação dos produtos de PCR resultou numa resposta aleatória e não linear relativamente à performance analítica do genossensor, não tendo sido possível estabelecer uma correlação entre o Δ ângulo e a concentração de avelã em massa de trigo. A possível justificação poderá estar relacionada com o facto de o procedimento envolvido na purificação envolver a eliminação do catião divalente Mg^{2+} utilizado na reação de PCR. Este catião possui um papel importante na estabilização das cadeias duplas de ADN, particularmente através da diminuição das interações repulsivas entre ssADN, carregadas negativamente. Assim, a presença de Mg^{2+} poderá promover que a hibridização da cadeia da Cor a 14 com a CP ocorra em maior extensão, e conseqüentemente, permitir uma melhor performance do genossensor [108].

4.6.3 Validação da performance do genossensor ótico (SPR) através da PCR em tempo real Como ferramenta de validação da performance analítica do genossensor ótico (SPR) com alvo no gene da Cor a 14 da avelã, recorreu-se à metodologia de PCR em tempo real. A PCR em tempo real foi realizada com recurso a extratos de ADN das mesmas misturas modelo de avelã em massa de trigo, cada uma com uma concentração total de ADN de 50 ng μL^{-1} .

As curvas de amplificação (Figura 28A) permitiram obter uma curva de calibração (Figura 28B) com uma eficiência de 91,7%, um R^2 de 0,978 e um declive de -3,538, para um intervalo dinâmico de resposta linear de [0,005 – 50]%. Assim sendo, todos os parâmetros obtidos estão de acordo com os critérios de aceitação para este tipo de metodologia de ENGL (2015) e Bustin *et al.* (2010) [109, 110].

O LOD é definido como a quantidade mínima de um determinado analito que pode ser detetada com 95% de confiança [109, 110]. Com esta metodologia foi possível obter um LOD de 0,005% (50 mg kg^{-1}) de avelã em massa de trigo, correspondente a 7.8 mg kg^{-1} de proteína de avelã.

A análise da curva de desnaturação (Figura 28A) permitiu identificar um pico de desnaturação a $75,7 \pm 0,1$ °C. Para todas as concentrações em estudo, obteve-se um único pico de desnaturação, o que sugere a ausência de formação de produtos secundários.

Segundo a pesquisa realizada, não é do nosso conhecimento a existência de qualquer estudo aplicando PCR em tempo real com alvo na Cor a 14. No entanto, Costa *et al* (2015) [64] desenvolveu uma PCR em tempo real, com alvo no gene que codifica a proteína hsp1. Este sistema permitiu a quantificação de 0,005% de avelã como alimento alergénico em chocolate, alcançando sendo assim o mesmo limite de deteção obtido para a PCR desenvolvida neste trabalho.

Comparativamente à PCR em tempo real, o genossensor ótico (SPR) apresentou um coeficiente de linearidade mais elevado (0,9971), mas para um intervalo dinâmico de resposta linear mais reduzido de 0,001% a 1%. Por outro lado, o genossensor apresentou um LOD mais baixo (0,001%) quando comparado com o LOD estimado para a PCR em tempo real (0,005%) (Tabela 24). De relembrar que a PCR em tempo real, serviu como técnica de validação do genossensor, sendo que não foi amplamente otimizada.

