



Segurança alimentar e controlo de qualidade de produtos comerciais: imunossensor amperométrico para a quantificação do alergénio do ovo

MARIANA SOFIA AGUIAR COQUE MOURA DEL RIO
setembro de 2022

Segurança alimentar e controlo de qualidade de produtos
comerciais: imunossensor amperométrico para a
quantificação do alergénio do ovo

Mariana Sofia Aguiar del Rio – 1170848

Tese/Dissertação

Mestrado em Engenharia Biomédica

Orientadores:

Hendrikus Petrus Antonius Nouws

Maria Cristina Castro Freitas

Centro de investigação:

GRAQ – Grupo de Reação e Análises Químicas

Agradecimentos

Na duração da presente dissertação, a realização da mesma não teria sido possível sem a incondicional ajuda e apoio recebido, assim sendo gostaria de agradecer às seguintes pessoas:

Aos meus pais, especialmente à minha mãe, e irmã pelo apoio que sempre me deram durante o decorrer de toda a minha licenciatura e mestrado e incentivo constante que permitiu o alcance dos meus objetivos a nível académico e pessoal.

A todos os meus amigos e especialmente ao meu namorado por estarem sempre presentes e me motivarem ao longo de todo o percurso académico.

Ao Doutor Hendrikus Nouws, por ter aceitado e ajudado a orientar a presente dissertação, encontrando-se sempre disponível apesar do seu horário de aulas para quaisquer dúvidas que tivesse apresentava sugestões e conselhos indispensáveis para a realização de uma tese coerente e científica.

À Doutora Maria Freitas, por me ter inicialmente recebido e integrado logo no Centro de Investigação, GRAQ, tendo dedicado tanto do seu tempo a assegurar-se que eu conseguia alcançar os objetivos pretendidos nesta dissertação e pela enorme motivação e ajuda que me ofereceu todos os dias, sem a sua orientação não seria possível a concretização desta tese, tendo sido de extrema importância todo o conhecimento e experiência que me proporcionou ao longo da realização desta dissertação.

À Doutora Cristina Matos, pela colaboração e disponibilização das instalações que permitiu que a realização deste trabalho fosse possível.



Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) / Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (MCTES) através de fundos nacionais (UIDB/50006/2020, UIDP/50006/2020, LA/P/0008/2020) e através do projeto TracAllerSens - Sensores eletroquímicos para a deteção e quantificação de vestígios de alergénios em produtos alimentares (POCI-01-0145-FEDER-030735), financiado pelo Programa Operacional Competitividade e Internacionalização na sua componente FEDER e pela FCT na sua componente nacional.

Resumo

O ovo é um alimento vastamente consumido pela população, sendo principalmente constituído por clara e gema, as quais contêm diferentes alergénios alimentares. A alergia ao ovo afeta cerca de 9 % das crianças a nível mundial, sendo que a clara apresenta maior teor de alergenicidade do que a gema. Indivíduos com hipersensibilidade podem apresentar sintomas e/ou reações que variam de moderadas a severas, sendo que em casos extremos podem levar a urgência médica. Devido à inexistência de tratamento para esta alergia alimentar, a prevenção decorre da não ingestão de alimentos que contêm o alergénio. Deste modo, torna-se essencial o cumprimento da legislação em vigor que refere a obrigatoriedade da indicação no rótulo do produto da presença de gema e/ou clara de ovo.

Ovotransferrina (Gal d 3) é um importante alergénio da clara de ovo sendo o analito-alvo deste estudo que consistiu no desenvolvimento de um imunossensor amperométrico para o seu controlo em produtos alimentares comerciais. Eléttodos serigrafados de carbono (SPCE) foram selecionados como plataforma transdutora e anticorpos anti-Gal d 3 como bioreceptor. Num ensaio não-competitivo (*sandwich*), o anticorpo de captura (CAb) foi imobilizado na superfície do eléctrodo de trabalho do SPCE por adsorção física, seguindo-se o reconhecimento do alergénio através do anticorpo de deteção modificado com a enzima peroxidase (DAb-HRP) e subsequente adição do substrato enzimático tetramethylbenzidine (TMB). Posteriormente o sinal analítico foi obtido utilizando a amperometria como técnica eletroquímica. Foi efetuado um conjunto de otimizações (nanoestruturação do eléctrodo, concentrações das biomoléculas, tempos de incubação, etc.), que resultou num ensaio de 30 min e permitiu obter um notável desempenho analítico; o imunossensor desenvolvido permitiu a quantificação de Gal d 3 entre 55 e 1000 ng/mL, sendo obtido um limite de deteção de 16 ng/mL. O coeficiente de variação do método ($V_{x0} = 5,5\%$) demonstrou uma boa precisão do método desenvolvido. Analisaram-se 25 amostras alimentares que incluíram produtos cuja rotulagem indica “não contém ovo”, “pode conter vestígios de ovo”, “contém ovo” e/ou “contém clara de ovo”. Para além destas, 7 amostras de ovo e clara de ovo cru(as) e/ou cozinhado(as) foram analisadas e quantificadas.

Por fim, foi utilizado um ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) para validar os resultados do imunossensor desenvolvido. A exatidão dos resultados do imunossensor para a quantificação da ovotransferrina foi comprovada, permitindo efetuar o controlo de um principal alergénio alimentar, verificar a conformidade dos rótulos com a legislação, cumprindo assim os objetivos estipulados do tema proposto. **Palavras-chave:** Biossensor Eletroquímico, Imunossensor, Alergénios, Alergia alimentar, Amperometria, Legislação, Ovotransferrina, Ovo, Clara de ovo, Produtos alimentares, Rotulagem, SPCE, eléctrodo serigrafado de carbono.

Abstract

Eggs are widely consumed worldwide; however, health outcomes can be associated with benefits or risks related to symptoms or reactions derived from its intake, skin contact or inhalation, which can result in severe disorders. Egg constitution includes a protective eggshell, egg yolk and egg white, which comprise different food allergens. Egg allergy affects about 9% of children worldwide, with egg white having a higher allergenic content than egg yolk. Individuals with hypersensitivity may experience symptoms and/or reactions that vary in severity which in extreme cases can lead to medical urgency with rescue medication. Due to the lack of treatment for food allergies, prevention is the possible option by avoiding the intake of foods that contain the specific allergen. Thus, it is essential to comply with the legislation, which refers to the mandatory indication on the product label of the presence of egg yolk and egg white.

Ovotransferrin (Gal d 3) is an important allergen of the egg white and is still the target analyte of this study that consists of the development of an amperometric immunosensor for food safety & quality control of commercial products. Screen-printed carbon electrodes (SPCE) were used as a transducer and anti-Gal d 3 antibody as a bioreceptor. In a non-competitive assay (sandwich), the capture antibody (CAb) is immobilized onto the working electrode by physical adsorption, followed by the allergen recognition by a Peroxidase-conjugated detection antibody (DAb-HRP), and subsequent addition of the enzyme substrate tetramethylbenzidine (TMB). The analytical signal was obtained through amperometry as the electrochemical technique. A set of optimizations was accomplished (e.g., biomolecule concentration, incubation time, temperature, electrode nanostructuring, etc.), which resulted in a 30 min assay time with a remarkable analytical performance, being established a quantification range for Gal d 3 between 55 and 1000 ng/mL, yielding a limit of detection of 16 ng/mL. The coefficient of variation of the method ($V_{x0} = 5.5\%$) demonstrated a good precision of the developed biosensor. In this context, 25 food samples were analysed which included products whose labelling indicates “does not contain egg”, “may contain traces of egg”, “contains egg” and/or “contains egg white”. Furthermore, 7 samples of raw and/or cooked egg and white egg were analysed and quantified.

Finally, an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) was used as a conventional method to validate the results obtained by the developed immunosensor. The efficiency of the immunosensor for the quantification of ovotransferrin was proven, allowing the analysis of the presence/absence of the main food allergen (Gal d 3) to assess food label compliance with the legislation, thus fulfilling the overall goal of the proposed thesis.

Keywords: Electrochemical Biosensor, Immunosensor, Allergens, Food allergy, Amperometry, Legislation, Ovotransferrin, Egg, Egg White, Food products, Labelling, SPCE.

Índice

1.	Contextualização.....	1
1.1.	Motivação.....	1
1.2.	Objetivos	2
1.3.	Enquadramento do trabalho na Agenda 2030 das Nações Unidas	2
2.	Introdução	3
2.1.	Alergias alimentares	4
2.2.	Alergénios alimentares e Legislação.....	6
2.3.	Ovo & produtos alimentares que têm ou podem conter ovo.....	7
2.4.	Alergénios do ovo: o caso da Ovotransferrina (Gal d 3)	9
2.5.	Métodos analíticos convencionais para a deteção de alergénios alimentares.....	9
2.5.1	Métodos imunológicos para a análise de alergénios: ELISA.....	10
2.5.2.	Métodos de ADN para a análise de alergénios: PCR.....	12
2.5.3.	Outros métodos analíticos para a análise de alergénios	12
2.6.	Biossensores	12
2.6.1.	Biossensores eletroquímicos	14
2.6.2.	Imunossensores eletroquímicos	15
2.6.3.	Eléctrodos e célula eletroquímica	15
2.6.4.	Amperometria/Voltametria.....	16
2.6.5.	Nanomateriais para a modificação do transdutor	17
2.7.	Imunossensores eletroquímicos para a análise de alergénios do ovo: Estado de arte.....	18
2.8.	Parâmetros de otimização na construção e desenvolvimento do imunossensor amperométrico, validação do método e análise de Gal d 3 em produtos alimentares.....	20
3.	Parte experimental.....	22
3.1.	Material e Equipamentos	22
3.2.	Reagentes e Soluções.....	22
3.3.	Procedimento experimental.....	23
3.3.1.	Imobilização do anticorpo de captura.....	23
3.3.2.	Construção do imunossensor e deteção eletroquímica.....	23
3.4.	Preparação das amostras alimentares obtidas comercialmente	24
3.5.	Validação do imunossensor utilizando um método convencional	25
4.	Resultados e Discussão.....	26
4.1.	Técnicas eletroquímicas: voltametria cíclica e cronoamperometria	26
4.2.	Efeito da adição de agentes bloqueadores	27

4.3.	Efeito da adição de BSA	29
4.4.	Otimização das concentrações do Anticorpo de Captura (CAb) e do anticorpo de detecção conjugado com enzima Peroxidase (DAb-HRP)	30
4.5.	Otimização do tempo de incubação do antigénio e de DAb-HRP e do formato de ensaio.....	31
4.6.	Nanoestruturação/Modificação do SPCE.....	33
4.7.	Estudo do efeito da temperatura	34
4.8.	Sumário das otimizações das variáveis experimentais	35
4.9.	Avaliação do funcionamento do imunossensor	36
4.10.	Características analíticas do imunossensor	37
4.11.	Avaliação da estabilidade do biossensor	39
4.12.	Avaliação da seletividade e interferentes	40
4.13.	Estudo de recuperação e avaliação do efeito matriz.....	41
4.14.	Avaliação do fator de diluição e quantificação de Gal d 3 em clara de ovo.....	43
4.15.	Avaliação da fortificação de uma amostra alimentar	44
4.16.	Análise de produtos alimentares.....	45
4.17.	Validação dos resultados	49
4.18.	Comparação do Imunossensor desenvolvido com trabalhos descritos na literatura.....	52
5.	Conclusão	54
	Referências Bibliográficas.....	56

Índice de Figuras

Figura 1 – Prevalência e características clínicas das reações alérgicas em (A) adolescentes e (B) adultos Portugueses. Figura adaptada de [12][13], com permissão.	5
Figura 2 – Representação do número de “food recalls” devido a diferentes alérgenos entre 2007 e 2012. Figura adaptada de [25], com permissão.	7
Figura 3 – Representação de rótulos de produtos alimentares pré-embalados que contêm ou podem conter ovo e/ou clara de ovo (A, B e C), adquiridos em superfícies comerciais locais (Porto, Portugal).	8
Figura 4 – Representação dos alérgenos presentes no ovo ou Gallus gallus domesticus (G. gallus). Figura adaptada de [9], com permissão.	9
Figura 5 – Representação de um imunoenensaio enzimático do tipo não-competitivo (sandwich). Figura adaptada de [40], com permissão.	11
Figura 6 – Configuração de um biossensor eletroquímico. Neste exemplo a deteção do analito é efetuada utilizando um anticorpo como elemento bioreceptor, imobilizado num elétrodo serigrafado utilizado como elemento transdutor sendo gerado um sinal analítico após reconhecimento do analito-alvo. Figura adaptada de [50], com permissão.	14
Figura 7 – Representação de um SPE. Figura adaptada de [57], com permissão.	16
Figura 8 – Fluxograma referente (A) à biofuncionalização do imunossensor e (B) construção do imunoenensaio e deteção eletroquímica. (C) Ilustração esquemática do funcionamento do imunossensor eletroquímico.	24
Figura 9 – Representação gráfica do estudo eletroquímico de TMB e do imunossensor na ausência (0 ng/mL) e presença (500 ng/mL) do Gal d 3. (A) Voltamogramas (CV, de -0,2 a +0,6 V, velocidade de varrimento: 0,05 V/s), (B) Amperogramas (cronoamperometria, diferença de potencial fixa de 0 V aplicado durante 60 s).	26
Figura 10 – Diferentes agentes bloqueadores utilizados para a otimização do imunossensor (BSA 1%; Caseína 1%) e comparação com Tampão B1 (PBS, 0.1 M, pH 7,4). Parâmetros Experimentais: Gal d 3 (0 e 100 ng/mL), CAb (1 µg/mL), DAb-HRP (400×). Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).	27
Figura 11 – Otimização da quantidade de BSA (%) utilizada para a preparação da solução das biomoléculas (Gal d 3 e DAb-HRP). Parâmetros Experimentais: BSA (0,0; 0,10; 0,50; 1,0 e 2,0 % (m/v)), Gal d 3 (0 e 100 ng/mL), CAb (1 µg/mL), DAb-HRP (400×). Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).	29

Figura 12 – (A) Otimização da concentração do CAb (1,0; 2,5; 5,0; 10 µg/mL), com diluição DAb-HRP 400x; **(B)** Otimização da diluição do DAb-HRP (800x; 400x; 200x; 100x; em B1-BSA 0,5 %) com concentração fixa de CAb 2,5 µg/mL. Parâmetros experimentais: Gal d 3 (0 e 100 ng/mL, em B1-BSA 0,5 %). Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).30

Figura 13 – Otimização do tempo de incubação do ensaio e dos diferentes Formatos: I (passo a passo) e II (pré-incubação de Gal d 3 + DAb-HRP). Parâmetros Experimentais: Gal d 3 (0 e 100 ng/mL, em B1-BSA 0,5%), CAb (2,5 µg/mL), DAb-HRP (200x, em B1-BSA 0,5%). Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).32

Figura 14 – Nanoestruturação do SPCE com nanomateriais de diferentes dimensões. Parâmetros Experimentais: Gal d 3 (0 e 100 ng/mL, em B1-BSA 0,5%), CAb (2,5 µg/mL), DAb-HRP (200x, em B1-BSA 0,5%). Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).33

Figura 15- Representação dos resultados obtidos para o estudo correspondente à influência da temperatura no decorrer do ensaio, em dias distintos. Parâmetros Experimentais: Gal d 3 (0 e 100 ng/mL, em B1-BSA 0,5 %), CAb (2,5 µg/mL), DAb-HRP (200x, em B1-BSA 0,5 %). Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).34

Figura 16 – (A) Avaliação do funcionamento do imunossensor; **(B)** Amperogramas relativos aos parâmetros avaliados. Parâmetros Experimentais: ausência de 1 – CAb, 2 – alergénio (Gal d 3), 3 – DAb-HRP, 4 – TMB, e 5 – presença de todos os reagentes/biomoléculas. Outros parâmetros: Gal d 3 (0 e 1000 ng/mL, em B1-BSA 0,5%), CAb (2,5 µg/mL), DAb-HRP (200x, em B1-BSA 0,5%). Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).36

Figura 17 –Análise do alergénio Gal d 3 por cronoamperometria (diferença de potencial fixa de 0 V, aplicado durante 60 s). **(A)** Intensidades obtidas para a gama em estudo (25 a 4000 ng/mL de Gal d 3) **(B)** Reta de calibração para a análise do alergénio (I vs concentração de Gal d 3): 50,0; 100; 200; 400; 600; 800; 1000 ng/mL em B1-BSA 0,5%; **(C)** Amperogramas obtidos para as concentrações de Gal d 3 na zona de linearidade. Parâmetros Experimentais: CAb (2,5 µg/mL), DAb-HRP (200x, em B1-BSA 0,5%). Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).37

Figura 18 – Representação do estudo da estabilidade do biossensor durante 40 dias. Parâmetros experimentais: Gal d 3 (500 ng/mL em B1-BSA 0,5 %), CAb (2,5 µg/mL), DAb-HRP (200x, em B1-BSA 0,5 %). As linhas representam: média dos valores (linha tracejada) \bar{x} ; e soma da média e desvio padrão (n=3) $\bar{x} \pm \varphi$ (linhas contínuas) de um conjunto de medições efetuadas ao longo de 40 dias.39

Figura 19 – Estudo da seletividade e interferentes utilizando proteínas alergénicas alvo (Gal d 3 – 0 e 1000 ng/mL) e não-alvo (Ara h 1, Gal d 1, Gad c 1 e Api g 1, 1000 ng/mL). Parâmetros

Experimentais: CAb (2,5 µg/mL), DAb-HRP (200×, em B1-BSA 0,5 %). Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).	40
Figura 20 – Representação da comparação entre a análise de soluções de Gal d 3 preparadas em tampão (I ₁ , Gal d 3: 250, 600, 800 e 1000 ng/mL, em B1-BSA 0,5%) e em extrato de cereal integral (I ₂ , Gal d 3: 250, 500, 750 e 1000 ng/mL, em B1-BSA 0,5%). Parâmetros experimentais: CAb (2,5 µg/mL), DAb-HRP (200×, em B1-BSA 0,5%). Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).	42
Figura 21 – Estudo da otimização da diluição da amostra alimentar (clara de ovo; diluições testadas: 100×; 250×; 1000×; 2000×; 5000×; 10.000×). Parâmetros experimentais: CAb (2,5 µg/mL), DAb-HRP (200×, em B1-BSA 0,5 %).	43
Figura 22 – Quantificação do alergénio Gal d 3 (µg/g) em percentagens (%) crescentes de clara de ovo previamente adicionada a cereal integral. Parâmetros experimentais: CAb (2,5 µg/mL), DAb-HRP (200×, em B1-BSA 0,5%).	44
Figura 23 – Representação da quantificação de Gal d 3 (mg/g) num conjunto de amostras alimentares, utilizando o imunossensor desenvolvido. Parâmetros experimentais: (A) clara de ovo sólido; (B) clara de ovo líquido; (C) clara de ovo cozida; (D) clara de ovo frita; (E) clara de ovo escalfada; (F) clara de ovo em castelo; (G) ovo inteiro.	45
Figura 24 – Resultados da análise de Gal d 3 num conjunto de amostras alimentares, utilizando o imunossensor desenvolvido. Não contém ovo: 1 – Cereal Integral; 2 – Bolacha Belga; 3 – Farinha; 4 – Aipo; 5 – Sésamo; 6 – Soja; 7 – Amendoim; 8 – Avelã; 9 – Aveia; 10 – Pudim royal; 11 – Pudim flan em pó. Pode conter vestígios de ovo: 12 – Bolacha de Amendoim e Ananás; 13 – Bolacha água e sal; 14 – Bolacha Maria; 15 – Caldo de legumes; 16 – Pão de ló da marca Branca. Contém ovo: 17 – Bolachas areias; 18 – Muffins (ovo 13%, clara de ovo 8%); 19 – Madalenas (clara de ovo 8%, ovo 5%); 20 – Massa alimentícia 60% (sêmola de trigo, clara de ovo); 21 – Pudim flan (ovo 17,8%); 22 – Pudim de ovos (ovo 5%); 23 – Pão de ló (ovo em pó); 24 – Preparado de doce de ovos (ovo 13%); 25 – Torta enrolada (ovo 7%, clara de ovo 3%).	47
Figura 25 – Correlação entre os valores obtidos utilizando o imunossensor amperométrico desenvolvido e ELISA como técnica tradicional. (A) Correlação para Ingredientes / Produtos Alimentares que não contêm, podem conter vestígios ou contêm ovo; (B) Correlação para ovo e/ou clara de ovo.	50

Lista de Abreviaturas

- ADN – Ácido Desoxirribonucleico
- AE – Eléctrodo Auxiliar, do inglês *Auxiliary Electrode*
- AuNP – Nanopartículas de Ouro, do inglês *Gold Nanoparticles*
- B1 – Tampão fosfato-salino (PBS)
- BSA – Albumina do Soro Bovino, do inglês *Bovine Serum Albumin*
- B1-BSA – Tampão fosfato-salino (PBS) + BSA 0.5 % (m/v)
- CAb – Anticorpo de Captura, do inglês *Capture Antibody*
- CNT – Nanotubos de Carbono, do inglês *Carbon Nanotubes*
- CV – Voltametria cíclica, do inglês *Cyclic Voltammetry*
- DAb – Anticorpo de Detecção, do inglês *Detection Antibody*
- DAb-HRP – Anticorpo de Detecção modificado com enzima Peroxidase
- DE μ D – Dispositivo Microfluídico Eletroquímico Descartável, do inglês *Disposable electrochemical microfluidic device*
- DPV – Voltametria de impulso diferencial, do inglês *Differential pulse Voltammetry*
- ELISA – Ensaio de Imuno-Absorção Enzimática, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
- GO – Óxido de Grafeno, do inglês *Graphene Oxide*
- HQ – Hidroquinona
- HRP – Peroxidase de rábano silvestre, do inglês *Horseradish peroxidase*
- IgE – Imunoglobulina E
- LFA – Ensaio de Fluxo Lateral, do inglês *Lateral flow assay*
- LSV – Voltametria de Varrimento Linear, do inglês *Linear Sweep Voltammetry*
- LOD – Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*
- LOQ – Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*
- MBs-COOH – Partículas Magnéticas Carboxiladas, do inglês *Carboxylated Magnetic Beads*
- MIP – Polímero Molecularmente Impresso, do inglês *Molecularly Imprinted Polymer*
- ND – Nanodiamantes
- NR – Não Reportada
- PBS – Tampão fosfato-salino, do inglês *Phosphate Buffered Saline*
- PCR – Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*
- PDDA – Poli (cloreto de dialildimetilamónio)
- RE – Eléctrodo de Referência, do inglês *Reference Electrode*
- rGO – Óxido de Grafeno Reduzido, do inglês *Reduced Graphene Oxide*

RSD – Desvio padrão relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*

SPCE – Eléctrodo Serigrafado de Carbono, do inglês *Screen Printed Carbon Electrode*

SPE – eléctrodo serigrafado, do inglês *Screen-printed Electrode*

SWV – Voltametria de onda quadrada, do inglês *Square Wave Voltammetry*

TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

WE – Eléctrodo de Trabalho, do inglês *Working Electrode*

1. Contextualização

Este trabalho foi realizado no âmbito da unidade curricular de Tese/Dissertação do mestrado em Engenharia Biomédica do Instituto Superior de Engenharia do Porto, do Instituto Politécnico do Porto (ISEP/IPP).

A elaboração e desenvolvimento do trabalho experimental conducente à realização da Tese/Dissertação foram efetuados no Grupo de Reação e Análises Químicas (GRAQ) situado no ISEP-IPP (www.graq.isep.ipp.pt). O GRAQ é um grupo de investigação, constituído por uma equipa pluridisciplinar de investigadores, situado no ISEP e integra a Rede de Química e Tecnologia (REQUIMTE) - Laboratório Associado para a Química Verde (LAQV). Atualmente, REQUIMTE/LAQV-GRAQ contribui para a criação, aplicação e divulgação de conhecimento, promovendo a inovação em diversas áreas da investigação.

1.1. Motivação

O tema abordado, referente à análise de um alergénio alimentar, e o impacto da presença de quantidades vestigiais em produtos comerciais, é de interesse para a sociedade em geral e para a indústria alimentar em particular, tendo em consideração a percentagem crescente da população com hipersensibilidade e/ou alergias alimentares. Torna-se assim essencial o desenvolvimento de dispositivos portáteis que permitam a análise do analito-alvo com elevada seletividade e sensibilidade no local de recolha de amostra e a obtenção de resultados num curto período.

Os biossensores são exemplos destes dispositivos que demonstram utilidade prática principalmente em áreas clínicas ou em problemáticas emergentes, como por exemplo, na área alimentar. Deste modo, a utilização de biossensores pode se revelar útil para a indústria alimentar pois estes permitem efetuar o controlo dos produtos alimentícios (embalados ou pré-embalados) através do rastreio das quantidades vestigiais de alergénios presentes nos produtos referidos. A sua utilização rotineira pode possibilitar uma maior segurança, auxiliando, deste modo, indivíduos que apresentem sintomas de alergias alimentares que variam de ligeiros a severos, como por exemplo, anafilaxia.

1.2. Objetivos

A presente dissertação teve como objetivo o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para a deteção de um alergénio do ovo, particularmente da clara do ovo (ovotranferrina, Gal d 3). Como tal, desenvolveu-se um imunossensor eletroquímico, utilizando como elemento transdutor um elétrodo serigrafado descartável (elétrodo de carbono serigrafado (SPCE)) e como técnicas analíticas a amperometria e a voltametria. O elemento de bioreconhecimento (bioreceptor) selecionado foi um anticorpo específico (anti-ovotranferrina) para o analito-alvo.

1.3. Enquadramento do trabalho na Agenda 2030 das Nações Unidas

Alinhado com a Agenda 2030 das Nações Unidas (ONU), este projeto visou encontrar soluções que garantam a saúde e o bem-estar de indivíduos com hipersensibilidade a alimentos com características alergénicas, em linha com uma estratégia integrada em abordagens sustentáveis baseadas na melhoria da qualidade de vida, potenciando a utilização de dispositivos miniaturizados para prevenir, garantir e/ou monitorar um ambiente seguro e condições de saúde adaptadas ao ambiente exterior através de dispositivos de baixo custo, de resposta rápida e portáteis. Os objetivos deste trabalho estão incluídos, mas não limitados aos Objetivos 3 e 12 da Agenda 2030:

Objetivo 3 – Saúde de Qualidade

Objetivo 12 – Produção e consumo sustentáveis

Este trabalho pretende contribuir para a Agenda 2030 da ONU reforçando a capacidade de alerta precoce, redução de riscos e gestão de riscos sanitários nacionais e globais, contribuindo assim para a análise fácil e rápida dos alergénios alimentares, tendo como princípio o facto de que a alergia alimentar é uma das muitas preocupações gerais de saúde pública, afetando mais de 17 milhões de pessoas na Europa.

2. Introdução

O número de pessoas com alergias alimentares tem vindo a aumentar significativamente, constituindo, atualmente, um problema de saúde pública a nível mundial, mais concretamente, em países desenvolvidos. Em 2013 esta doença afetava entre 200 e 250 milhões de indivíduos a nível global [1]. Estatísticas recentes reportam que em 2018 as alergias alimentares afetavam 10 % da população mundial, com elevada prevalência em crianças [2].

Por se tratar de um distúrbio imunológico, por vezes fatal, a alergia alimentar tem ganho destaque e relevância numa sociedade consumista que requer a prevenção desta patologia. A informação prestada ao consumidor presente nos rótulos acerca das características e composição dos produtos que adquire deve ser feita de uma forma eficaz e pormenorizada para que este possa, conscientemente, fazer as suas escolhas em prol da sua saúde e bem-estar, estando de acordo com a legislação em vigor.

A legislação europeia vigente contempla a obrigatoriedade na identificação/rotulagem de 14 substâncias ou produtos que provocam alergias ou intolerâncias. Entre estes, o ovo é considerado um dos principais alergénios alimentares causadores de reações/sintomas numa elevada percentagem de indivíduos, sobretudo crianças.

A avaliação da eficiente rotulagem, bem como o controlo de qualidade de produtos alimentares é atualmente efetuada por métodos analíticos convencionais, desvantajosos quanto ao custo de análise, exigência de profissionais qualificados e equipamento dispendioso.

As recentes abordagens tecnológicas na indústria alimentar incluem a utilização de dispositivos portáteis, miniaturizáveis, de resposta rápida e deteção de quantidades vestigiais. Assim, os biossensores ganharam destaque no desenvolvimento e aplicação em amostras alimentares, de modo a responder às necessidades atuais dos produtores em particular e da sociedade em geral.

2.1. Alergias alimentares

Atualmente, as alergias alimentares são uma preocupação crescente de segurança alimentar e saúde pública [3]. Estas resultam na ocorrência de reações adversas à saúde, resultantes da sensibilidade imunomediada a diversos alérgenos alimentares que podem estar relacionadas com proteínas presentes em determinados alimentos. Estas reações ou sintomatologias podem variar de moderadas a graves, levando em casos extremos a problemas severos [4][5].

As reações alimentares adversas são de consideração relevante e podem ser classificadas como reações imunomediadas (hipersensibilidade e/ou alergias alimentares) ou reações não imunomediadas (intolerâncias alimentares). No caso da intolerância alimentar, as reações adversas ocorrem devido a irregularidades metabólicas. Por sua vez, a alergia alimentar é referente a reações imunomediadas por Imunoglobulina E (IgE), embora também possa ser mediada por não-IgE, ou IgE mediada por células. Em reações mediadas por IgE, após a fase de sensibilização prévia, os antigénios (alérgenos) podem ser reconhecidos por células específicas, induzindo reações de hipersensibilidade. Posto isto, as reações imunomediadas podem ser classificadas em quatro tipos: tipo I (mediada por IgE), tipo II (reação citotóxica), tipo III (mediada por imunocomplexos) e tipo IV (mediada por células). Estas reações imunomediadas podem variar consoante o grau de inflamação, sendo que, quando mediadas por IgE, nomeadamente no caso de alergias, podem ser de grau I ou IV [6].

As reações imunomediadas por IgE são de extrema importância para a saúde pública, uma vez que as alergias alimentares afetam entre 3 % a 10 % da população adulta, com uma prevalência de 8 % na população infantil por todo o mundo [4][5]. A manifestação de hipersensibilidade ou alergia encontra-se geralmente associada ao rápido desenvolvimento de sintomas (hipersensibilidade imediata), podendo ocorrer distintas sintomatologias/reações alérgicas desde cutâneas, respiratórias, gastrointestinais e cardiovasculares, num espaço temporal que decorre poucos minutos após a exposição a um alérgeno específico (que ocorre sobretudo pela ingestão de alimentos) podendo decorrer durante algumas horas (~2h) [7][8]. Por sua vez, as reações imunomediadas por não-IgE (hipersensibilidade prolongada), ocorrem ao longo de uma linha temporal mais espaçada correspondente a mais de 1 a 2 horas ou até mesmo dias após o consumo de um alimento [4].

Quando um indivíduo com hipersensibilidade entra em contacto com alimentos ou produtos alimentares que contenham ou possam conter alérgeno alimentares, pode desencadear diversas reações imunológicas. A gravidade de uma determinada reação num indivíduo depende especialmente da sensibilidade do mesmo, da quantidade de alimento ingerida, outros problemas/condições médicas relevantes tais como asma, medicações associadas, entre outros

[5]. Aquando da ocorrência de situações severas relacionadas com reações alérgicas, um determinado indivíduo pode correr o risco de sofrer reações anafiláticas, necessitando de tratamento urgente (por exemplo, anti-histamínicos) [8].

A tolerância à hipersensibilidade de alergénio alimentares é variável, sendo que por exemplo para o ovo ocorre em 60 a 75 % dos adolescentes, contudo as consequências de uma reação alérgica destes indivíduos enquanto criança podem ser moderadas a severas, sendo que os efeitos colaterais incluem vômitos, dor de estômago, intestino solto, urticária e até mesmo choque anafilático [9]. Apesar de existirem diversos tratamentos com anti-histamínicos e corticoides, ainda não existem abordagens terapêuticas aceites. Posto isto, verificou-se que uma das melhores formas de precaver sintomas leves ou graves relativos à hipersensibilidade dos alergénios seria evitar estritamente alimentos específicos [7][10].

Realizaram-se, em Portugal, estudos relativos à prevalência e características clínicas das reações alérgicas em crianças [11], adolescentes [12] e adultos [13]. Efetuou-se a análise correspondente ao número de casos reportados de episódios alérgicos de diferentes alergénios alimentares em adolescentes (**Figura 1A**) e adultos (**Figura 1B**).

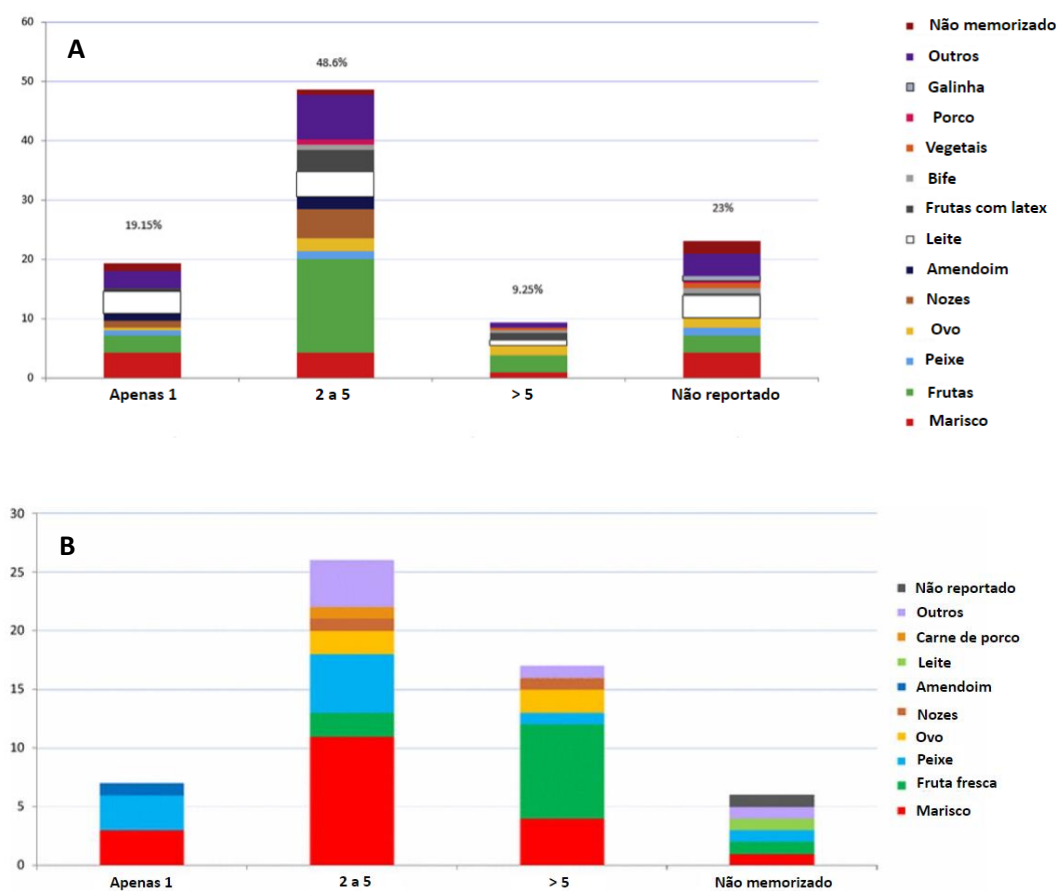


Figura 1 – Prevalência e características clínicas das reações alérgicas em **(A)** adolescentes e **(B)** adultos Portugueses. Figura adaptada de [12][13], com permissão.