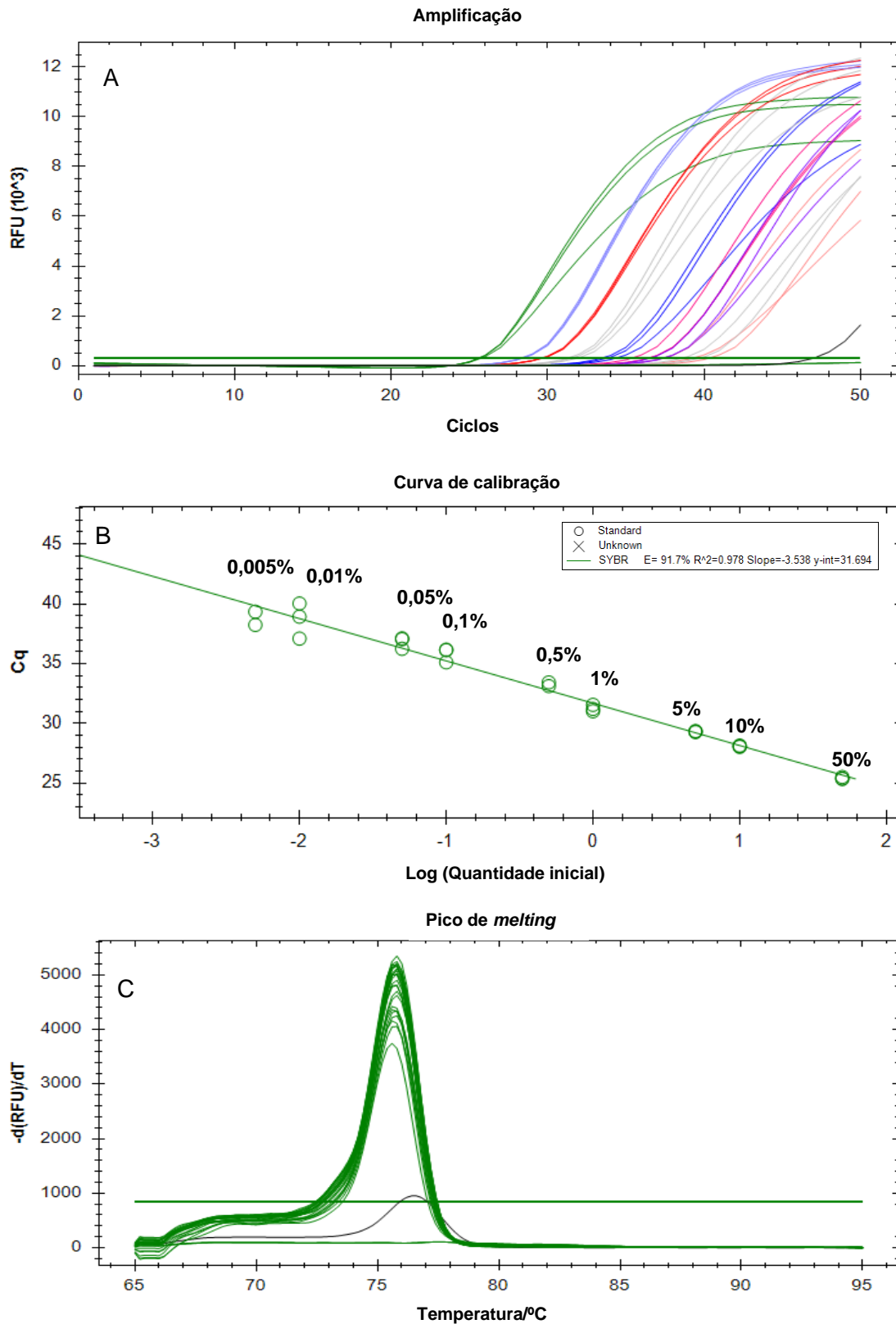


Figura 28. Exemplo de um ensaio de PCR em tempo real. Curvas de amplificação **(A)**, curva de calibração **(B)** e respetiva análise de desnaturação **(C)** de misturas modelo de avelã em massa de trigo (50-0,001%, n=3 replicados por mistura modelo) com os *primers* (Cor14-F_{geno}/R) Legenda (C): linhas verdes – misturas modelo avelã em massa de trigo; linha preta – controlo negativo.

Os alergénios alimentares estão geralmente presentes nos produtos alimentares em quantidades vestigiais, portanto será mais vantajoso a utilização de um método com um LOD mais baixo que permita a deteção do alergénio, mesmo que este apresente um intervalo dinâmico de resposta linear mais reduzido, para quantidades mais baixas de avelã no produto total. Deste modo, o genossensor permite detetar Cor a 14 de avelã em quantidades mais baixas comparativamente com a técnica de PCR em tempo real, apesar desta segunda técnica apresentar um intervalo dinâmico de resposta linear que abrange percentagens mais elevadas de avelã no produto total.

Este estudo permitiu a validação do genossensor ótico (SPR), seletivo para a Cor a 14, para deteção/quantificação de avelã como alimento alergénico numa matriz alimentar, particularmente em massa de trigo.

Tabela 24. Parâmetros analíticos (LOD, intervalo dinâmico de resposta linear e R²) das curva de calibração obtidas neste trabalho através das metodologias genossensor ótico (SPR) e PCR em tempo real.

	Genossensor ótico (SPR)	PCR em tempo real
LOD (%) avelã em massa de trigo	0,001	0,005
R ²	0,9971	0,9780
Intervalo dinâmico de resposta linear (%)	0,001 - 1	0,005 - 50

4.7 Potencial para monitorização de alergénios alimentares

O desenvolvimento de metodologias eficientes que sejam capazes de detetar e quantificar o alimento alergénico quando presente mesmo em quantidades vestigiais, constitui um importante passo na possível definição de valores de referência para os diferentes alimentos alergénicos. Atualmente, existem alguns valores de referência para doses de eliciação a nível populacional. No caso da avelã, Remington *et al* [111] reportou os valores das doses de eliciação de 0,1 mg e 3,5 mg de proteína de avelã, abaixo dos quais 1% (ED_{01%}) e 5% (ED_{05%}) dos pacientes alérgicos não são suscetíveis de sofrer reações alérgicas.

Na Tabela 25 encontra-se resumida a aplicação das metodologias: genossensor ótico desenvolvido neste trabalho, PCR em tempo real desenvolvido neste trabalho, Imunossensor eletroquímico (Costa et al (2021) [95]) e Kit comercial ELISA Ridascreen® Fast Hazelnut (r-Biopharm AG, Darmstadt, Alemanha), nomeadamente os respetivos intervalos dinâmicos de resposta linear (avelã em matriz alimentar), LOD (proteína de avelã em matriz alimentar) e potencial para proteção aos pacientes alérgicos como consumidores.

Para a PCR em tempo real desenvolvida neste trabalho obteve-se um LOD de 50 mg kg⁻¹, por outro lado, para o genossensor ótico obteve-se um LOD inferior, com um valor de 10 mg kg⁻¹. Segundo o fator de conversão de 6,4 reportado por Wensing et al [112], 10 mg kg⁻¹ de avelã numa matriz alimentar corresponderá a 1,6 mg kg⁻¹ de proteína nessa mesma matriz. No mesmo sentido, 50 mg kg⁻¹ de avelã equivalerá a 7,8 mg kg⁻¹ de proteína. Desta forma, é possível estimar que o genossensor desenvolvido apresentará uma sensibilidade apropriada que permita uma rotulagem eficiente da presença ou ausência de resíduos de avelã, o que em teoria poderá proteger cerca de 95% dos pacientes alérgicos de desenvolver reações imunológicas adversas (LOD < ED_{05%}). Apesar do LOD da PCR em tempo real ser ligeiramente superior, esta técnica serviu apenas para validar o genossensor. Para permitir uma comparação de resultados mais eficiente, a PCR em tempo teria de ser mais otimizada, como por exemplo utilizar sondas de hidrólise em vez de corantes universais.

Tabela 25. Intervalo dinâmico de resposta linear (massa de avelã na matriz alimentar), LOD (massa de proteína de avelã na matriz alimentar) e nível de proteção oferecido pelos métodos: Genossensor ótico e PCR em tempo real desenvolvidos neste trabalho, Imunossensor eletroquímico (Costa *et al* (2021) [95]) e Kit comercial ELISA Ridascreen® Fast Hazelnut (r-Biopharm AG, Darmstadt, Alemanha).

	Intervalo dinâmico de resposta linear (avelã em matriz/ mg kg ⁻¹)	LOD (proteína em matriz /mg kg ⁻¹)	Nível de proteção
Genossensor ótico (SPR)	10 – 10 000	1,6	95%
PCR em tempo real	50 – 500 000	7,8	Não definido (<95%)
Imunossensor eletroquímico [95]	1 – 500 000	0,16	95%
ELISA Ridascreen® Fast Hazelnut (r-Biopharm AG, Darmstadt, Alemanha)	2,5 – 20	0,19	95%

Na literatura, é possível encontrar um imunossensor com alvo na proteína alergénica Cor a 14. Costa et al (2021) [95] desenvolveu duas plataformas de imunorreconhecimento com alvo na proteína Cor a 14, com transdução ótica e eletroquímica, respetivamente. A plataforma eletroquímica foi testada com misturas modelo de avelã em massa de trigo, permitindo a deteção de 1 mg kg⁻¹ de avelã em massa de trigo, o que equivale a 0,16 mg kg⁻¹ de proteína na matriz. Assim, o imunossensor desenvolvido apresenta um LOD 10x inferior ao obtido com o genossensor, garantindo o mesmo nível de proteção de pacientes alérgicos do genossensor desenvolvido, isto é, de 95%. Por outro lado, o imunossensor eletroquímico apresenta reatividade cruzada com albumina 2S de diferentes fontes,

como o amendoim, o caju e outros frutos de casca rija (castanha, noz, noz pecã, amêndoa, castanha do Brasil e macadâmia). Neste sentido, os genossensores surgem como alternativas com elevada seletividade e não dependentes da conformação da proteína alérgica, diminuindo a possibilidade de ocorrência de fenómenos de reatividade cruzada com alimentos de espécies geneticamente próximas. Para além disso, o ADN é uma molécula resistente a condições extremas (temperatura, pH...), como as utilizadas aquando do processamento alimentar, tornando-o um alvo de eleição para a detecção da maioria dos alimentos alergénicos em alimentos processados [7, 70].