Verifica-se que, tanto em adolescentes como em adultos existe uma percentagem significativa correspondente à ocorrência de 2 a 5 e/ou mais de 5 episódios alérgicos correspondentes ao alergénio do ovo.

Devido ao aumento de casos descritos de reações alérgicas na população, a regulamentação europeia estabelece que os operadores de empresas e produtores de alimentos (para alimentos pré-embalados e não pré-embalados) devem fornecer informações aos consumidores nos rótulos dos produtos sobre substâncias especificadas que comprovadamente desencadeiam uma reação adversa alérgica ou de intolerância.

2.2. Alergénios alimentares e Legislação

A identificação assertiva dos alergénios presentes em refeições e/ou produtos alimentares e a sua correta rotulagem/referência é fundamental devido ao potencial risco em afetar severamente indivíduos com elevada sensibilidade, por serem as principais causadoras de reações alérgicas [14][15]. Ao longo das últimas décadas, 90 % das reações alérgicas alimentares reportadas eram causadas por 8 principais alergénios: leite, peixe, ovo, crustáceos, amendoim, soja, nozes e trigo [16].

Tendo por base a elevada percentagem de casos descritos, foram elaboradas na União Europeia (UE), as Diretivas 2000/13/EC [17] e 2003/89/EC [18] que exigiam às empresas de produtos alimentares uma declaração obrigatória de rotulagem em alimentos alergénicos pré-embalados que, para além dos alergénios mencionados anteriormente, incluem aipo, mostarda, sementes de sésamo e sulfitos. Por sua vez, a Diretiva da Comissão 2006/142/CE [19] posteriormente promulgada promoveu a inclusão de tremoços e moluscos [20].

Recentemente, o Regulamento (UE) 1169/2011 [21] alargou a rotulagem obrigatória para 14 principais alergénios alimentares, incluindo ainda, desde 2014, os produtos não pré-embalados, visando a realização de práticas necessárias à segurança alimentar dos consumidores [22].

No entanto, a prática de uma rotulagem eficaz revela-se uma tarefa exaustiva devido à possibilidade da presença de quantidades vestigiais dos alergénios referidos anteriormente em alimentos. A presença dos mesmos geralmente advém da possível contaminação cruzada durante a confeção de determinados produtos. Assim sendo, de forma a mitigar este problema as empresas alimentares optam por utilizar as menções “Pode conter...”, “Pode conter vestígios de...” ou “Produzido em equipamento que também processa ...” como rotulagem de precaução [23].

Contudo, a insuficiente correlação entre a presença/ausência de alergénios e a sua rotulagem de precaução levou os consumidores a perderem a confiança nos rótulos dos

alimentos, tal como descrito recentemente na literatura [24]. Verificou-se num estudo realizado entre 2007 e 2012 [25] que o leite, o ovo e o glúten eram considerados os alergénios causadores de um elevado número de indivíduos que sofriam de reações alérgicas, tal como se pode observar nos dados apresentados na **Figura 2**. Os autores abordaram o tema “*food recall*”, ou seja, alertas de segurança de alimentos, que advêm do facto de um produtor de alimentos tomar a decisão de retirar um produto do mercado por existirem motivos (por exemplo alergénios alimentares provenientes de contaminações cruzadas) que o levam a acreditar que o produto pode causar reações adversas aos consumidores.

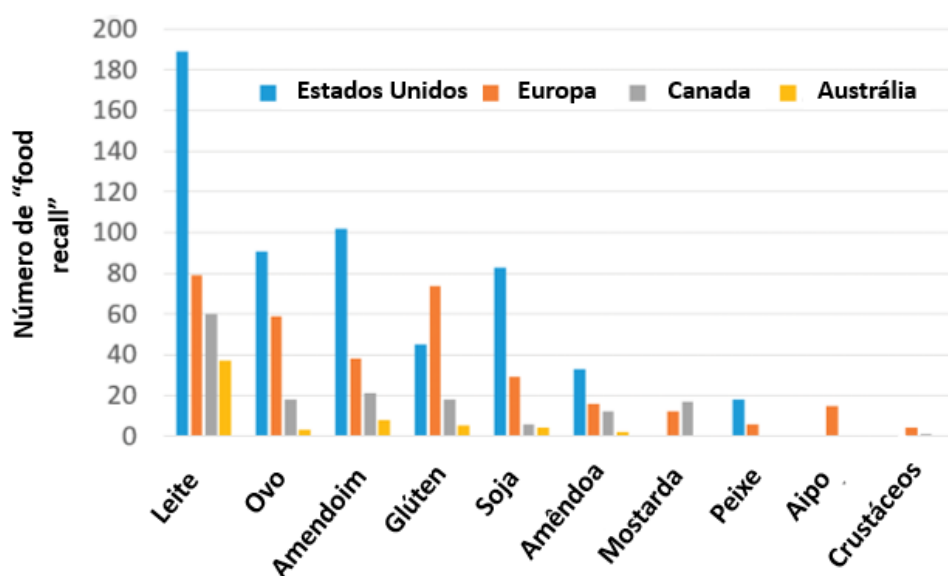


Figura 2 – Representação do número de “*food recalls*” devido a diferentes alergénios entre 2007 e 2012. Figura adaptada de [25], com permissão.

2.3. Ovo & produtos alimentares que têm ou podem conter ovo

O ovo de galinha (*Gallus gallus domesticus*) é considerado um alimento de interesse no ponto de vista funcional, pois apresenta um elevado teor proteico e nutritivo, fornece variedade culinária à dieta, sendo ainda um alimento de custo reduzido [26]. O ovo é constituído por três partes: casca (não comestível), clara e gema (comestíveis). Embora todos estes componentes sejam repletos de proteínas, as maiores concentrações encontram-se na clara (50 %) e na gema (40 %), sendo que as restantes estão presentes na casca [27].

O consumo do ovo na união europeia (UE) tem variações de acordo com a localização geográfica de cada país e os hábitos alimentares da população. Assim, de acordo com estudos reportados na literatura, o consumo médio de ovos na UE diminuiu cerca de 3,5 % em 2001. No entanto, este consumo aumentou em países como a Irlanda, Itália e Portugal [28]. Em termos de saúde pública, o consumo de ovos é importante na dieta de indivíduos com défice ou

insuficiência de nutrientes, como idosos, mulheres grávidas e crianças. Para além deste fator, devido ao seu elevado teor proteico, a inclusão deste alimento na dieta (sobretudo de indivíduos com atividade física ativa) pode auxiliar na fortificação do sistema músculo-esquelético de, sobretudo, atletas, e assim promover a obtenção de resultados físicos auspiciosos, permitindo o reforço e manutenção da massa muscular, bem como a prevenção da degeneração muscular [26][29].

Não obstante as propriedades nutricionais de elevado interesse, o ovo é considerado um dos principais alergénios alimentares causadores de possíveis reações alérgicas. A presença não intencional de alergénios do ovo nos alimentos muitas vezes resulta de contaminações cruzadas que podem resultar em problemas adversos em indivíduos com hipersensibilidade. Como exemplos de alimentos que podem apresentar na sua constituição vestígios de ovo são de crucial referência da alimentação (portuguesa) bolos e bolachas provenientes de pastelaria, gelados, molhos para salada, massas, sandes, vinhos, entre outros [26][30].

Assim sendo, torna-se necessário declarar nos rótulos de todos os alimentos a presença de possíveis vestígios do alergénio, permitindo a disponibilização de informações relevantes aos consumidores. Deste modo, será possível precaver a ingestão de determinados alimentos e consequente ocorrência de possíveis reações severas em indivíduos com hipersensibilidade. Na **Figura 3** apresentam-se rótulos de produtos alimentar pré-embalados obtido comercialmente, verificando-se que são cumpridos todos os requisitos exigidos pela legislação em vigor.

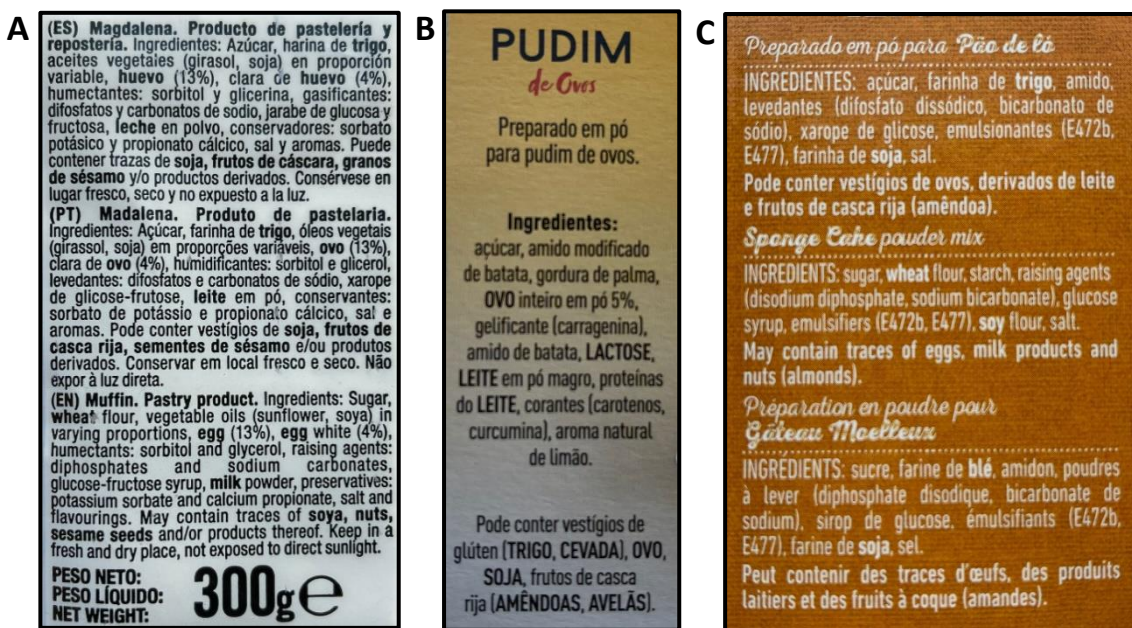


Figura 3 – Representação de rótulos de produtos alimentares pré-embalados que contêm ou podem conter ovo e/ou clara de ovo (A, B e C), adquiridos em superfícies comerciais locais (Porto, Portugal).

2.4. Alergénios do ovo: o caso da Ovotransferrina (Gal d 3)

A hipersensibilidade ao ovo afeta cerca de 9 % das crianças a nível mundial, sendo uma das alergias alimentares mais comuns na população infantil [9].

Atualmente, estão descritos dez diferentes alergénios presentes nos ovos de *Gallus gallus domesticus* (*G. gallus*), sendo designados por *Gal d* [31]. Os principais alergénios do ovo encontram-se representadas na **Figura 4**. Entre as descritas, os alergénios presentes na clara de ovo são considerados os principais causadores de reações alérgicas, sendo denominados por ovomucóide (Gal d 1, 11 %), ovalbumina (Gal d 2, 54 %), ovotransferrina (Gal d 3, 12 %), e lisozima C (Gal d 4, 3.4 %). Para além destes, existem outros alergénios que se encontram presentes na gema do ovo, nomeadamente albumina sérica (Gal d 5), também designada como α -livetina e YGP42 (Gal d 6). No entanto, estes últimos (da gema) não se encontram relacionados com a maioria das reações alérgicas descritas [9].

Apesar de a ovalbumina existir em maior abundância no ovo, o ovomucóide apresenta uma maior recorrência de reações alérgicas, sobretudo por ser resistente a temperaturas elevadas [32].

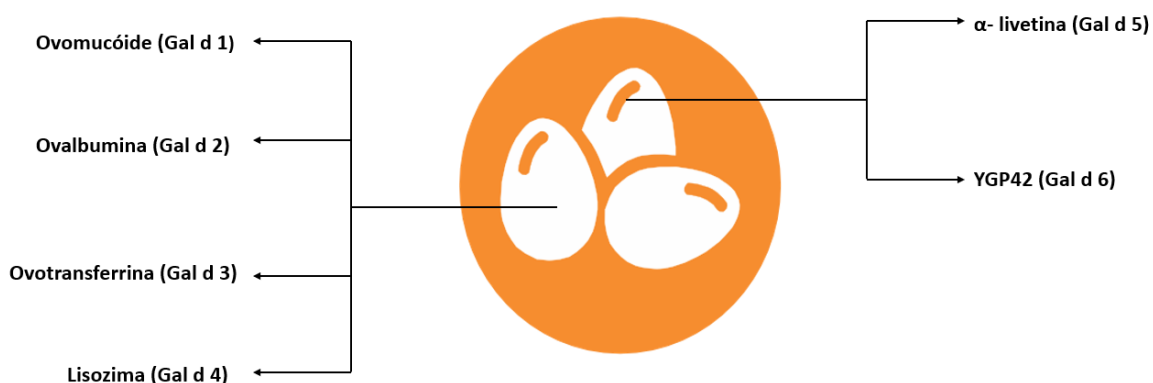


Figura 4 – Representação dos alergénios presentes no ovo ou *Gallus gallus domesticus* (*G. gallus*). Figura adaptada de [9], com permissão.

2.5. Métodos analíticos convencionais para a deteção de alergénios alimentares

A alimentação tem sofrido alterações devido, entre outros, a contextos socioeconómicos diversificados em áreas geográficas variadas. O consumidor é cada vez mais exigente, demonstrando maior cuidado e preocupação nos produtos alimentares comercialmente disponíveis que adquire. Assim há a necessidade de proteger os consumidores que apresentam hipersensibilidades e consequentes reações alérgicas, possivelmente letais, a determinados

alimentos. Assim, através da detecção da presença ou possível contaminação de vestígios de alergénios e rotulagem eficaz do alimento [33], é possível dispor aos consumidores informações acerca da composição do produto, ocorrência de contaminação cruzada e adição ilegal de componentes alergénicos (adulteração) [34].

Para que exista um controlo de qualidade efetivo, deve-se recorrer a métodos analíticos que, pelas suas características como rapidez de análise e obtenção de resultado, custo reduzido, alta sensibilidade e precisão, possam ser utilizados por entidades de fiscalização ou pelos próprios consumidores para que efetuem a análise de diferentes componentes de um determinado alimento e confirmem a presença/ausência de alergénios específicos [35][36]. Esta é geralmente uma tarefa difícil, devido à presença de quantidades vestigiais dos respetivos alergénios nos alimentos e interferências naturais de compostos presentes na matriz alimentar [16][33].

A detecção de alergénios alimentares é frequentemente efetuada por métodos comumente focados no bioreconhecimento de: (1) proteínas, (2) ácido desoxirribonucleico (ADN).

Na detecção de proteínas específicas utiliza-se frequentemente o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Por outro lado, os ensaios de fluxo lateral (LFA, do inglês *Lateral flow assays*) têm recentemente ganho enorme importância [37]. Os LFA são métodos imunológicos com utilização crescente sobretudo para análises na área da clínica (por exemplo: testes da gravidez e covid-19). Contudo, a indústria alimentar tem demonstrado interesse na aquisição de testes semelhantes para análise de analitos-alvo específicos, tais como alergénios alimentares. Apesar de os LFA permitirem uma rápida análise de determinados alergénios num alimento, apresentam uma sensibilidade questionável por ser um método qualitativo / semi-quantitativo [34].

Os métodos baseados na detecção de ADN permitem detetar a sequência que codifica proteínas de certos alergénios, sendo essa sequência de oligonucleótidos amplificada pela reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*).

2.5.1 Métodos imunológicos para a análise de alergénios: ELISA

A técnica convencionalmente utilizada para a análise de alergénios é o ELISA. Neste imunoensaio utilizam-se anticorpos monoclonais ou policlonais para o reconhecimento de uma ou mais proteínas específicas (neste caso, alergénios). O sinal analítico é obtido após adição de um substrato enzimático, originando uma variação de cor. Ao contrário dos métodos qualitativos (por exemplo o LFA), este método é semi-quantitativo ou quantitativo e apresenta uma maior sensibilidade, elevada precisão e robustez. Contudo, requer instrumentação relativamente cara (espectrofotómetro) e técnicos com experiência para o eficiente

manuseamento. Para além dos fatores referidos, este método é propenso a reações cruzadas e devido ao grande porte dos equipamentos não aporta características como a possível miniaturização [10].