Para além dos biossensores, outras metodologias são reportadas na literatura com a capacidade de proteção de 95% dos pacientes alérgicos de desenvolver reações adversas. Como exemplo, pode-se referir o kit comercial ELISA Ridascreen® Fast Hazelnut (r-Biopharm AG, Darmstadt, Alemanha). Este kit apresenta um intervalo de resposta linear mais curto, comparativamente ao biossensor ótico, com valores de 2,5-20 mg kg⁻¹ de avelã, e um limite de detecção de 0,19 mg kg⁻¹ (LOD < ED_{05%}). Diferentes metodologias apresentam as suas vantagens e desvantagens, sendo a análise de alergénios por LC-MS provavelmente a mais cara atualmente, considerando o preço inicial e de manutenção das plataformas MS e a necessidade de operadores com elevada formação. A PCR em tempo real tem inúmeras vantagens (potencial para detecção múltipla de alergénios, entre outros) mas não é aplicável a todos os alimentos alergénicos (exemplo: alergénios do ovo). Atualmente o ELISA é o mais disponível em termos comerciais, mas os problemas relacionados com potencial reatividade cruzada (falsos positivos) e com as matrizes muito processadas (falso negativos) podem condicionar análise de alergénios alimentares. Neste contexto, os genossensores apresentam-se como alternativas promissoras, sensíveis, seletivas, e com elevado potencial para serem incorporados em sistemas automatizados, dispensando operadores especializados e baixando o custo total da operação [113].

5. Conclusões

Este trabalho propõe pela primeira vez o desenvolvimento e validação de um genossensor com transdução ótica (SPR) em formato *sandwich* com alvo numa sequência de ADN específica da Cor a 14 da avelã.

O genossensor desenvolvido apresentou elevada seletividade, sem evidencia de reatividade cruzada com as 38 espécies de plantas testadas por PCR qualitativa. O genossensor ótico apresentou uma resposta linear num intervalo dinâmico de concentrações $1,00 \times 10^{-18}$ a $1,00 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹, para as oito variedades de avelã, isto é, o elemento de bioreconhecimento desenvolvido hibridiza com produtos de PCR amplificados a partir de extratos de avelã. O genossensor foi testado em misturas modelo/avelã em massa (esparguete) e apresentou uma resposta linear para as misturas contendo entre 0,001% a 1% de avelã em massa de trigo, e uma sensibilidade de $[-17,17 \pm 0,54]$ m⁰ década⁻¹. Esta metodologia apresentou ainda um limite de deteção de 0,001% de avelã em massa de trigo, com potencial para proteger 95% dos pacientes alérgicos de reações adversas.

O genossensor ótico foi validado por PCR em tempo real considerando misturas modelo de avelã em massa de trigo, a qual apresentou uma eficiência de 91,7%, um R² de 0,978 e um declive de 3,538, para um intervalo dinâmico de resposta linear de 0,005% a 50%. Com esta metodologia foi possível obter um LOD de 0,005% de avelã em massa de trigo (correspondendo a 7,8 mg kg⁻¹ de proteína na matriz). Os alergénios alimentares estão geralmente presentes nos produtos alimentares em quantidades vestigiais, portanto, é importante o desenvolvimento de metodologias que apresentem baixos LODs.

O genossensor ótico (SPR) desenvolvido neste trabalho apresentou uma performance analítica elevada para a deteção de avelã em quantidades vestigiais, revelando-se sensível e seletivo. Deste modo, as metodologias desenvolvidas apresentam um elevado potencial para a aplicação em programas de monitorização e manutenção de segurança alimentar, particularmente na proteção de pacientes alérgicos à avelã.

6. Perspetivas futuras

A avelã é um fruto seco presente nos mais variados produtos alimentares, neste sentido, seria importante estudar a sua aplicação noutras matrizes alimentares, nomeadamente matrizes mais complexas, estudando o efeito que a sua composição teria nos parâmetros analíticos do genossensor (como no limite de deteção e a sensibilidade).

Noutra perspetiva, seria importante continuar a explorar a validação do método, particularmente através de:

- testes com “amostras cegas”;
- realização de testes de robustez;
- realização de testes de precisão intermédia e reprodutibilidade do método;
- otimização de parâmetros experimentais como:
 - avaliação do efeito do número de ciclos de PCR realizados aquando da preparação das amostras a aplicar no genossensor;
 - avaliação do efeito da ordem de interação da CP e p-ATP com o Au-SPR, na performance analítica do genossensor.

7. Referências

- [1] M. Ribeiro, J. Costa, I. Mafra, S. Cabo, A.P. Silva, B. Gonçalves, M. Hillion, M. Hébraud, G. Igrejas, Natural Variation of Hazelnut Allergenicity: Is There Any Potential for Selecting Hypoallergenic Varieties?, *Nutrients* 12(7) (2020) 2100.
- [2] J.J.S. Chafen, S.J. Newberry, M.A. Riedl, D.M. Bravata, M. Maglione, M.J. Suttorp, V. Sundaram, N.M. Paige, A. Towfigh, B.J. Hulley, P.G. Shekelle, Diagnosing and Managing Common Food Allergies: A Systematic Review, *JAMA* 303(18) (2010) 1848-1856.
- [3] J.I. Boye, Food allergies in developing and emerging economies: need for comprehensive data on prevalence rates, *Clinical and translational allergy* 2(1) (2012) 1-9.
- [4] J. Wang, H.A. Sampson, Food allergy, *The Journal of Clinical Investigation* 121(3) (2011) 827-835.
- [5] A. Martorell, E. Alonso, J. Boné, L. Echeverría, M.C. López, F. Martín, S. Nevot, A.M. Plaza, Position document: IgE-mediated allergy to egg protein, *Allergologia et Immunopathologia* 41(5) (2013) 320-336.
- [6] A. Martorell-Aragonés, L. Echeverría-Zudaire, E. Alonso-Lebrero, J. Boné-Calvo, M.F. Martín-Muñoz, S. Nevot-Falcó, M. Piquer-Gibert, L. Valdesoiro-Navarrete, Position document: IgE-mediated cow's milk allergy, *Allergologia et Immunopathologia* 43(5) (2015) 507-526.
- [7] J. Costa, T.J.R. Fernandes, C. Villa, M. Oliveira, I. Mafra, Advances in food allergen analysis, *Food safety: Innovative analytical tools for safety assessment* (2017) 305-360.
- [8] M. Nunes, R. Barros, P. Moreira, A. Moreira, M. Morais-Almeida, *Alergia alimentar - DGS e DGE*, (2012).
- [9] A. Muraro, T. Werfel, K. Hoffmann-Sommergruber, G. Roberts, K. Beyer, C. Bindeslev-Jensen, V. Cardona, A. Dubois, G. duToit, P. Eigenmann, M. Fernandez Rivas, S. Halken, L. Hickstein, A. Høst, E. Knol, G. Lack, M.J. Marchisotto, B. Niggemann, B.I. Nwaru, N.G. Papadopoulos, L.K. Poulsen, A.F. Santos, I. Skypala, A. Schoepfer, R. Van Ree, C. Venter, M. Worm, B. Vlieg-Boerstra, S. Panesar, D. de Silva, K. Soares-Weiser, A. Sheikh, B.K. Ballmer-Weber, C. Nilsson, N.W. de Jong, C.A. Akdis, EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines: diagnosis and management of food allergy, *Allergy* 69(8) (2014) 1008-25.
- [10] N.-S.E. Panel, 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* 126(6) (2010) S1-S58.

- [11] B.P. Vickery, S. Chin, A.W. Burks, Pathophysiology of Food Allergy, *Pediatric Clinics of North America* 58(2) (2011) 363-376.
- [12] G.K. Dhondalay, E. Rael, S. Acharya, W. Zhang, V. Sampath, S.J. Galli, R. Tibshirani, S.D. Boyd, H. Maecker, K.C. Nadeau, Food allergy and omics, *Journal of allergy and clinical immunology* 141(1) (2018) 20-29.
- [13] J. Costa, M. Oliveira, I. Mafra, Alergénios alimentares: o que são, o que provocam e como detetá-los, *Química–Boletim da Sociedade Portuguesa de Química (SPQ)* 127 (2012) 33-38.
- [14] A.W. Burks, M. Tang, S. Sicherer, A. Muraro, P.A. Eigenmann, M. Ebisawa, A. Fiocchi, W. Chiang, K. Beyer, R. Wood, J. Hourihane, S.M. Jones, G. Lack, H.A. Sampson, ICON: Food allergy, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 129(4) (2012) 906-920.
- [15] J. Costa, S.L. Bavaro, S. Benedé, A. Diaz-Perales, C. Bueno-Diaz, E. Gelencser, J. Klueber, C. Larré, D. Lozano-Ojalvo, R. Lupi, I. Mafra, G. Mazzucchelli, E. Molina, L. Monaci, L. Martín-Pedraza, C. Piras, P.M. Rodrigues, P. Roncada, D. Schrama, T. Cirkovic-Velickovic, K. Verhoeckx, C. Villa, A. Kuehn, K. Hoffmann-Sommergruber, T. Holzhauser, Are Physicochemical Properties Shaping the Allergenic Potency of Plant Allergens?, *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* (2020).
- [16] J. Costa, C. Villa, K. Verhoeckx, T. Cirkovic-Velickovic, D. Schrama, P. Roncada, P.M. Rodrigues, C. Piras, L. Martín-Pedraza, L. Monaci, E. Molina, G. Mazzucchelli, I. Mafra, R. Lupi, D. Lozano-Ojalvo, C. Larré, J. Klueber, E. Gelencser, C. Bueno-Diaz, A. Diaz-Perales, S. Benedé, S.L. Bavaro, A. Kuehn, K. Hoffmann-Sommergruber, T. Holzhauser, Are Physicochemical Properties Shaping the Allergenic Potency of Animal Allergens?, *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* (2021).
- [17] Y. Han, J. Kim, K. Ahn, Food allergy, *Korean J Pediatr* 55(5) (2012) 153-158.
- [18] J. Costa, I. Mafra, I. Carrapatoso, M.B.P.P. Oliveira, Almond Allergens: Molecular Characterization, Detection, and Clinical Relevance, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(6) (2012) 1337-1349.
- [19] B. Popping, C. Diaz-Amigo, European Regulations for Labeling Requirements for Food Allergens and Substances Causing Intolerances: History and Future, *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 101(1) (2018) 2-7.
- [20] P. Europeu, C.d.U. Europeia, Diretiva 79/112/EEC do Conselho de 18 de Dezembro de 1978 relativa à aproximação das legislações dos Estados-membros respeitantes à rotulagem, apresentação e publicidade dos géneros alimentícios destinados ao consumidor final, *Off. J. Eur. Union* L 009 (1979) 162-175.