Os imunoenaios podem ser categorizados em formatos competitivos, não competitivos (*sandwich*) ou *label-free*. Entre estes, o ensaio do tipo *sandwich*, representado na **Figura 5**, é o mais vastamente utilizado para a deteção de alérgenos alimentares pelas suas características vantajosas como maior sensibilidade, precisão e linearidade, fornecendo deste modo resultados mais confiáveis [38][39]. No ensaio *sandwich* são utilizados anticorpos (monoclonais e/ou policlonais), sendo um deles tipicamente não modificado (anticorpo de captura, CAb), o qual é **(i)** imobilizado na superfície de uma placa de 96 poços, **(ii)** ocorrendo a ligação a determinado antígeno [40].

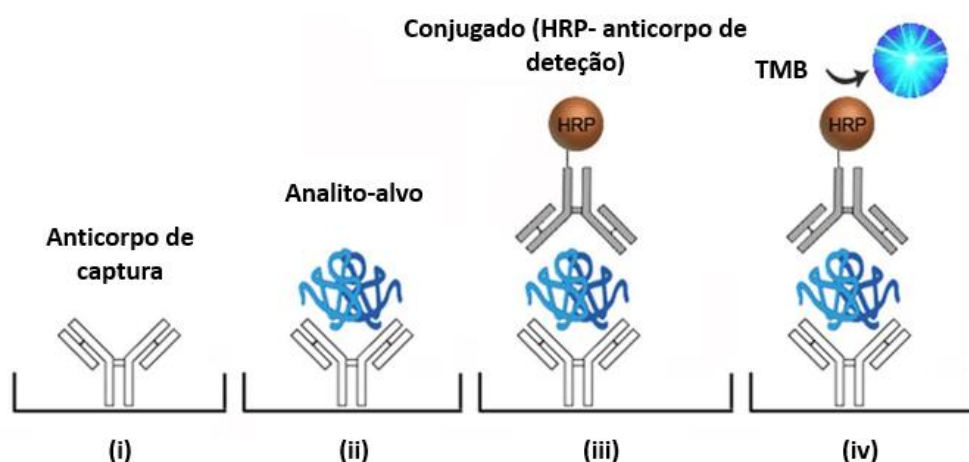


Figura 5 – Representação de um imunoensaio enzimático do tipo não-competitivo (*sandwich*). Figura adaptada de [40], com permissão.

Posteriormente, adiciona-se **(iii)** o segundo anticorpo (anticorpo de deteção, DAb) específico para o reconhecimento do antígeno, o qual se encontra normalmente conjugado com uma biomolécula (por exemplo, a enzima Peroxidase de rábano silvestre (HRP)). Este conjugado reage com **(iv)** um marcador de sinal (substrato enzimático, por exemplo TMB) que permite a identificação do analito-alvo. A enzima converte o substrato enzimático num produto detetável qualitativa e/ou quantitativamente. A intensidade do sinal produzido aquando da adição do substrato é diretamente proporcional à quantidade de antígeno capturado.

2.5.2. Métodos de ADN para a análise de alergénios: PCR

Num formato distinto comparativamente com os métodos imunológicos, os métodos de análise de ADN envolvem a extração de um fragmento de ADN codificador relativo a um alergénio específico e a sua posterior amplificação através da técnica PCR. Este método, apesar da sua vasta utilização, necessita de conhecimento prévio da sequência-alvo, requer instrumentação relativamente cara sendo, porém, um método altamente específico e reprodutível, com uma análise indireta e qualitativa. Para além disso, requer indivíduos especializados e o risco de reatividade cruzada é elevado podendo resultar em falsos-positivos [35].

2.5.3. Outros métodos analíticos para a análise de alergénios

O pré-tratamento do alimento ou produto alimentar, como por exemplo o aquecimento ou processamento pode levar a alterações na estrutura do alergénio, podendo comprometer a sua deteção. Este é um dos principais problemas associados aos métodos imunológicos. Assim sendo, de forma a transpor a problemática referida ou a confirmar a deteção eficiente, é possível efetuar as análises por cromatografia acoplada à espectrometria de massa.

Esta técnica é uma alternativa útil para na deteção e quantificação de vestígios de alergénios alimentares, sendo muito eficaz na confirmação da presença de alergénios submetidos a diferentes condições externas, por exemplo, variações de temperatura. No entanto apresenta custos de instrumentação e de operação elevados, com a preparação da amostra em várias etapas, tornando este método exaustivo [14][33][34].

2.6. Biossensores

Os biossensores têm sido extensivamente estudados e desenvolvidos, por apresentarem particularidades vantajosas, nomeadamente na rápida deteção, monitorização e/ou rastreabilidade de alergénios, garantindo a qualidade e segurança de alimentos ou produtos alimentares [41]. Apresentam como principais vantagens uma resposta rápida, simplicidade de análise, excelente relação custo-benefício, facilidade de manuseamento, miniaturização e consequente portabilidade [42]. Biossensores consistem em pequenos dispositivos, constituídos por dois componentes principais: Bioreceptor e transdutor. O bioreceptor (elemento de reconhecimento biológico) efetua o reconhecimento do analito-alvo, decorrendo uma interação bioquímica, podendo formar-se um complexo (por exemplo antigénio-anticorpo no caso dos imunossensores). Tendo por base o complexo originado é gerado um sinal físico ou químico, convertido posteriormente num sinal elétrico mensurável através de um componente

eletrónico denominado de transdutor físico que se encontra ligado a jusante do suporte de imobilização do biossensor [34][43].

De forma a comparar os métodos analíticos tradicionais previamente abordados e os biossensores estão sumariamente descritas, na tabela 1, as principais características referentes a cada método.

Tabela 1 – Representação das características relativas a métodos de análise de alergénios.

Métodos	Características	
ELISA	-Elevada sensibilidade -Elevada precisão -Elevada robustez	-Instrumentação cara -Analistas especializados -Possibilidade de reações cruzadas -Difícilmente miniaturizável
LFA	-Análise qualitativa / semi-quantitativa -Rápida deteção	-Baixa sensibilidade
PCR	-Instrumentação acessível -Método específico e de alto rendimento	-Analistas especializados -Possibilidade de reações cruzadas
Espectrometria de massa	-Deteção eficaz em alimentos processados	-Instrumentação cara -Muito trabalhoso -Analistas especializados
Biossensores	-Fácil utilização e manuseio simplificado -Resposta rápida -Excelente relação custo-benefício -Miniaturização/Portabilidade -Elevada sensibilidade e seletividade	-Tempo de vida útil reduzido -Descartáveis e de uso único

No desenvolvimento do biossensor, uma das etapas mais importantes consiste na imobilização do elemento biológico na superfície do transdutor. Entre as técnicas mais utilizadas constam a afinidade, adsorção (física ou química), encapsulamento, ligação covalente ou ligação cruzada [44].

Os biossensores são, de modo geral, classificados de acordo com o bioreceptor selecionado e pelo transdutor utilizado [45]. De acordo com o bioreceptor, os biossensores podem ser classificados, entre outros, como imunossensores (utilizam anticorpos como elemento de bioreconhecimento, ocorrendo a interação antigénio-anticorpo), biossensores enzimáticos (interação enzima-analito) e genossensores (o elemento de reconhecimento pode ser aptâmero, sequência de ADN e/ou oligonucleótido) [46]. Por sua vez, quanto aos transdutores, os biossensores podem ser classificados como eletroquímicos, óticos, piezoelétricos ou calorimétricos [47].

2.6.1. Biossensores eletroquímicos

Os biossensores eletroquímicos utilizam elétrodos como elemento transdutor. Entre as suas características mais proeminentes salientam-se a sensibilidade do método, a possibilidade de atingir limites de deteção tipicamente na ordem dos nanogramas por litro, a elevada especificidade do processo de biorechecimento utilizando transdutores eletroquímicos muitas vezes modificados ou nanoestruturados (por exemplo com nanomateriais ou monocamadas auto-organizadas) [48]. Na **Figura 6** encontra-se esquematicamente representado um biossensor eletroquímico e os elementos habitualmente utilizados para a sua construção e desenvolvimento.

Os biossensores podem ser vantajosos para a análise de alergénios em amostras alimentares comparativamente a outros métodos devido à sua elevada simplicidade instrumental, resposta mais rápida, custo reduzido, portabilidade e elevada sensibilidade [16]. Por sua vez, tal como todos os métodos de deteção, os biossensores apresentam certas desvantagens, sendo estas um tempo de vida útil reduzido e apresentarem menor sensibilidade comparativamente a certos métodos tradicionais [49].

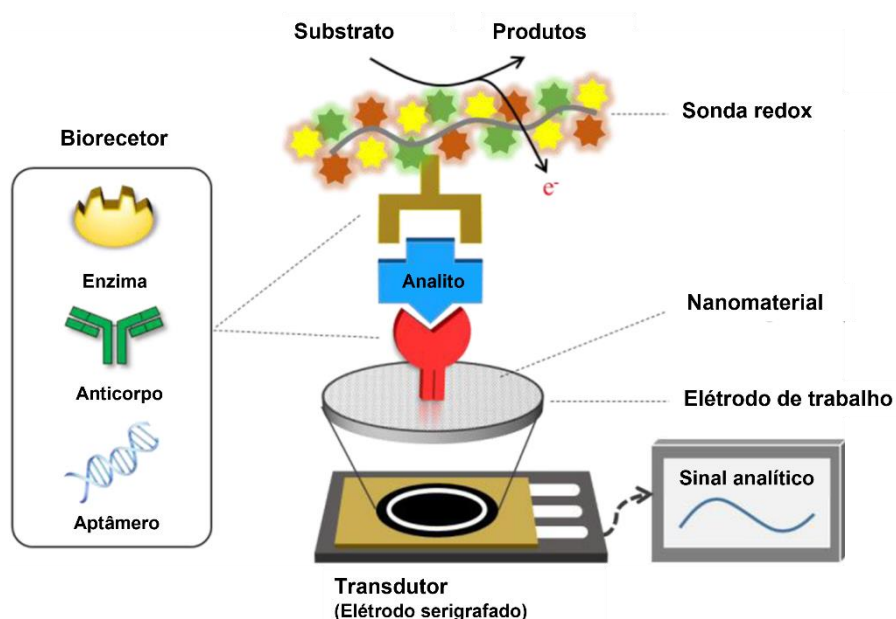


Figura 6 – Configuração de um biossensor eletroquímico. Neste exemplo a deteção do analito é efetuada utilizando um anticorpo como elemento bioreceptor, imobilizado num elétrodo serigrafado utilizado como elemento transdutor sendo gerado um sinal analítico após reconhecimento do analito-alvo. Figura adaptada de [50], com permissão.

2.6.2. Imunossensores eletroquímicos

Atualmente, os biossensores mais utilizados e descritos na literatura para a análise de alergénios alimentares são os imunossensores [51]. Estes biossensores contemplam a imobilização de anticorpos na superfície de um transdutor eletroquímico. Após decorrerem as interações entre o anticorpo e um antígeno a reação bioquímica pode ser mensurável utilizando um equipamento/sistema sendo obtido um sinal físico analítico diretamente proporcional à quantidade de analito-alvo/antígeno capturado [52]. Tendo por base a transdução eletroquímica, o sinal obtido pode ser proveniente de diversas técnicas como amperometria, voltametria, potenciometria, espectroscopia de impedância eletroquímica e condutimetria. A transdução amperométrica/voltamétrica (medição da corrente elétrica) é vastamente utilizada no desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos [53].

Os imunossensores eletroquímicos caracterizam-se pela elevada seletividade e sensibilidade devido à ligação específica entre anticorpo e antígeno a partir da qual se forma o complexo antígeno - anticorpo. Para além das particularidades referidas anteriormente, apresentam como principais características a simplicidade no desenvolvimento, a elevada durabilidade (estabilidade de longa duração), possibilidade de miniaturização, alta reprodutibilidade e utilização de pequenos volumes de amostra (na gama de microlitros (μL)). Para além disso, apresentam uma ampla gama de trabalho e excelentes limites de deteção [54].

2.6.3. Eléttodos e célula eletroquímica

A transdução eletroquímica efetua-se através da interconexão entre três eléctrodos: eléctrodo de trabalho (WE, do inglês *working electrode*), eléctrodo de referência (RE, do inglês *reference electrode*) e eléctrodo auxiliar (AE, do inglês *auxiliary electrode*). A reação de oxidação/redução decorre numa célula eletroquímica onde é adicionado um eletrólito (tipicamente tampão), para que a reação bioquímica decorra e assim se obtenha o sinal físico mensurável. Os eléctrodos convencionais que são tipicamente utilizados (eléttrodo de carbono vítreo, eléctrodo de pasta de carbono, eléctrodo de ouro, etc.) tem vindo a ser substituídos por eléctrodos mais pequenos, portáteis e de fácil manuseio [55].

Recentemente, os eléctrodos serigrafados (SPE, do inglês *screen-printed electrodes*), têm sido amplamente empregues no desenvolvimento de imunossensores. O custo reduzido, facilidade de produção em massa, possibilidade de miniaturização, redução do volume de reagentes necessário (devido ao reduzido tamanho da célula eletroquímica) e rápida aquisição de sinal, são algumas das características mais vantajosas que levam à escolha dos mesmos em relação a

elétrodos convencionais, que apresentam processos de limpeza tediosos e necessitam de volumes elevados (na gama dos mililitros (mL)) de soluções e amostra [53][56].

O SPE consiste tipicamente num substrato quimicamente inerte (tipicamente de cerâmica, quartzo, plástico ou papel) sobre o qual se encontram destacados três elétrodos serigrafados: WE, RE e AE. A representação esquemática de um SPE comercial encontra-se na **Figura 7**. O WE é o elétrodo principal (constituído tipicamente de carbono ou ouro) e representa a plataforma na qual o analito reage. A sensibilidade da análise pode ser melhorada pela eficiente nanoestruturação deste elétrodo com os mais variados nanomateriais (por exemplo nanopartículas, nanotubos) ou modificação com materiais como líquidos iónicos ou reagentes químicos que permitem a formação de monocamadas auto-organizadas [57].

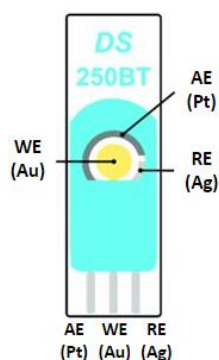


Figura 7 – Representação de um SPE. Figura adaptada de [57], com permissão.

2.6.4. Amperometria/Voltametria

Após a montagem do sistema, no caso convencional utilizando uma célula eletroquímica que contém os 3 elétrodos, ou no caso de elétrodos serigrafados que integra os 3 elétrodos e respetivas conexões no substrato inerte, e uma solução. Para a obtenção do sinal analítico mensurável, é aplicada uma diferença de potencial (E) constante (no caso da amperometria) ou variável (no caso da voltametria), sendo efetuada posteriormente a medição de corrente (i) resultante de processos de oxidação e/ou redução de uma espécie eletroativa em solução na superfície do elétrodo de trabalho [58]. Estas duas técnicas eletroanalíticas são as mais vastamente utilizadas [59]. Por fim, os resultados são obtidos no formato de voltamograma quando é aplicada a voltametria, sendo este uma representação gráfica da corrente em função da diferença de potencial do elétrodo de trabalho. Quando é utilizada a amperometria, obtém-se amperogramas, ou seja, é obtido o sinal da corrente em função da variação do tempo [60].

Dependendo da forma de onda da diferença de potencial aplicada, as técnicas voltamétricas podem ser classificadas como voltametria cíclica (CV, do *inglês Cyclic Voltammetry*), voltametria

de varrimento linear (LSV, do inglês *Linear Sweep Voltammetry*), voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês *Square Wave Voltammetry*) e voltametria de impulso diferencial (DPV, do inglês *Differential Pulse Voltammetry*) [61].

Por sua vez, existem diversas técnicas amperométricas, sendo a mais utilizada a cronoamperometria por ser a mais simples, tornando esta técnica ideal para a análise eletroquímica [62]

Na cronoamperometria, é aplicada uma diferença de potencial ao eletrodo de trabalho, sendo medida a intensidade de corrente em função do tempo. Assim, a corrente medida flutua de acordo com a difusão do analito-alvo presente na solução em direção à superfície do sensor. Ou seja, esta técnica pode ser utilizada para medir a dependência corrente-tempo de um processo controlado por difusão que ocorre no WE [63]. Após selecionar a diferença de potencial apropriada para registrar os cronoamperogramas (curvas *i-t*), é medida a oxidação ou redução da espécie eletroanalítica. A cronoamperometria é considerada uma técnica sensível, sendo a corrente medida proporcional à concentração do analito, podendo ser utilizada em diversos estudos de forma independente ou em conjunto com outras técnicas eletroquímicas, como por exemplo, a CV. Embora considerada como uma técnica muito útil, a cronoamperometria é relativamente lenta comparando com as técnicas voltamétricas (a maioria das medições demora tipicamente mais de 10s) [64].

2.6.5. Nanomateriais para a modificação do transdutor

A inclusão de materiais no processo de construção/desenvolvimento de biossensores permite reduzir determinadas limitações sobretudo na estruturação dos eletrodos, nomeadamente o de trabalho, permitindo o desenvolvimento de camadas modificadas ou nanoestruturadas, facilitando a imobilização do bioreceptor ou molécula de interesse na superfície da plataforma transdutora. Essas modificações incluem geralmente uma classe de materiais denominados como nanomateriais, e tais transdutores são geralmente denominados como eletrodos quimicamente modificados. Entre os materiais mais clássicos, o ouro e o carbono são os mais vastamente utilizados, em variados formatos e/ou dimensões tais como nanopartículas de ouro (AuNP), óxido de grafeno reduzido (rGO), nanotubos de carbono (CNT), nanodiamantes (ND) [65][66]. Entre as vantagens do uso de nanomateriais, a elevada sensibilidade, estabilidade e melhor repetibilidade dos resultados permitem a construção de biossensores mais atrativos e competitivos.