- [21] Codex Alimentarius. (1985). General standard for the labelling of prepackaged foods, adopted in 1985. amended in 1991, 1999, 2001, 2003, 2005, 2008 and 2010, revised in 2018. In F. W. standards (Ed.), CXS 1-1985 (pp. 1-9): Off Codex Stand.
- [22] P. Europeu, C.d.U. Europeia, Diretiva 2003/89/EC do Parlamento Europeu e do Conselho de 10 de novembro de 2003 que altera a Diretiva 2000/13/CE relativamente à indicação dos ingredientes presentes nos géneros alimentícios, Off. J. Eur. Union L 308 (2003) 15-18.
- [23] P. Europeu, C. da União, Diretiva 2005/26/EC da Comissão de 21 de março de 2005 que estabelece uma lista de ingredientes e substâncias alimentares provisoriamente excluídos do anexo III A da Diretiva 2000/13/CE, Off. J. Eur. Union L. 75 (2005) 277-278.
- [24] P. Europeu, C.d.U. Europeia, Diretiva 2007/68/CE da Comissão de 27 de Novembro de 2007 que altera o anexo III da Diretiva 200/13/CE do Parlamento e do Conselho no que respeita a determinados ingredientes alimentares, Off. J. Eur. Union L. 310 (2007) 11-14.
- [25] P. Europeu, C.d.U. Europeia, Diretiva 2006/142/EC de 22 de dezembro de 2006 que altera o anexo III A da Diretiva 2000/13/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, que estabelece uma lista dos ingredientes que devem ser mencionados, em todas as situações, na rotulagem dos géneros alimentícios, Off. J. Eur. Union L 368 (2006) 110-111.
- [26] P. Europeu, C.d.U. Europeia, Regulamento (UE) N. o 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 Off. J. Eur. Union L. 304 (2011) 18-63.
- [27] S. Geiselhart, K. Hoffmann-Sommergruber, M. Bublin, Tree nut allergens, *Molecular immunology* 100 (2018) 71-81.
- [28] T. Gama, H.M. Wallace, S.J. Trueman, S. Hosseini-Bai, Quality and shelf life of tree nuts: a review, *Scientia horticultrae* 242 (2018) 116-126.
- [29] J. Costa, I. Mafra, I. Carrapatoso, M.B.P.P. Oliveira, Hazelnut allergens: molecular characterization, detection, and clinical relevance, *Critical reviews in food science and nutrition* 56(15) (2016) 2579-2605.
- [30] P. Burney, C. Summers, S. Chinn, R. Hooper, R. Van Ree, J. Lidholm, Prevalence and distribution of sensitization to foods in the European Community Respiratory Health Survey: a EuroPrevall analysis, *Allergy* 65(9) (2010) 1182-1188.
- [31] P.G.J. Burney, J. Potts, I. Kummeling, E.N.C. Mills, M. Clausen, R. Dubakiene, L. Barreales, C. Fernandez-Perez, M. Fernandez-Rivas, T.M. Le, The prevalence and distribution of food sensitization in European adults, *Allergy* 69(3) (2014) 365-371.

- [32] J. Costa, C. Villa, B.B.P.P. Oliveira, I. Mafra, Alergénios dos frutos de casca rijã, *Riscos e Alimentos* 11(Frutos Secos e Secados) (2016).
- [33] J. Costa, C. Villa, B.B.P.P. Oliveira, I. Mafra, Alergénios dos frutos de casca rijã, *Riscos e Alimentos* nº 11(Frutos Secos e Secados) (2016).
- [34] C. Lamberti, S. Nebbia, S. Antoniazzi, S. Cirrincione, E. Marengo, M. Manfredi, D. Smorgon, G. Monti, A. Faccio, M.G. Giuffrida, Effect of hot air and infrared roasting on hazelnut allergenicity, *Food Chemistry* 342 (2021) 128174.
- [35] R. Korte, J. Happe, I. Brümmer, J. Brockmeyer, Structural characterization of the allergenic 2S albumin Cor a 14: comparing proteoform patterns across hazelnut cultivars, *Journal of proteome research* 16(2) (2017) 988-998.
- [36] C. Garino, L. Zuidmeer, J. Marsh, A. Lovegrove, M. Morati, S. Versteeg, P. Schilte, P. Shewry, M. Arlorio, R. van Ree, Isolation, cloning, and characterization of the 2S albumin: a new allergen from hazelnut, *Molecular nutrition & food research* 54(9) (2010) 1257-1265.
- [37] C. Nitride, G. Mamone, G. Picariello, C. Mills, R. Nocerino, R.B. Canani, P. Ferranti, Proteomic and immunological characterization of a new food allergen from hazelnut (*Corylus avellana*), *Journal of proteomics* 86 (2013) 16-26.
- [38] J. Costa, P. Ansari, I. Mafra, M.B.P.P. Oliveira, S. Baumgartner, Assessing hazelnut allergens by protein-and DNA-based approaches: LC-MS/MS, ELISA and real-time PCR, *Analytical and bioanalytical chemistry* 406(11) (2014) 2581-2590.
- [39] J. Costa, P. Ansari, I. Mafra, M.B.P.P. Oliveira, S. Baumgartner, Development of a sandwich ELISA-type system for the detection and quantification of hazelnut in model chocolates, *Food Chemistry* 173 (2015) 257-265.
- [40] T. Holzhauser, P. Johnson, J.P. Hindley, G. O'Connor, C.-H. Chan, J. Costa, C.K. Fæste, B.J. Hirst, F. Lambertini, M. Miani, Are current analytical methods suitable to verify VITAL® 2.0/3.0 Allergen Reference doses for EU Allergens in Foods?, *Food and Chemical Toxicology* (2020) 111709.
- [41] S.A. Trashin, T. Cucu, B. Devreese, A. Adriaens, B. De Meulenaer, Development of a highly sensitive and robust Cor a 9 specific enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of hazelnut traces, *Analytica chimica acta* 708(1-2) (2011) 116-122.
- [42] T. Cucu, B. Devreese, S. Trashin, B. Kerkaert, M. Rogge, B. De Meulenaer, Detection of hazelnut in foods using ELISA: challenges related to the detectability in processed foodstuffs, *Journal of AOAC international* 95(1) (2012) 149-156.
- [43] E.A.E. Garber, J. Perry, Detection of hazelnuts and almonds using commercial ELISA test kits, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396(5) (2010) 1939-1945.

- [44] J. Heick, M. Fischer, S. Kerbach, U. Tamm, B. Popping, Application of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous detection of seven allergenic foods in flour and bread and comparison of the method with commercially available ELISA test kits, *Journal of AOAC International* 94(4) (2011) 1060-1068.
- [45] L. Píknová, V. Janská, T. Kuchta, P. Siekel, Comparison of Real-Time Polymerase Chain Reaction and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Sensitive and Quantitative Detection of Hazelnuts in Nut Pastes, *Journal of AOAC International* 101(6) (2018) 1864-1867.
- [46] S.P. Perner, L. Heupel, L. Zimmermann, Y. Peters, K.U. Vongehr, H. El-Bedewy, S. Siebeneicher, T. Weiß, T. Hektor, B. Lindemann, Investigation of Reduced ELISA Recovery of Almond and Hazelnut Traces from Roasted Nut Samples by SDS-PAGE and Mass Spectrometry, *Journal of AOAC International* 102(5) (2019) 1271-1279.
- [47] L. Fu, B.J. Cherayil, H. Shi, Y. Wang, Y. Zhu, Detection and Quantification Methods for Food Allergens, *Food Allergy*, Springer2019, pp. 69-91.
- [48] C. Bignardi, M. Mattarozzi, A. Penna, S. Sidoli, L. Elviri, M. Careri, A. Mangia, A rapid size-exclusion solid-phase extraction step for enhanced sensitivity in multi-allergen determination in dark chocolate and biscuits by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Food Analytical Methods* 6(4) (2013) 1144-1152.
- [49] J. Heick, M. Fischer, B. Pöpping, First screening method for the simultaneous detection of seven allergens by liquid chromatography mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 1218(7) (2011) 938-943.
- [50] J. Sealey-Voyksner, J. Zweigenbaum, R. Voyksner, Discovery of highly conserved unique peanut and tree nut peptides by LC–MS/MS for multi-allergen detection, *Food chemistry* 194 (2016) 201-211.
- [51] C. Bignardi, L. Elviri, A. Penna, M. Careri, A. Mangia, Particle-packed column versus silica-based monolithic column for liquid chromatography–electrospray-linear ion trap-tandem mass spectrometry multiallergen trace analysis in foods, *Journal of Chromatography A* 1217(48) (2010) 7579-7585.
- [52] P. Ansari, N. Stoppacher, S. Baumgartner, Marker peptide selection for the determination of hazelnut by LC–MS/MS and occurrence in other nuts, *Analytical and bioanalytical chemistry* 402(8) (2012) 2607-2615.
- [53] T. Cucu, B. De Meulenaer, B. Devreese, MALDI-based identification of stable hazelnut protein derived tryptic marker peptides, *Food Additives & Contaminants: Part A* 29(12) (2012) 1821-1831.

- [54] T. Tuzimski, A. Petruczynik, Review of New Trends in the Analysis of Allergenic Residues in Foods and Cosmetic Products, *Journal of AOAC International* 103(4) (2020) 997-1028.
- [55] H.A. Erlich, Principles and applications of the polymerase chain reaction, *Rev Immunogenet* 1(2) (1999) 127-34.
- [56] M. Joshi, J.D. Deshpande, Polymerase chain reaction: methods, principles and application, *International Journal of Biomedical Research* 2(1) (2010) 81-97.
- [57] P. Gill, A. Ghaemi, Nucleic acid isothermal amplification technologies - A review, *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* 27 (2008) 224-43.
- [58] D. Rodríguez-Lázaro, M. Hernández, Real-time PCR in food science: introduction, *Current issues in molecular biology* 15(2) (2013) 25-38.
- [59] A.S.M. Giasuddin, Polymerase chain reaction technique: fundamental aspects and applications in clinical diagnostics, *Journal of Islamic Academy of Sciences* 8(1) (1995) 29-32.
- [60] M. Prado, I. Ortea, S. Vial, J. Rivas, P. Calo-Mata, J. Barros-Velázquez, Advanced DNA-and protein-based methods for the detection and investigation of food allergens, *Critical reviews in food science and nutrition* 56(15) (2016) 2511-2542.
- [61] A.D. Loftis, W.K. Reeves, Principles of real-time PCR, *Veterinary PCR Diagnostics*, Bentham Science, Sharjah (2012) 3-17.
- [62] J. Costa, I. Mafra, M.B.P.P. Oliveira, High resolution melting analysis as a new approach to detect almond DNA encoding for Pru du 5 allergen in foods, *Food Chemistry* 133(3) (2012) 1062-1069.
- [63] C.J. Smith, A.M. Osborn, Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology, *FEMS microbiology ecology* 67(1) (2009) 6-20.
- [64] J. Costa, V.S. Melo, C.G. Santos, M.B.P.P. Oliveira, I. Mafra, Tracing tree nut allergens in chocolate: A comparison of DNA extraction protocols, *Food Chemistry* 187 (2015) 469-476.
- [65] P. Madesis, I. Ganopoulos, I. Bosmali, A. Tsaftaris, Barcode High Resolution Melting analysis for forensic uses in nuts: A case study on allergenic hazelnuts (*Corylus avellana*), *Food research international* 50(1) (2013) 351-360.
- [66] J. Costa, I. Mafra, T. Kuchta, M.B.P.P. Oliveira, Single-tube nested real-time PCR as a new highly sensitive approach to trace hazelnut, *Journal of agricultural and food chemistry* 60(33) (2012) 8103-8110.
- [67] S.L. Mustorp, S.M. Drømtorp, A.L. Holck, Multiplex, quantitative, ligation-dependent probe amplification for determination of allergens in food, *Journal of agricultural and food chemistry* 59(10) (2011) 5231-5239.

- [68] A. Ehlert, A. Demmel, C. Hupfer, U. Busch, K.-H. Engel, Simultaneous detection of DNA from 10 food allergens by ligation-dependent probe amplification, *Food Additives and Contaminants* 26(4) (2009) 409-418.
- [69] B.D. Malhotra, M.A. Ali, *Nanomaterials in biosensors: fundamentals and applications*, *Nanomaterials for Biosensors* (2018) 1-74.
- [70] A. Aquino, C.A. Conte-Junior, A Systematic Review of Food Allergy: Nanobiosensor and Food Allergen Detection, *Biosensors* 10(12) (2020) 194.
- [71] S. Morais, L.A. Tortajada-Genaro, A. Maquieira, M.-A.G. Martinez, Biosensors for food allergy detection according to specific IgE levels in serum, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2020) 115904.
- [72] H.A. Alhadrami, Biosensors: Classifications, medical applications, and future prospective, *Biotechnology and applied biochemistry* 65(3) (2018) 497-508.
- [73] M.A. Morales, J.M. Halpern, Guide to selecting a biorecognition element for biosensors, *Bioconjugate chemistry* 29(10) (2018) 3231-3239.
- [74] D.R. Thévenot, K. Toth, R.A. Durst, G.S. Wilson, Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification1International Union of Pure and Applied Chemistry: Physical Chemistry Division, Commission I.7 (Biophysical Chemistry); Analytical Chemistry Division, Commission V.5 (Electroanalytical Chemistry).1, *Biosensors and Bioelectronics* 16(1) (2001) 121-131.
- [75] F.S. Felix, L. Angnes, Electrochemical immunosensors—a powerful tool for analytical applications, *Biosensors and Bioelectronics* 102 (2018) 470-478.
- [76] J.I.A. Rashid, N.A. Yusof, The strategies of DNA immobilization and hybridization detection mechanism in the construction of electrochemical DNA sensor: A review, *Sensing and bio-sensing research* 16 (2017) 19-31.
- [77] M.I. Pividori, A. Merkoci, S. Alegret, Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods, *Biosensors and Bioelectronics* 15(5-6) (2000) 291-303.
- [78] R. Miranda-Castro, R. Sánchez-Salcedo, B. Suárez-Álvarez, N. de-los-Santos-Álvarez, A.J. Miranda-Ordieres, M.J. Lobo-Castañón, Thioaromatic DNA monolayers for target-amplification-free electrochemical sensing of environmental pathogenic bacteria, *Biosensors and Bioelectronics* 92 (2017) 162-170.
- [79] R. Miranda-Castro, N.d.I. Santos-Álvarez, M.J. Lobo-Castañón, Understanding the factors affecting the analytical performance of sandwich-hybridization genosensors on gold electrodes, *Electroanalysis* 30(7) (2018) 1229-1240.
- [80] E.A. Josephs, T. Ye, Nanoscale Spatial Distribution of Tethered DNA on Model Nucleic Acid Sensor Surfaces, *ACS Nano* (7) (2013) 3653–3660.