2.7. Imunossensores eletroquímicos para a análise de alergénios do ovo: Estado de arte

O desenvolvimento de biossensores para a análise de alergénios do ovo em produtos alimentares tem sido efetuado e descrito na última década. Deste modo, foi realizada uma pesquisa bibliográfica na base de dados da *Clarivate Web of Science* utilizando as palavras-chave *allergy, food, egg, immunosensor, electrochem**. Os trabalhos publicados e indexados até à data da realização da presente dissertação encontram-se sucintamente descritos a seguir, sendo abordados os métodos desenvolvidos e discutidos alguns dos parâmetros reportados pelos autores.

Eissa et al. [67], desenvolveram um imunossensor voltamétrico em formato *label-free* para a deteção do alergénio ovalbumina da clara de ovo (Gal d 2). Na construção do sensor utilizaram elétrodos serigrafados de carbono nanoestruturado com grafeno como plataforma transdutora. Os grupos carboxílicos terminais presentes na superfície do grafeno foram ativados com EDC/NHS e utilizados para imobilizar o anticorpo de ovalbumina, por ligação covalente, efetuando deste modo o reconhecimento do alergénio. As diferentes etapas de construção do biossensor foram caracterizadas por voltametria de impulso diferencial (DPV), utilizando o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. A corrente de pico de redução obtido após a reação bioquímica é inversamente proporcional à concentração de Gal d 2, permitindo obter um LOD de 0,83 pg/mL. Foi efetuada uma aplicação preliminar para estudar o efeito matriz de amostras alimentares na deteção de ovalbumina, utilizando extrato de bolo sem ovo, tendo obtidas percentagens de recuperação entre 104 e 110 % (RSD (do inglês Relative Standard Deviation) ≤ 6.5 %) indicando excelente exatidão e precisão e a possível aplicabilidade em amostras alimentares que possam conter ovo.

Numa abordagem distinta, Čadková et al. [68] construíram um imunossensor eletroquímico utilizando elétrodos de platina serigrafados como transdutor e esferas magnéticas Sera-Mag™ carboxílicas como plataformas sólidas para o desenvolvimento do imunoensaio do tipo não competitivo para a análise do alergénio ovalbumina (Gal d 2). Um imunocomplexo (*sandwich*) foi formado nas partículas magnéticas funcionalizadas com imunoglobulina G. Utilizaram-se anticorpos de deteção conjugados com a enzima peroxidase e o sinal eletroquímico (diretamente proporcional à concentração do alergénio) resultou da redução do peróxido de hidrogénio (H_2O_2) com tionina como mediador de eletrões e foi medido por voltametria de varrimento linear (LSV). O biossensor desenvolvido pode ser reutilizado após simples regeneração por realização de etapas de lavagem podendo os custos globais da análise serem reduzidos substancialmente. Apesar de o método reportado demonstrar sensibilidade adequada para análise de Gal d 2 (LOD = 5,0 nM), não foram efetuados ensaios de recuperação

nem a avaliação dos efeitos de matriz. A aplicabilidade do sensor em amostras alimentares não foi efetuada.

O foco do estudo desenvolvido por Sugawara et al. [69] consistiu na detecção eletroquímica de ovalbumina (Gal d 2) utilizando partículas magnéticas de diferentes diâmetros. A detecção do alergénio foi efetuada num formato *label-free*, com base na interação entre a proteína e um péptido específico (peptido-1), o qual é imobilizado nas partículas magnéticas por ligação covalente através de diferentes reagentes de ligação. A análise eletroquímica (voltametria cíclica, diferença de potencial varia entre +0,3V e +0,8V, velocidade de varrimento 50 mV/s) efetuou-se num sistema convencional utilizando uma placa de carbono vítreo como elétrodo de trabalho, um elétrodo de referência Ag|AgCl e elétrodo auxiliar de platina. O pico de oxidação obtido a 0,65 V diminui com o aumento da quantidade de alergénio porque a proteína fica acumulada nas partículas magnéticas através do peptídeo de reconhecimento. Foi obtido um LOD de 0.50 pM e foram efetuados estudos de recuperação, obtendo-se percentagens entre 98 e 100 %; contudo, não foram analisadas amostras alimentares.

Utilizando partículas magnéticas funcionalizadas com ácido carboxílico (MBs-COOH), foi desenvolvido um imunossensor amperométrico descartável por Benedé et al. [70], para efetuar a análise sensível e seletiva de ovomucóide (Gal d 1) presente na clara do ovo de galinha. A abordagem envolve a imobilização covalente (EDC/NHS) entre MBs-COOH e anticorpos que reconhecem o alergénio alvo e a detecção seletiva efetuada por anticorpos marcados com HRP formando assim um imunocomplexo tipo *sandwich*. O bioconjugado magnético resultante foi capturado na superfície de SPCEs para realizar a detecção amperométrica na presença de hidroquinona (HQ) e H₂O₂, aplicando uma diferença de potencial fixa de -0,20 V. O sensor demonstrou bom desempenho analítico, sendo o LOD obtido (0,1 ng/mL) significativamente menor do que os reivindicados para kits ELISA comerciais, apresentando igualmente uma elevada precisão (RSD = 6.0 %), aplicabilidade bem-sucedida e determinação precisa e sensível na detecção do alergénio em alimentos crus (ovos de galinha) e em alimentos não processados e/ou cozinhados, nomeadamente pão.

Num formato *label-free*, Mohamad et al. [71] desenvolveram um imunossensor eletroquímico para a análise de ovalbumina (Gal d 2), utilizando como transdutor elétrodos de grafeno serigrafados modificados com um nanocompósito constituído por nanopartículas de óxido de ferro (Fe₃O₄) e paládio (Pd) dispersas num polímero condutor de quitosano (CS). Os anticorpos anti-ovalbumina foram ligados covalentemente (EDC/NHS) à plataforma transdutora, permitindo efetuar a detecção eficiente do alergénio. O sinal analítico (voltametria cíclica), obtido utilizando o par redox [Fe(CN)₆]^{3-/4-} é inversamente proporcional à concentração no analito, sendo obtido LOD = 0,01 pg/mL. A aplicação do biossensor foi efetuada com biscoito

sem ovo obtido comercialmente sendo testado o efeito matriz da amostra alimentar e efetuados testes de recuperação de três diferentes concentrações de ovalbumina na amostra de alimentos. A percentagem de recuperação das amostras analisadas variou entre 102–107 %, com RSD inferior a 6,2 %.

A abordagem mais recente relacionada com o desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos para análise de alergénios do ovo foi efetuada por Baldo et al. [72] e consiste no desenvolvimento de um dispositivo microfluídico eletroquímico descartável (DE μ D) para deteção ultrasensível do alérgeno ovalbumina (Gal d 2) em amostras de vinho. O ensaio, efetuado em formato sandwich, envolve a preparação prévia de duas etapas: (1) imobilização de anticorpo policlonal nas partículas magnéticas (ligação covalente, utilizando EDC/NHS), seguida da adição da enzima Peroxidase (HRP). Este conjugado é adicionado à etapa (2) que consiste na montagem de DE μ D no qual 8-WEs são modificados com solução de poli (cloreto de dialildimetilamónio) (PDDA), óxido de grafeno (GO), seguindo-se a imobilização covalente (EDC/NHS) do anticorpo monoclonal. Após a captura imunomagnética do alergénio alimentar em estudo, a deteção eletroquímica foi realizada por amperometria, aplicando uma diferença de potencial fixa de -0,2 V. A corrente é registada após injeção no DE μ D de uma mistura de peróxido de hidrogénio (H₂O₂) e hidroquinona (HQ) em tampão PBS (pH 7,0). Foi alcançado um limite de deteção de 0,2 fg/mL Gal d 2 (ovalbumina) e analisaram-se cinco amostras de vinhos usando o ensaio imunomagnético desenvolvido, verificando-se que apresenta excelente precisão em comparação com o método tradicional ELISA.

2.8. Parâmetros de otimização na construção e desenvolvimento do imunossensor amperométrico, validação do método e análise de Gal d 3 em produtos alimentares

Na presente dissertação, desenvolveu-se um imunossensor em formato sandwich (não competitivo), com deteção eletroquímica, mais concretamente utilizando a amperometria. Para tal, como transdutor utilizou-se um SPCE e como bioreceptor um anticorpo, de modo a efetuar a deteção do analito-alvo. A técnica selecionada foi a cronoamperometria que permite obter o sinal analítico.

A otimização do biossensor inclui o estudo das concentrações e/ou diluições do anticorpo de captura (CAb), anticorpo de deteção conjugado com a enzima HRP (DAb-HRP), a quantidade de BSA nas soluções de trabalho como agente bloqueador, os tempos de incubação de cada biomolécula e os formatos em que pode ser efetuado o ensaio. Para além destes parâmetros, a nanoestruturação do WE do SPCE com nanomateriais de ouro (nanopartículas de ouro, AuNP)

ou carbono (óxido de grafeno reduzido, rGO (1D); nanotubos de carbono, CNT (2D); nanodiamantes, ND (3D)) também foi estudada na tentativa de melhorar o sinal analítico.

Utilizando os parâmetros otimizados é efetuada a validação do método que envolve a avaliação que estima a eficiência do sensor desenvolvido. A validação é fundamental para demonstrar que o método analítico é adequado ao propósito de desenvolvimento, no caso, um imunossensor eletroquímico para análise de Gal d 3 (ovotransferrina). Assim, os parâmetros de validação a ter em consideração neste estudo são: gama de trabalho e linearidade da curva analítica, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), precisão do método, seletividade, estudo de recuperação, efeito matriz (tampão vs. matriz de amostra).

Por fim, efetuou-se a análise do alergénio (Gal d 3) em diferentes amostras/produtos alimentares comerciais. A validação dos resultados obtidos com o método desenvolvido foi efetuada através de um método convencional, nomeadamente o ELISA.

3. Parte experimental

3.1. Material e Equipamentos

Utilizaram-se, como transdutores, elétrodos serigrafados de carbono (SPCE, DRP-110, constituídos por um WE de carbono ($d = 4 \text{ mm}$), um AE de carbono, e um elétrodo de pseudo-referência $\text{Ag}|\text{AgCl}$, e as respectivas conexões elétricas de prata, serigrafados num substrato de cerâmica) e um conector específico para conectar os SPCEs (DRP-CAC), ambos comprados à Metrohm DropSens. Para as medições eletroquímicas foi utilizado um potencióstato/galvanostato (PGSTAT 101) e software NOVA versão 1.10 da Metrohm Autolab.

Outros materiais relevantes utilizados: microtubos de variados volumes: 0,5; 1,5 e 5,0 mL (Eppendorf); micropipetas: 10, 100, 200, 1000 μL (Labnet) e multicanal 200 μL (VWR); vórtex de bancada, Lab Dancer S000 (IKA); agitador basculante, MOVIL-TUB (P-SELECTA); agitador orbital shaker, AO-400 (Bunsen); placa agitadora, VMS-C7 (VWR); pH-metro, micropH 2002 (CRISON); sistema de ultra purificação de água, Synergy UV (Merck); centrífugas refrigeradas: Heraeus Megafuge 16R e Heraeus-Fresco 21 (Thermo Fisher Scientific); balança analítica com precisão 0,00001 g, NewClassic MS (Mettler Toledo); trituradora (Moulinex); leitor de placas multi-modo, Synergy HT (Biotek); microplaca 96 poços, Nunc F (Thermo Fisher Scientific). Ultrasons, H-D (P-Selecta), termostato de bloco, Tembloc (P-Selecta).

3.2. Reagentes e Soluções

Cloreto de sódio foi adquirido à VWR Chemicals. 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), albumina do soro bovino (BSA), dihidrogenofosfato de potássio e o hidrogenofosfato de potássio trihidratado foram comprados à Sigma-Aldrich. O ácido nítrico (65 %) foi obtido pela Panreac.

As seguintes biomoléculas foram adquiridas à MyBioSource: anticorpo policlonal anti-ovotransferrina (CAb), anticorpo policlonal anti-ovotransferrina modificado com a enzima peroxidase (DAb-HRP) e o antigénio ovotransferrina de galinha (Gal d 3, MBS717921). Para a realização do trabalho experimental foram preparadas semanalmente as seguintes soluções tampão, utilizando água ultrapura (resistividade 18,2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$):

B1 – tampão fosfato-salino (PBS) [0.1 M], pH 7,4

B1-BSA – PBS [0.1 M], pH 7,4 + BSA 0.5 % (m/v)

Tampão de extração – tampão fosfato-salino (PBS) [0.1 M], pH 7,4

A soluções das biomoléculas BSA e CAb foram preparadas utilizando B1. Para as biomoléculas Gal d 3 (antigénio) e DAb-HRP utilizou-se o tampão B1-BSA. Todas as soluções foram preparadas diariamente, armazenadas em microtubos em ambiente refrigerado (4–8 °C).

3.3. Procedimento experimental

3.3.1. Imobilização do anticorpo de captura

Ao WE dos SPCEs (não modificado) adicionou-se 10 μL da solução de CAb (concentração otimizada: 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Os elétrodos permanecem durante a noite em ambiente refrigerado (4-8 $^{\circ}\text{C}$), num recipiente humidificado, para que decorra a ligação efetiva do CAb à superfície do transdutor, por adsorção física.

3.3.2. Construção do imunossensor e detecção eletroquímica

A construção do imunossensor foi efetuada de acordo com as seguintes etapas:

Após a imobilização do CAb lavou-se o SPCE com B1, adicionou-se Gal d 3 (antigénio) ou amostra alimentar (40 μL , em B1-BSA) e deixou-se incubar durante 15 min. O elétrodo foi novamente lavado com B1 de modo a remover biomoléculas (antigénio/alergénio) que não tenham efetuado ligação e/ou tenham sido reconhecidos pelos anticorpos. Seguiu-se a adição de DAb (40 μL , 200 \times em B1-BSA), incubado durante 15 min. Efetuou-se uma última lavagem com tampão B1 seguindo-se a adição do substrato enzimático TMB (40 μL , sem diluição).

O sinal analítico foi obtido por amperometria (concretamente, a cronoamperometria), aplicando uma diferença de potencial fixa de 0 V durante 60 s. Este sinal deve-se à redução, no elétrodo de trabalho, do substrato enzimático (*TMB*), previamente oxidado pela enzima (HRP).

Numa descrição sucinta, a enzima *HRP* catalisa a oxidação de diferentes substratos redutores, na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este último é utilizado para a oxidação do substrato enzimático *TMB* catalisado pela *HRP*. Por sua vez, o *TMB* oxidado é posteriormente reduzido no elétrodo de trabalho, sendo que este fenómeno permite a obtenção de um sinal analítico. A intensidade de corrente obtida (*I*) é diretamente proporcional à quantidade (ou concentração) de alergénio presente na amostra [73].

As etapas descritas para a construção do imunossensor, bem como a respetiva detecção eletroquímica encontram-se esquematicamente ilustradas na **Figura 8**.

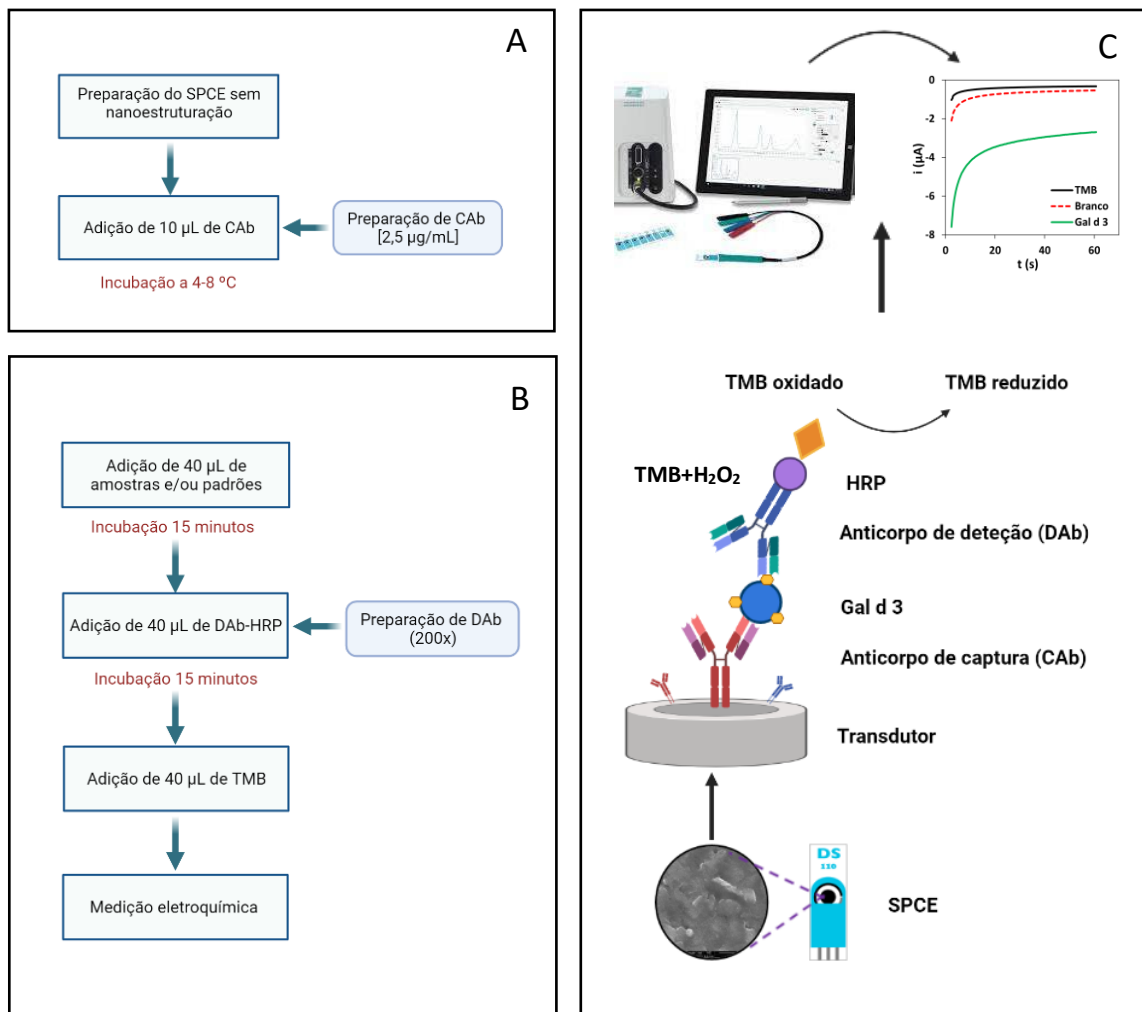


Figura 8 – Fluxograma referente (A) à biofuncionalização do imunossensor e (B) construção do imunoensaio e detecção eletroquímica. (C) Ilustração esquemática do funcionamento do imunossensor eletroquímico.