- [81] B. Martín-Fernández, N. de-los-Santos-Álvarez, J.P. Martín-Clemente, M.J. Lobo-Castañón, B. López-Ruiz, Challenging genosensors in food samples: The case of gluten determination in highly processed samples, *Talanta* 146 (2016) 490-495.
- [82] F. Lucarelli, S. Tombelli, M. Minunni, G. Marrazza, M. Mascini, Electrochemical and piezoelectric DNA biosensors for hybridisation detection, *Analytica Chimica Acta* 609(2) (2008) 139-159.
- [83] S. Moura-Melo, R. Miranda-Castro, N. De-los-Santos-Álvarez, A.J. Miranda-Ordieres, J.R. dos Santos Junior, R.A. da Silva Fonseca, M.J. Lobo-Castañón, A quantitative PCR-electrochemical genosensor test for the screening of biotech crops, *Sensors* 17(4) (2017) 881.
- [84] T. Knebelberger, I. Stöger, DNA extraction, preservation, and amplification, *DNA Barcodes*, Springer2012, pp. 311-338.
- [85] M. Labib, E.H. Sargent, S.O. Kelley, Electrochemical methods for the analysis of clinically relevant biomolecules, *Chemical reviews* 116(16) (2016) 9001-9090.
- [86] D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Vörös, E. Reimhult, Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures, *Sensors* 8(3) (2008) 1400-1458.
- [87] N.S. Fracchiolla, S. Artuso, A. Cortelezzi, Biosensors in clinical practice: focus on oncohematology, *Sensors* 13(5) (2013) 6423-6447.
- [88] B. Bohunicky, S.A. Mousa, Biosensors: the new wave in cancer diagnosis, *Nanotechnology, science and applications* 4 (2011) 1-10.
- [89] S. Neethirajan, X. Weng, A. Tah, J.O. Cordero, K.V. Ragavan, Nano-biosensor platforms for detecting food allergens – New trends, *Sensing and Bio-Sensing Research* 18 (2018) 13-30.
- [90] R.C. Alves, M.F. Barroso, M.B. González-García, M.B.P.P. Oliveira, C. Delerue-Matos, New trends in food allergens detection: Toward biosensing strategies, *Critical reviews in food science and nutrition* 56(14) (2016) 2304-2319.
- [91] J. Homola, Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species, *Chemical Reviews* 108(2) (2008) 462-493.
- [92] J. Homola, Present and future of surface plasmon resonance biosensors, *Analytical and bioanalytical chemistry* 377(3) (2003) 528-539.
- [93] A.E.M. Wammes, F.L. van Delft, J.C.M. van Hest, D. Löwik, Surface plasmon resonance (SPR) sensors for detecting allergens in food, *Handbook of Food Allergen Detection and Control*, Elsevier2015, pp. 229-244.
- [94] B.A. Prabowo, A. Purwidyantri, K.-C. Liu, Surface plasmon resonance optical sensor: A review on light source technology, *Biosensors* 8(3) (2018) 80.

- [95] R. Costa, J. Costa, I. Sagastizábal, A.T.S.C. Brandão, P. Moreira, I. Mafra, A.F. Silva, C.M. Pereira, Electrochemical and optical biosensing platforms for the immunorecognition of hazelnut Cor a 14 allergen, *Food Chemistry* 361 (2021) 130122.
- [96] W. Wang, Y. Li, F. Zhao, Y. Chen, Y. Ge, Optical thin-film biochips for multiplex detection of eight allergens in food, *Food Research International* 44(10) (2011) 3229-3234.
- [97] W.M. Blom, L.M. van Dijk, A. Michelsen-Huisman, G.F. Houben, A.C. Knulst, Y.F.M. Linders, K.C.M. Verhoeckx, B.C. Holleman, L.R. Lentz, Allergen labelling: Current practice and improvement from a communication perspective, *Clinical & Experimental Allergy* 51(4) (2021) 574-584.
- [98] S. Rossi, E. Scaravelli, A. Germini, R. Corradini, C. Fogher, R. Marchelli, A PNA-array platform for the detection of hidden allergens in foodstuffs, *European Food Research and Technology* 223(1) (2006) 1-6.
- [99] F. Bettazzi, F. Lucarelli, I. Palchetti, F. Berti, G. Marrazza, M. Mascini, Disposable electrochemical DNA-array for PCR amplified detection of hazelnut allergens in foodstuffs, *Analytica Chimica Acta* 614(1) (2008) 93-102.
- [100] V.R.-V. Montiel, R.M. Torrente-Rodríguez, G.G. de Rivera, A.J. Reviejo, C. Cuadrado, R. Linacero, F.J. Gallego, S. Campuzano, J.M. Pingarrón, Amperometric determination of hazelnut traces by means of Express PCR coupled to magnetic beads assembled on disposable DNA sensing scaffolds, *Sensors and Actuators B: Chemical* 245 (2017) 895-902.
- [101] S. Rebe Raz, H. Liu, W. Norde, M.G.E.G. Bremer, Food allergens profiling with an imaging surface plasmon resonance-based biosensor, *Analytical chemistry* 82(20) (2010) 8485-8491.
- [102] M.G.E.G. Bremer, N.G.E. Smits, W. Haasnoot, Biosensor immunoassay for traces of hazelnut protein in olive oil, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395(1) (2009) 119-126.
- [103] G. Ross, M.G.E.G. Bremer, J.H. Wichers, A. Van Amerongen, M.W.F. Nielen, Rapid antibody selection using surface plasmon resonance for high-speed and sensitive hazelnut lateral flow prototypes, *Biosensors* 8(4) (2018) 130.
- [104] H.-Y. Lin, C.-H. Huang, J. Park, D. Pathania, C.M. Castro, A. Fasano, R. Weissleder, H. Lee, Integrated magneto-chemical sensor for on-site food allergen detection, *ACS nano* 11(10) (2017) 10062-10069.
- [105] J. Ye, G. Coulouris, I. Zaretskaya, I. Cutcutache, S. Rozen, T.L. Madden, Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction, *BMC bioinformatics* 13(1) (2012) 1-11.

- [106] B. Martín-Fernández, C.L. Manzanares-Palenzuela, M. Sánchez-Paniagua López, N. de-los-Santos-Álvarez, B. López-Ruiz, Electrochemical genosensors in food safety assessment, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57(13) (2017) 2758-2774.
- [107] R.P. Buck, E. Lindner, Recommendations for nomenclature of ionselective electrodes (IUPAC Recommendations 1994), *Pure and Applied Chemistry* 66(12) (1994) 2527-2536.
- [108] T. Špringer, H. Šípová, H. Vaisocherová, J. Štěpánek, J. Homola, Shielding effect of monovalent and divalent cations on solid-phase DNA hybridization: surface plasmon resonance biosensor study, *Nucleic Acids Research* 38(20) (2010) 7343-7351.
- [109] S.A. Bustin, V. Benes, J.A. Garson, J. Hellems, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M.W. Pfaffl, G.L. Shipley, *The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*, Oxford University Press, 2009.
- [110] M. Mazzara, C. Savini, C. Delobel, H. Broll, A. Damant, C. Paoletti, G. Van den Eede, Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing, *Ispira: Joint Research Centre* (2008).
- [111] B.C. Remington, J. Westerhout, M.Y. Meima, W.M. Blom, A.G. Kruizinga, M.W. Wheeler, S.L. Taylor, G.F. Houben, J.L. Baumert, Updated population minimal eliciting dose distributions for use in risk assessment of 14 priority food allergens, *Food and Chemical Toxicology* 139 (2020) 111259.
- [112] M. Wensing, A.H. Penninks, S.L. Hefle, J.H. Akkerdaas, R. Van Ree, S.J. Koppelman, C.A.F.M. Bruijnzeel-Koomen, A.C. Knulst, The range of minimum provoking doses in hazelnut-allergic patients as determined by double-blind, placebo-controlled food challenges, *Clinical & Experimental Allergy* 32(12) (2002) 1757-1762.
- [113] M.N. Velasco-Garcia, T. Mottram, Biosensor Technology addressing Agricultural Problems, *Biosystems Engineering* 84(1) (2003) 1-12.

Anexo I

Hidratação de oligonucleótidos

Todas as cadeias de oligonucleótidos foram adquiridas na sua forma liofilizada, posto isto, a sua utilização implicou uma hidratação prévia.

Para o caso particular da CP este passo foi antecedido pela ativação da sua extremidade tiolada (3'). O seu grupo tiol encontra-se na sua forma oxidada (dissulfeto), de forma a proteger os átomos de enxofre através de uma ligação dupla (S=S). Assim, é necessário remover esta proteção, através da redução do grupo tiol, ativando o grupo funcional. O procedimento de ativação realizado foi o recomendado pela “Eurofins genomics”. Inicialmente adicionaram-se 200 µL de TCEP-HCL (10 mM, em tampão TE pH 8,0) agitando por 60 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, precipitaram-se as cadeias de ADN através da adição de 150 µL de NaAc (3M, preparada pesando 0,2460 g de NaAc e 0,0021g de MgAc para um volume de 1 mL de água ultrapura). Perfez-se o tubo com etanol e incubou-se durante 20 minutos a -20 °C (recorrendo a um banho de acetona). Finalmente, realizou-se uma centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos, descartando o sobrenadante, e deixou-se secar à temperatura ambiente. Assim, a CP pode ser por fim hidratada como as restantes cadeias de oligonucleótidos.

A hidratação das três cadeias de oligonucleótidos compreendeu essencialmente uma centrifugação por 10 segundos e a baixas rotações, seguida da adição do respetivo volume de água de PCR para que cada solução tivesse uma concentração de 100 µM (isto é, 437 µL para a CP, 1154 µL para o alvo e 188 µL para a SP). Estas soluções foram refrigeradas por 3 horas, agitando os tubos suavemente de 30 em 30 minutos. De forma a evitar múltiplos ciclos de congelação e descongelação das soluções stock (100 µmol L⁻¹), foram realizadas alíquotas de 100 µl com concentração de 10 µmol L⁻¹. Por fim, foram levadas ao congelador, onde ficaram até ao momento da utilização. Todos estes passos de ativação/hidratação foram realizados diretamente no tubo fornecido pela “Eurofins genomics” nos quais as cadeias de oligonucleótidos foram enviadas.

Anexo II

Condicionamento do equipamento SPR

Antes de cada experiência de SPR, o equipamento é lavado internamente de forma a eliminar quaisquer impurezas que possam existir nos canais e/ou tubagens. Para isso, faz-se passar pelo sistema uma sequência de cinco soluções: 0,5% SDS desgaseificado, HCl 0,1 mol L⁻¹, etanol 96%, NaOH 0,1 mol L⁻¹ e água ultra pura. Após lavagem, o disco de ouro (sensor Au-SPR) é colocado sobre o prisma hemisférico de vidro, seguindo o procedimento padrão para a configuração ótica de *Kretschmann*. A estabilização do sensor Au-SPR é conseguida através da passagem do *running buffer* na superfície (2x SSPE), até uma resposta estável ser atingida. Assim, o SPR encontra-se pronto a ser utilizado. É de ressaltar que a solução tampão utilizada aquando da obtenção da linha de base é a mesma utilizada para a preparação de todas as soluções empregues na respetiva experiência.

Todas as experiências foram realizadas utilizando uma sequência de SPR totalmente automatizada, de forma a garantir a correta adição de todas as soluções previamente distribuídas tanto na cuvette como nos locais de soluções de stock. Os passos de imobilização, limpeza e hibridização foram monitorizados acompanhando as alterações das propriedades óticas da superfície (índice de refração).