3.4. Preparação das amostras alimentares obtidas comercialmente

A preparação das amostras alimentares para a análise do alergénio Gal d 3 consistiu na trituração e homogeneização do produto alimentar durante 10 s (3 vezes), a 10.000 rpm, utilizando uma trituradora. O produto final obtido foi armazenado para posterior análise.

O procedimento de extração do alergénio das diversas amostras (25 produtos alimentares + 7 amostras de ovo e/ou clara de ovo cru(a) e/ou cozinhado(a)), foi realizado utilizando um procedimento previamente descrito [74], com ligeiras alterações.

O protocolo experimental consistiu nas seguintes etapas: (1) pesagem de 1 g de amostra triturada para um tubo falcon de 15 mL e adição de 10 mL de tampão de extração; (2) agitação da suspensão no vórtex durante 10 s; (3) incubação durante 30 min, a 60 °C (utilizando um termostato de bloco); (4) centrifugação das amostras utilizando a centrífuga refrigerada de

bancada durante 5 min a 5000 rpm; (5) transferência do sobrenadante para microtubos e realização de nova centrifugação durante 5 min a 10.000 rpm utilizando a microcentrífuga de bancada. (6) O sobrenadante obtido foi armazenado a 4-8 °C para utilização decorrente de 1 semana. Após esse período, efetuou-se o armazenamento a -20 °C para posterior utilização, caso seja necessário efetuar análises posteriores. Para a análise eletroquímica efetuaram-se diluições apropriadas de cada amostra alimentar utilizando B1-BSA (diluições otimizadas: 10.000x para ovo e clara de ovo; 250x para produtos e/ou ingredientes sem ovo e/ou cujo rótulo indicava “pode conter vestígios de ovo”, e produtos com percentagens referidas no rótulo do produto).

3.5. Validação do imunossensor utilizando um método convencional

Para efetuar a validação do método procedeu-se à análise dos ingredientes/produtos alimentares através do método tradicionalmente utilizado designado ELISA. O protocolo experimental realizado tem uma duração aproximadamente de 2h 10min e consistiu nas seguintes etapas*:

(1) Imobilização do CAb (100 µL; 2,5 µg/mL; tampão carbonato/hidrogenocarbonato; pH 9,6) numa microplaca de 96 poços, permanecendo durante a noite em ambiente refrigerado (4-8 °C); (2) etapa de lavagem (2x)** dos poços da microplaca; (3) adição das diversas amostras alimentares em estudo (100 µL) e incubação das mesmas durante 60 min; (4) etapa de lavagem (2x)**; (5) adição de DAb (100 µL, 200x em B1-BSA), durante 60 min; (6) etapa de lavagem (2x)**; (7) adição do substrato enzimático TMB (100 µL; sem diluição); (8) adição da solução *stop* (50 µL de ácido nítrico) (9) medição das absorbâncias ($\lambda = 450 \text{ nm}$) utilizando o leitor de placas multimodo.

* Utilizou-se uma pipeta multicanal para a realização deste método;

**Utilizou-se tampão B1 para efetuar as lavagens ao longo de todo o processo.

4. Resultados e Discussão

4.1. Técnicas eletroquímicas: voltametria cíclica e cronoamperometria

Para o imunensaio eletroquímico foram utilizados SPCEs (sem modificação e/ou nanoestruturação), sendo que a respetiva deteção do analito (alergénio da clara do ovo – Gal d 3) foi efetuada utilizando a técnica amperométrica, cronoamperometria. A análise do Gal d 3 foi realizada recorrendo a um ensaio em formato *sandwich*, sendo que este consiste na imobilização prévia de anticorpos de captura (CAb) na superfície do WE do SPCE e reconhecimento do respetivo analito pelo anticorpo de deteção marcado com HRP (DAb-HRP).

A enzima HRP é vastamente utilizada para o desenvolvimento de biossensores, sendo que o *TMB* é um dos substratos cromogénicos mais comumente utilizados para sistemas de deteção baseados em *HRP*. Este método fornece uma elevada sensibilidade, sendo que o substrato mencionado é considerado menos tóxico comparativamente à utilização de metais como a prata e/ou cádmio.

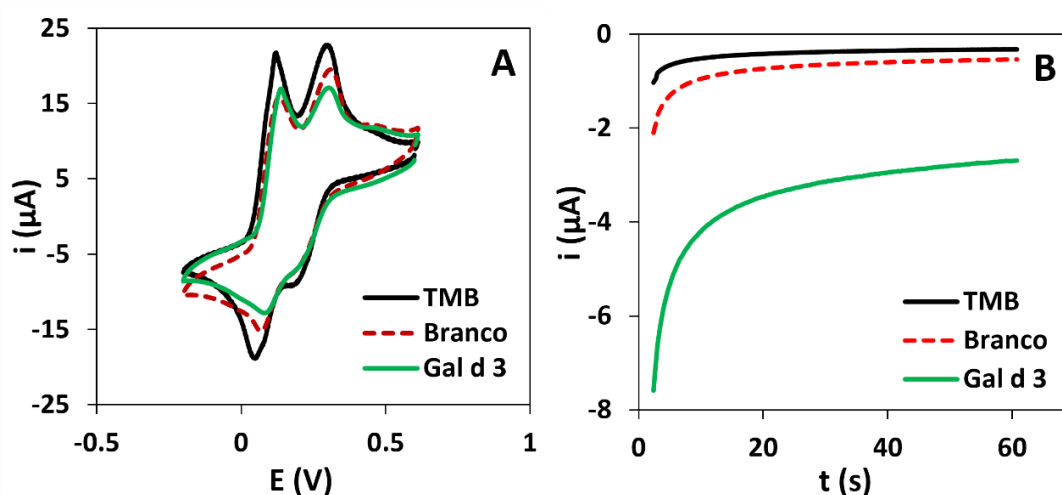


Figura 9 – Representação gráfica do estudo eletroquímico de TMB e do imunossensor na ausência (0 ng/mL) e presença (500 ng/mL) do Gal d 3. **(A)** Voltamogramas (CV, de -0,2 a +0,6 V, velocidade de varrimento: 0,05 V/s), **(B)** Amperogramas (cronoamperometria, diferença de potencial fixa de 0 V aplicado durante 60 s).

Na **Figura 9A** encontram-se representados os voltamogramas (CV) e na **Figura 9B** os amperogramas (cronoamperometria) na presença e ausência do alergénio em estudo utilizando o imunossensor proposto. O voltamograma (Figura 9A) foi obtido com o propósito de analisar as biomoléculas em estudo, tais como o TMB. Posto isto, observou-se que este apresenta picos de oxidação e redução, sendo um processo reversível. Devido à possibilidade de interferência entre biomoléculas no pico de oxidação, apenas foi analisado o pico de redução. Assim sendo, após verificar que a diferença de potencial de redução para a biomolécula, TMB, correspondia

a 0V, elegeu-se este valor como diferença de potencial fixa para a obtenção do amperograma (Figura 9B).

4.2. Efeito da adição de agentes bloqueadores

Na fase inicial da construção do imunossensor foi efetuado um teste em que as biomoléculas (Gal d 3, DAb-HRP) foram diluídas em (i) tampão B1 (sem adição de agentes bloqueadores), e com a adição de agentes bloqueadores: (ii) BSA 1 %, (iii) Caseína 1 % (diluídos em tampão B1), sendo estes tipicamente utilizados no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos [75,76]. Os resultados encontram-se representados na **Figura 10**.

A presença de Gal d 3 (100 ng/mL) é indicada pela barra com preenchimento cinza-claro (legendado como "Gal d 3") e a ausência de Gal d 3 (0 ng/mL) é indicada pela barra com preenchimento cinza-escuro (legendado como "Branco"). A razão sinal-branco (S/B), na presença (S) e ausência (B) do analito, é utilizada para selecionar os valores ótimos.

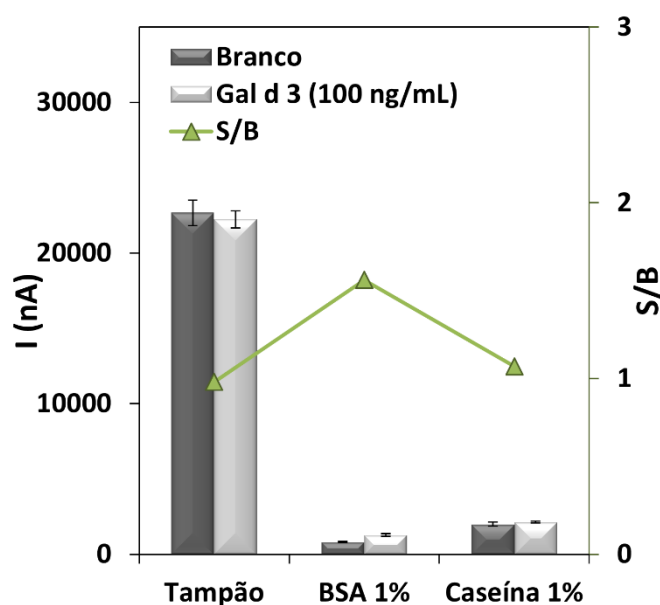


Figura 10 – Diferentes agentes bloqueadores utilizados para a otimização do imunossensor (BSA 1%; Caseína 1%) e comparação com Tampão B1 (PBS, 0.1 M, pH 7,4). Parâmetros Experimentais: Gal d 3 (0 e 100 ng/mL), CAb (1 µg/mL), DAb-HRP (400×). Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).

De acordo com os resultados obtidos, a adição de BSA ao tampão (B1) utilizado na preparação da solução de trabalho para a preparação das biomoléculas (B1-BSA) auxilia no bloqueio de locais não específicos das mesmas. Ou seja, analisando os resultados obtidos, apenas com a adição de BSA se verifica que o sinal analítico obtido na presença de Gal d 3 é superior ao sinal do branco (ausência de alérgeno). Não se observa o mesmo perfil de resultados

nos ensaios em que se utiliza tampão sem agente bloqueador (B1), ou utilizando B1-caseína. A razão S/B demonstra que com a utilização de B1-BSA se obtém o melhor resultado, indicando deste modo que a adição de BSA permite a análise eficiente do analito-alvo.

4.3. Efeito da adição de BSA

De acordo com os resultados anteriormente obtidos, foi efetuado o estudo da adição de BSA nas soluções de Gal d 3 e DAb-HRP em diferentes quantidades e avaliado o desempenho do biossensor. Assim, testou-se a adição de BSA em quantidades crescentes: 0,0; 0,10; 0,50; 1,0 e 2,0 % (m/V). Os resultados obtidos encontram-se representados na **Figura 11**, sendo que através da observação da razão S/B é possível verificar que a concentração mais eficaz do agente bloqueador BSA corresponde a 0.5 % (m/V).

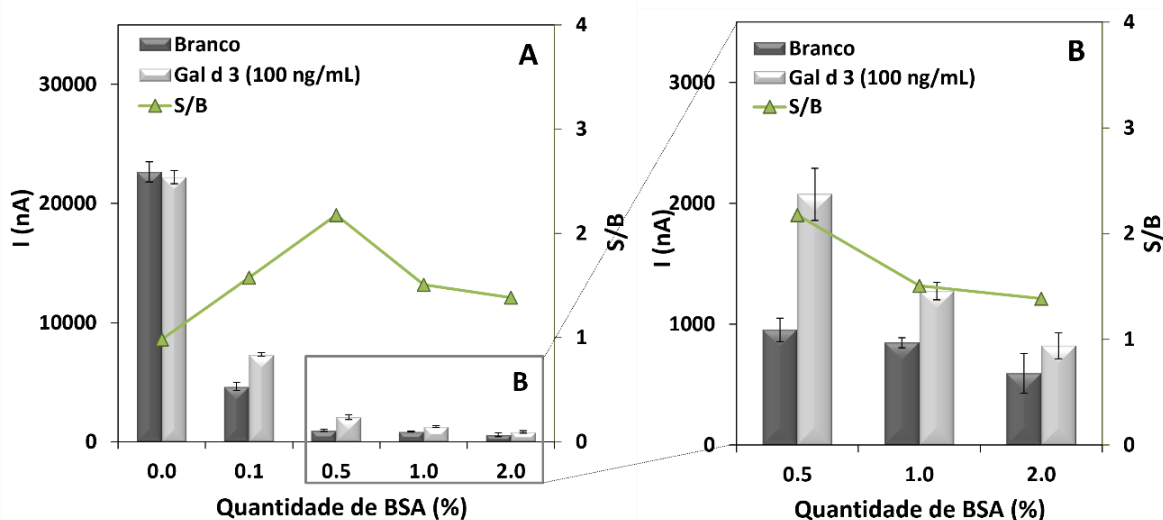


Figura 11 – Otimização da quantidade de BSA (%) utilizada para a preparação da solução das biomoléculas (Gal d 3 e DAb-HRP). Parâmetros Experimentais: BSA (0,0; 0,10; 0,50; 1,0 e 2,0 % (m/v)), Gal d 3 (0 e 100 ng/mL), CAb (1 µg/mL), DAb-HRP (400x). Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).

Para além da BSA, o outro agente bloqueador vastamente utilizado no desenvolvimento de imunoenaios – caseína, foi igualmente testado, contudo os dados obtidos para as quantidades crescentes (tal como os ensaios efetuados com BSA) revelaram que este agente bloqueava excessivamente a superfície transdutora, resultando em amperogramas não diferenciáveis entre branco e Gal d 3. Ou seja, o sinal eletroquímico na ausência e na presença de Gal d 3 não apresenta diferenças significativas para o trabalho em desenvolvimento.

4.4. Otimização das concentrações do Anticorpo de Captura (CAb) e do anticorpo de detecção conjugado com enzima Peroxidase (DAb-HRP)

Uma das etapas cruciais na otimização da construção do imunossensor consiste na seleção das concentrações e/ou diluições adequadas dos anticorpos de captura e detecção.

Deste modo, procedeu-se inicialmente à otimização da concentração do CAb, testando-se 1,0; 2,5; 5,0 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, com uma diluição fixa do DAb-HRP de 400 \times . Por sua vez, no estudo de otimização do anticorpo de detecção foram testadas as seguintes diluições: 800 \times ; 400 \times ; 200 \times e 100 \times . Para isto, foi utilizada uma concentração fixa (previamente otimizada) de CAb de 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Os resultados obtidos para as respectivas otimizações estão representados na **Figura 12A** e **Figura 12B**.

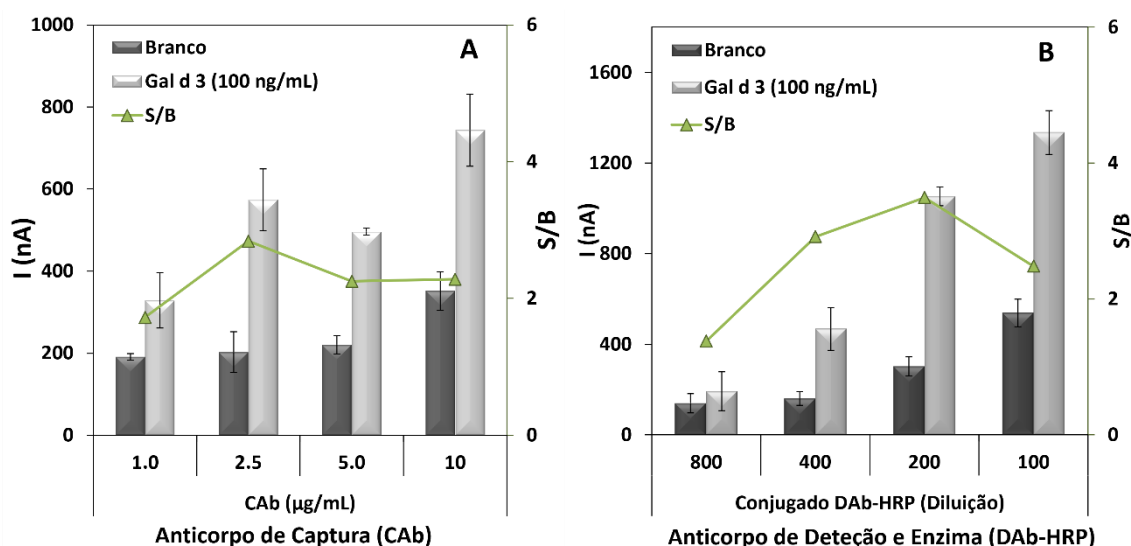


Figura 12 – (A) Otimização da concentração do CAb (1,0; 2,5; 5,0; 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), com diluição DAb-HRP 400 \times ; (B) Otimização da diluição do DAb-HRP (800 \times ; 400 \times ; 200 \times ; 100 \times ; em B1-BSA 0,5 %) com concentração fixa de CAb 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Parâmetros experimentais: Gal d 3 (0 e 100 ng/mL, em B1-BSA 0,5 %). Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=3).

Após a análise da **Figura 12A**, verifica-se que apesar da intensidade de corrente (I) ser mais elevada para a concentração do CAb de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, tanto para a análise de Gal d 3 como para o branco, a concentração que apresenta melhor razão S/B corresponde a 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CAb. Posto isto, esta última concentração foi utilizada para os estudos consecutivos.

Por sua vez, através da observação da **Figura 12B**, verifica-se que o melhor resultado é obtido quando o DAb-HRP é diluído 200 \times ; a razão S/B é mais elevado comparativamente às restantes diluições realizadas. Assim, após otimização das concentrações/diluições dos anticorpos, verifica-se que as concentrações de CAb 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e diluição do conjugado DAb-HRP 200 \times são necessárias para uma elevada performance do imunossensor.

4.5. Otimização do tempo de incubação do antígeno e de DAb-HRP e do formato de ensaio

O tempo necessário para efetuar o ensaio e obter a resposta analítica é de extrema importância, uma vez que quanto mais rápida for a resposta, menos moroso for o ensaio e menor a interferência/reatividade e conseqüente razão S/B favorável, maior será a probabilidade de obter um imunossensor com utilidade prática de auxílio aos principais interessados, nomeadamente indústrias alimentares e indivíduos com elevada sensibilidade ao alérgico em estudo.

O estudo foi efetuado em dois formatos (sumariamente apresentados na **Tabela 2**):

Formato I – adição passo a passo do antígeno (Gal d 3) e do conjugado DAb-HRP em tempos distintos: Formato I A (Gal d 3, 15 minutos; DAb-HRP, 15 min), Formato I B (Gal d 3, 30 min; DAb-HRP, 30 min), Formato I C (Gal d 3, 60 min; DAb-HRP, 60 min).

Formato II – pré-incubação de Gal d 3 e DAb-HRP (15 minutos antes de adicionar ao WE), incubados no WE em tempos diferentes: Formato II D (Gal d 3 + DAb-HRP, 15 min), Formato II E (Gal d 3 + DAb-HRP, 30 min), Formato II F (Gal d 3 + DAb-HRP, 60 min).

Os resultados obtidos para cada parâmetro analisado encontram-se representados na **Figura 13**.

Tabela 2 – Formatos I e II, dos tempos de incubação e do tempo de ensaio total.

Formato	t _{incubação} (min)		t _{ensaio} (min)	
	Alérgico	DAb-HRP		
I	A	15	15	30
	B	30	30	60
	C	60	60	120
II	D	15	15	15
	E	30	30	30
	F	60	60	60

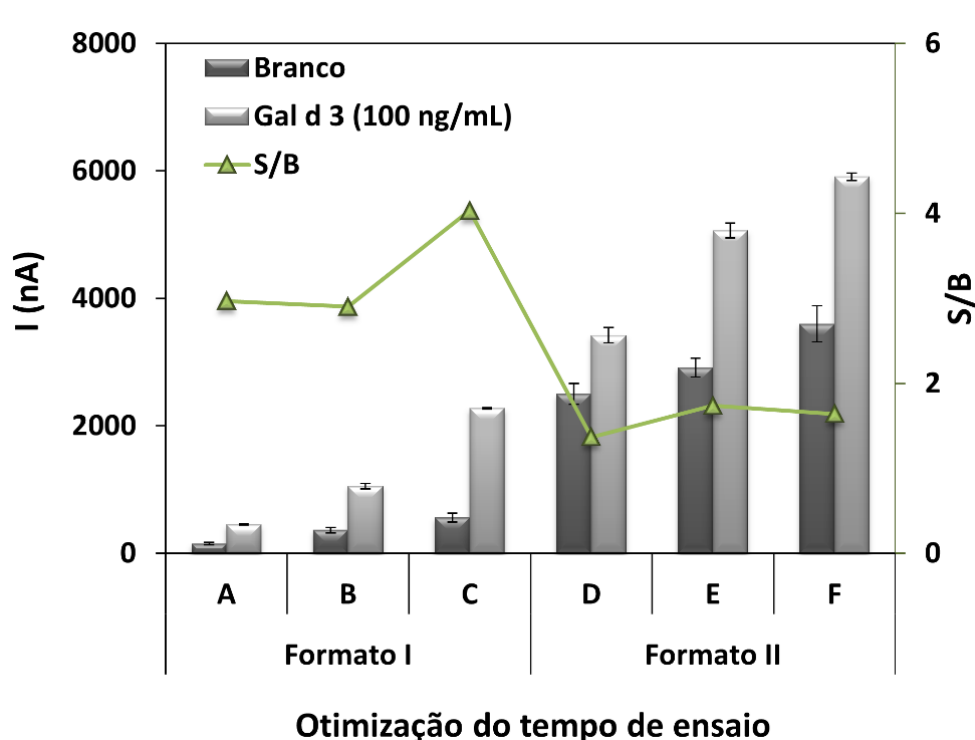


Figura 13 – Otimização do tempo de incubação do ensaio e dos diferentes Formatos: I (passo a passo) e II (pré-incubação de Gal d 3 + DAb-HRP). Parâmetros Experimentais: Gal d 3 (0 e 100 ng/mL, em B1-BSA 0,5%), CAb (2,5 µg/mL), DAb-HRP (200x, em B1-BSA 0,5%). Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).

Analisando os dados presentes na **Figura 13**, é possível averiguar que apesar de a intensidade de corrente (I) ser mais elevada para os ensaios do Formato II, os respetivos brancos são igualmente elevados, sendo esta uma possível interferência causada pela interação cruzada de biomoléculas, previamente incubadas. Assim sendo, os ensaios D, E e F relativos ao Formato II apresentam uma razão S/B reduzida comparativamente aos ensaios A, B e C do Formato I.

Posto isto, verifica-se que o Formato I é o mais eficaz e indicado para o ensaio. Por sua vez, é possível observar que entre os ensaios A, B e C, este último (C) é o que apresenta razão S/B e intensidade de sinal mais elevadas, sendo que os restantes (A e B) apresentam razões e intensidades de sinal relativamente semelhantes. No entanto, o Formato I C apresenta um tempo de ensaio relativamente longo (120 minutos), sendo por esse motivo pouco adequado para o desenvolvimento do biossensor, uma vez que a resposta rápida é uma das vantagens associadas à utilização destes dispositivos. Assim, apesar de o Formato I B apresentar uma intensidade (I) de sinal maior comparativamente ao Formato I A, este último apresenta uma razão S/B ligeiramente mais elevada e uma diminuição de 30 minutos do tempo de ensaio relativamente ao Formato I B, sendo por isso o Formato I A selecionado para prosseguir.

4.6. Nanoestruturação/Modificação do SPCE

A utilização de nanomateriais no desenvolvimento do sensor tem como principal objetivo a amplificação do sinal analítico para melhorar a sensibilidade do método. Os nanomateriais podem ser adicionados às biomoléculas por biofuncionalização e /ou podem ser adicionados na superfície do WE efetuando a nanoestruturação do transdutor.

De modo a estudar a melhoria da análise, através da modificação do WE, foram utilizados nanomateriais de ouro (nanopartículas de ouro (AuNP)) e nanomateriais de carbono (grafeno reduzido (rGO), nanotubos de carbono (CNT), nanodiamantes (ND)). Os nanomateriais em estudo foram dispersos em dimetilformamida (DMF) na concentração de 500 ng/mL e colocados no WE durante (A) 15 min ou (B) 30 min.

Os resultados para os elétrodos modificados e não-modificados encontram-se representados na **Figura 14**, verificando-se que o resultado mais promissor para o desenvolvimento do biossensor corresponde à utilização de SPCE sem modificação prévia.

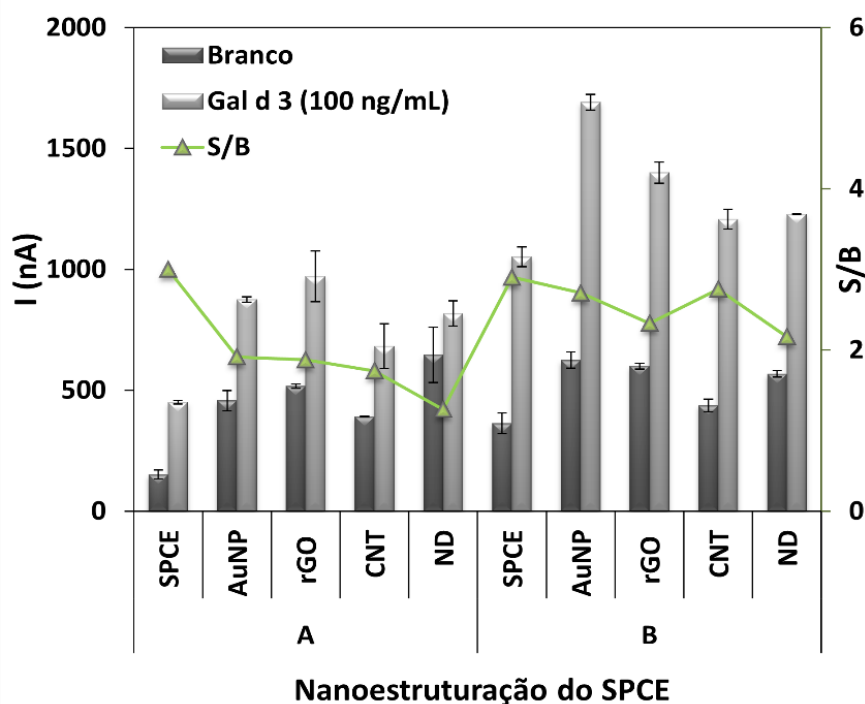


Figura 14 – Nanoestruturação do SPCE com nanomateriais de diferentes dimensões. Parâmetros Experimentais: Gal d 3 (0 e 100 ng/mL, em B1-BSA 0,5%), CA b (2,5 µg/mL), DAb-HRP (200×, em B1-BSA 0,5%). Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).

4.7. Estudo do efeito da temperatura

A temperatura do laboratório onde se realizam os ensaios experimentais é um fator que pode influenciar o sinal analítico. Por este motivo, foi efetuado o estudo da influência da temperatura a 20, 25 e 30 °C, em dias distintos, sendo que os respectivos dados foram analisados e encontram-se representados na **Figura 15**.

Através da análise da figura, observa-se que quando ocorre um aumento da temperatura o sinal analítico obtido correspondente ao Gal d 3 (100 ng/mL) torna-se sucessivamente mais elevada e a intensidade do sinal branco (0 ng/mL) mantém-se relativamente constante. Assim, como o ensaio realizado a 30 °C apresenta intensidade de sinal relativo à presença do alergénio e razão S/B elevados comparativamente às restantes temperaturas, conclui-se que o imunossensor apresenta um melhor desempenho analítico quando a temperatura ambiente é superior a 25 °C.

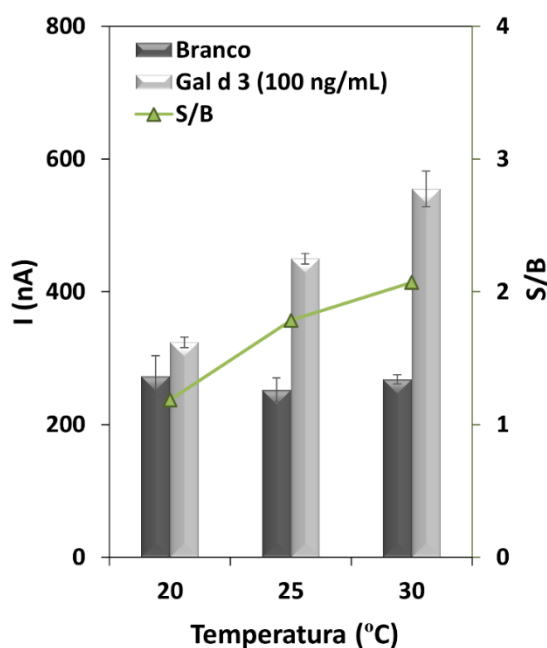


Figura 15- Representação dos resultados obtidos para o estudo correspondente à influência da temperatura no decorrer do ensaio, em dias distintos. Parâmetros Experimentais: Gal d 3 (0 e 100 ng/mL, em B1-BSA 0,5 %), CAb (2,5 µg/mL), DAb-HRP (200×, em B1-BSA 0,5 %). Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).

4.8. Sumário das otimizações das variáveis experimentais

Relativamente às otimizações efetuadas para o desenvolvimento do imunossensor, é possível observar a sua representação resumida na **Tabela 3**, na qual se encontram presentes as variáveis experimentais estudadas, os parâmetros e intervalos analisados, e o respetivo valor e/ou parâmetro selecionado.

Tabela 3 – Resumo das variáveis experimentais estudadas bem como os parâmetros/valores analisados e selecionados.

Variável experimental	Parâmetro analisado	Valor/Parâmetro selecionado
Agente bloqueador	B1; BSA; Caseína	BSA
BSA (%) (m/v)	0,0; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0	0,5
CAb ($\mu\text{g/mL}$)	1,0; 2,5; 5,0; 10	2,5
$t_{\text{incubação Gal d 3}}$ (min)	15; 30; 60	15
DAb-HRP (diluição)	800 \times ; 400 \times ; 200 \times ; 100 \times	200 \times
$t_{\text{incubação DAb-HRP}}$ (min)	15; 30; 60	15
Formato ensaio	I; II	I
Nanoestruturação do SPCE	SPCE; AuNP; rGO; CNT; ND	SPCE
$t_{\text{ensaio total}}$ (min)	30; 60; 120	30
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	20; 25; 30	30

Após a otimização de todos os parâmetros apresentados, foi verificado o tempo de manuseio (do inglês *hands-on time*) para a realização do biossensor, o qual foi determinado em aproximadamente 10 minutos (± 3 min).

4.9. Avaliação do funcionamento do imunossensor

A avaliação do correto funcionamento do imunossensor foi efetuada através da presença ou ausência de cada um dos reagentes utilizados. Os resultados obtidos encontram-se representados na **Figura 16A** e os respectivos amperogramas na **Figura 16B**, estando representados os resultados obtidos na ausência de 1 – CAb, 2 – Gal d 3, 3 – DAb-HRP, 4 – TMB e 5 – na presença de todos os reagentes (1000 ng/mL de Gal d 3).

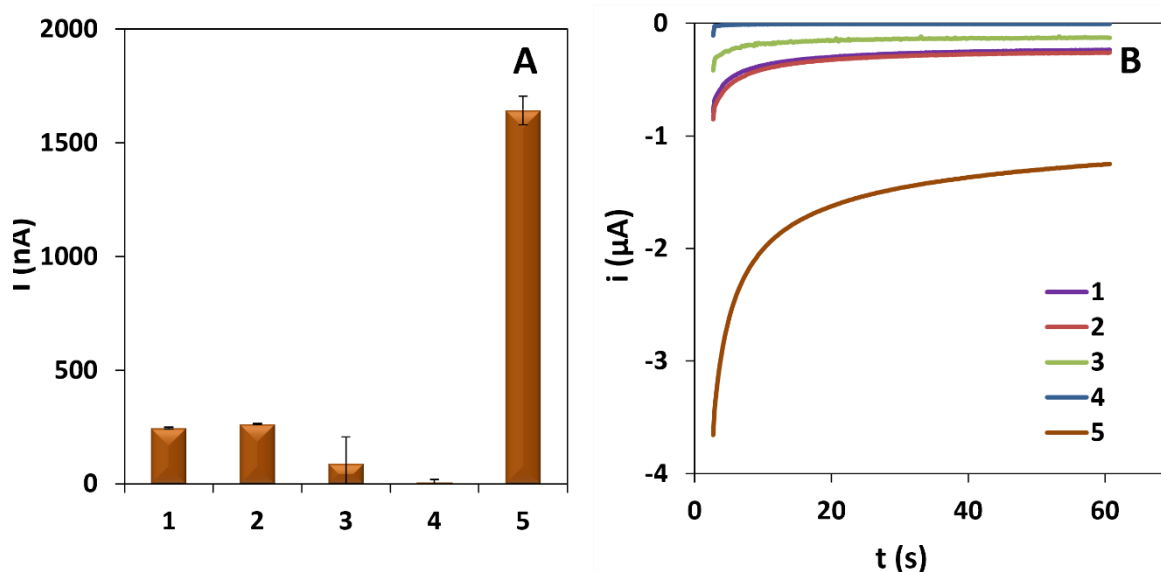


Figura 16 – (A) Avaliação do funcionamento do imunossensor; **(B)** Amperogramas relativos aos parâmetros avaliados. Parâmetros Experimentais: ausência de 1 – CAb, 2 – alergénio (Gal d 3), 3 – DAb-HRP, 4 – TMB, e 5 – presença de todos os reagentes/biomoléculas. Outros parâmetros: Gal d 3 (0 e 1000 ng/mL, em B1-BSA 0,5%), CAb (2,5 μ g/mL), DAb-HRP (200x, em B1-BSA 0,5%). Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=3).

Relativamente aos valores obtidos verifica-se que o biossensor apresenta o correto funcionamento quando todas as biomoléculas estão presentes (análise 5), tal como se pode observar pela maior intensidade do sinal analítico comparativamente às restantes análises, nomeadamente 1, 2, 3 e 4, nas quais um dos reagentes/biomoléculas não foi adicionado. Assim, verifica-se que na ausência do analito-alvo (2) ou na ausência de uma das etapas da construção do biossensor (1, 3, 4) que pode decorrer de problemas técnicos como a não adição de uma das etapas ou problemas com as biomoléculas (p. ex. desnaturação), o sinal analítico apresenta resultados similares ao sinal obtido na ausência do alergénio Gal d 3.

4.10. Características analíticas do imunossensor

As características analíticas do imunossensor desenvolvido foram avaliadas utilizando os parâmetros experimentais previamente otimizados. A concentração de Gal d 3 variou entre 25 e 4000 ng/mL, sendo testadas as seguintes concentrações: 0; 25,0; 50,0; 100; 200; 400; 600; 800; 1000; 2000 e 4000 ng/mL. Os valores obtidos para estas concentrações encontram-se representados na **figura 17A** e a reta de calibração na **Figura 17B**.

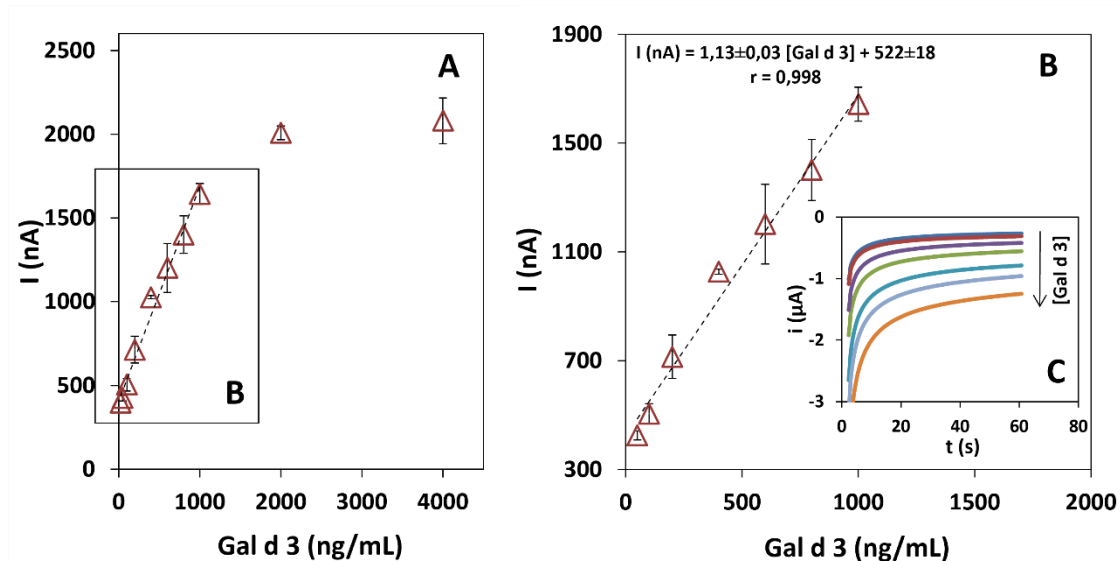


Figura 17 –Análise do alergénio Gal d 3 por cronoamperometria (diferença de potencial fixa de 0 V, aplicado durante 60 s). **(A)** Intensidades obtidas para a gama em estudo (25 a 4000 ng/mL de Gal d 3) **(B)** Reta de calibração para a análise do alergénio (I vs concentração de Gal d 3): 50,0; 100; 200; 400; 600; 800; 1000 ng/mL em B1-BSA 0,5%; **(C)** Amperogramas obtidos para as concentrações de Gal d 3 na zona de linearidade. Parâmetros Experimentais: CAB (2,5 µg/mL), DAb-HRP (200x, em B1-BSA 0,5%). Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).

Através da análise da **Figura 17B** verifica-se que a relação linear entre a corrente e a concentração de Gal d 3 encontra-se entre 55 e 1000 ng/mL ($I \text{ (nA)} = (1,13 \pm 0,03) [\text{Gal d 3}] \text{ (ng/mL)} + (522 \pm 18)$; $r = 0,998$; $n = 7$). Os limites de deteção ($LOD = 3 \times S_{y/x}/m$) e de quantificação ($LOQ = 10 \times S_{y/x}/m$) foram calculados com base na reta de calibração, sendo $S_{y/x}$ o desvio-padrão da regressão linear e m o declive da reta de calibração. Os valores obtidos foram: $LOD = 16 \text{ ng/mL}$ e $LOQ = 55 \text{ ng/mL}$. O coeficiente de variação do método obtido, $V_{x0} \text{ (}\%)$, foi de 5,5 %, demonstrando assim uma adequada precisão de método. Para a obtenção deste valor, foram efetuados os seguintes cálculos: $S_{x0} = S_{y/x}/m$ e $V_{x0} \text{ (}\%) = S_{x0}/(\bar{x})$, onde \bar{x} corresponde à média das concentrações dos padrões. Na **Tabela 4** estão indicadas as figuras de mérito do método em estudo.

Relativamente à precisão dos resultados, foram estudadas a repetibilidade e a reprodutibilidade, sendo previamente preparadas e biomodificadas vários elétrodos. De forma a avaliar a repetibilidade foi utilizada uma solução de Gal d 3 de 1000 ng/mL utilizando 3 elétrodos diferentes, no mesmo dia, tendo obtido um desvio padrão relativo (RSD) de 3,8%. Adicionalmente, a reprodutibilidade foi avaliada utilizando uma solução de 1000 ng/mL Gal d 3, em diferentes elétrodos durante 3 dias consecutivos, obtendo-se um RSD de 5,7%. Assim sendo, tal como na repetibilidade verifica-se igualmente uma boa reprodutibilidade (RSD < 10%).

Tabela 4 – Figuras de mérito relativos ao imunossensor para a análise do Gal d 3.

Figura de mérito	Resultado
Intervalo de concentração (ng/mL)	55-1000
Coefficiente de correlação (r)	0,998
Declive (m) (nA/(ng/mL))	1,13
Desvio padrão do declive S_m (ng/mL)	0,03
Interceção (b) (nA)	522
Desvio padrão da interceção S_b (nA)	18
Desvio padrão da regressão linear ($S_{y/x}$)	6,2
Desvio padrão do método (S_{x0})	26
Coefficiente de variação do método (V_{x0}) (%)	5,5
Limite de deteção (LOD) (ng/mL)	16
Limite de quantificação (LOQ) (ng/mL)	55

4.11. Avaliação da estabilidade do biossensor

A avaliação da estabilidade de armazenamento do biossensor realizou-se ao longo de vários dias, nomeadamente ao fim de 1, 7, 15, 20, 30 e 40 dias. Os elétrodos foram preparados simultaneamente (adição de 10 μL de CAb 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a cada WE), sendo armazenados num recipiente humidificado, em ambiente refrigerado (4-8 $^{\circ}\text{C}$). O sinal amperométrico foi monitorizado após armazenamento dos dias referidos, utilizando soluções de 0 e 500 ng/mL de Gal d 3. Os resultados obtidos encontram-se representados na **Figura 18**.

Não se verificaram diferenças significativas aparentes no sinal analítico obtido ao longo de 20 dias, obtendo-se 99.4% do sinal inicial, o que indica a estabilidade da plataforma previamente preparada durante este período. Assim, a utilização da plataforma previamente preparada reduz o tempo necessário para a preparação, permitindo uma série de SPCE possa ser preparada simultaneamente, tornando o trabalho mais sustentável, uma vez que se utiliza uma menor quantidade diária de CAb. Ao fim de 40 dias, observa-se uma redução do sinal amperométrico para 71,5 %.

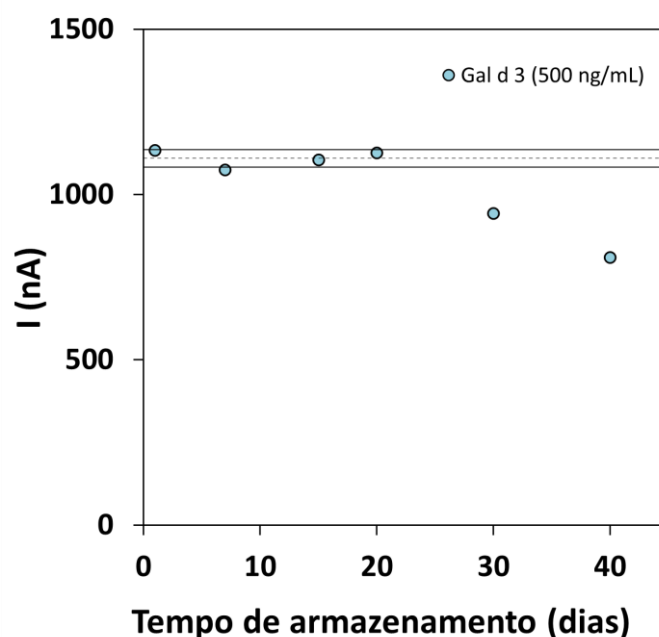


Figura 18 – Representação do estudo da estabilidade do biossensor durante 40 dias. Parâmetros experimentais: Gal d 3 (500 ng/mL em B1-BSA 0,5 %), CAb (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), DAb-HRP (200 \times , em B1-BSA 0,5 %). As linhas representam: média dos valores (linha tracejada) \bar{x} ; e soma da média e desvio padrão ($n=3$) $\bar{x} \pm \varphi$ (linhas contínuas) de um conjunto de medições efetuadas ao longo de 40 dias.

4.12. Avaliação da seletividade e interferentes

A seletividade do imunossensor em relação a outras proteínas/alergénios alimentares importantes encontradas em produtos alimentares (amendoim (Ara h 1), ovo (ovomucóide – Gal d 1), peixe (parvalbumina – Gad c 1), aipo (Api g 1)) foi avaliada comparando-se as correntes medidas com o imunossensor para 0 e 1000 ng/mL de ovotransferrina – Gal d 3, na presença das proteínas referidas.

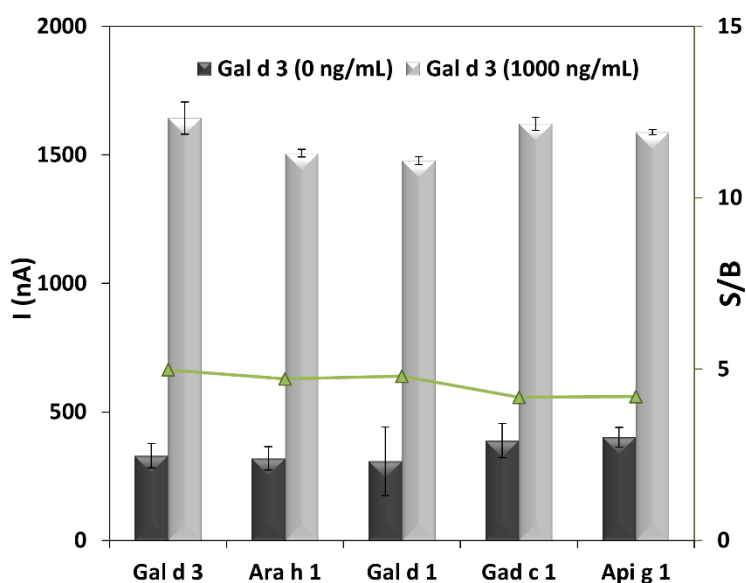


Figura 19 – Estudo da seletividade e interferentes utilizando proteínas alergénicas alvo (Gal d 3 – 0 e 1000 ng/mL) e não-alvo (Ara h 1, Gal d 1, Gad c 1 e Api g 1, 1000 ng/mL). Parâmetros Experimentais: CA b (2,5 µg/mL), DAb-HRP (200×, em B1-BSA 0,5 %). Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).

De acordo com os resultados apresentados na **Figura 19** é possível concluir que as outras proteínas alergénicas originam sinais próximos do branco (na ausência de Gal d 3), demonstrando assim a alta seletividade do par de anticorpos usados. Quando misturadas com Gal d 3 foram obtidas correntes semelhantes à proteína em estudo, demonstrando que estas não interferem significativamente na deteção da Gal d 3.

4.13. Estudo de recuperação e avaliação do efeito matriz

Materiais de Referência Certificados são idealmente utilizados para a avaliação da exatidão dos resultados de um método analítico. No entanto, tais materiais de referência não estavam disponíveis. Por isso, efetuaram-se estudos de recuperação utilizando um extrato de cereal integral (cujo rótulo indica que não contém ovo ou quaisquer vestígios do mesmo). O extrato alimentar foi fortificado com concentrações de Gal d 3 dentro da gama de linearidade (250; 500; 750; 1000 ng/mL). Na **Tabela 5** encontram-se representados os resultados obtidos.

Tabela 5 – Resultados obtidos para o estudo de recuperação.

[Gal d 3] Adicionada (ng/mL)	[Gal d 3] Obtida (ng/mL)	Recuperação (%)	RSD (%)
250	246	98,4	9,6
500	543	108,6	5,6
750	787	104,9	5,0
1000	973	97,3	6,5

Através da análise dos dados apresentados na Tabela 5, verifica-se que para as concentrações estudadas do alergénio (250, 500, 750, 1000 ng/mL) foram obtidas percentagens de recuperação de 98,4, 108,6, 104,9 e 97,3%, respetivamente. Posto isto, como estes valores encontram-se inseridos na gama de recuperação satisfatória (90-110%) é possível afirmar que o biossensor desenvolvido fornece resultados exatos, permitindo assim uma deteção eficaz em amostras alimentares. O RSD obtido para as diferentes concentrações atesta mais uma vez a precisão dos resultados.

A reta de calibração representada na **Figura 20** confirma que nenhum efeito de matriz significativo foi observado, uma vez que o declive obtido utilizando a amostra alimentar (2) e a da reta de calibração em tampão (1) foram semelhantes ($\text{declive}_{\text{tampão}}/\text{declive}_{\text{matriz}} = 1,02$).

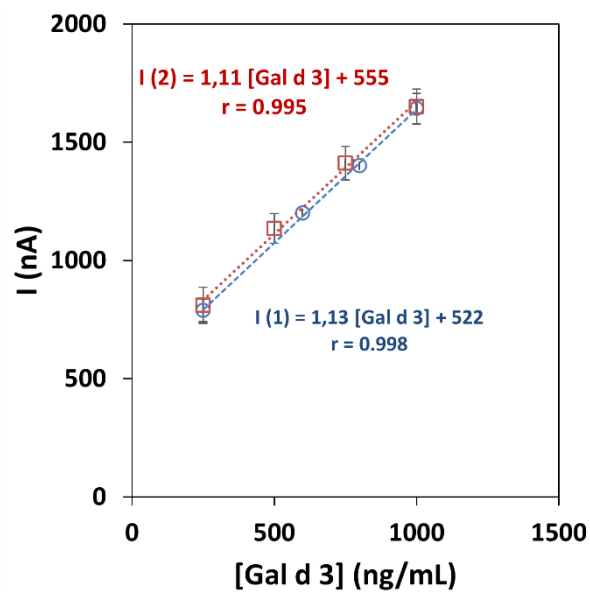


Figura 20 – Representação da comparação entre a análise de soluções de Gal d 3 preparadas em tampão (I₁, Gal d 3: 250, 600, 800 e 1000 ng/mL, em B1-BSA 0,5%) e em extrato de cereal integral (I₂, Gal d 3: 250, 500, 750 e 1000 ng/mL, em B1-BSA 0,5%). Parâmetros experimentais: CA_b (2,5 µg/mL), DA_b-HRP (200×, em B1-BSA 0,5%). Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3).

4.14. Avaliação do fator de diluição e quantificação de Gal d 3 em clara de ovo

Utilizou-se proteína de clara de ovo em pó (100%, produto certificado, fullprotein, derovo group, Portugal) de modo a efetuar a quantificação da ovotransferrina. Efetuou-se uma série de diluições em B1-BSA (100x; 250x; 1000x; 2000x; 5000x; 10.000x). Os resultados obtidos encontram-se representados na **Figura 21**.

Atualmente, encontram-se descritas na literatura diferentes proteínas alergénicas presentes no ovo (previamente descritas na Introdução, secção 2.4), sendo que estas se dividem em alergénios da clara ou da gema do ovo. Concretamente, o Gal d 3 tem uma prevalência de aproximadamente 12% na clara de ovo. Por este motivo, diversas diluições foram efetuadas para que a quantificação fosse a correta. Ou seja, o valor da intensidade de corrente (I) obtido deve estar dentro da gama de linearidade previamente estudada. Tal como se pode observar na **Figura 21**, com o aumento do fator de diluição ocorre um aumento da corrente o que demonstra saturação de sinal entre as diluições até ao máximo de 5000x. Por este motivo, num fator de diluição ampliado de 10,000x foi possível efetuar uma quantificação mais adequada.

Deste modo, para a diluição de 10.000x verifica-se que a intensidade de corrente obtida permite quantificar o alergénio adequadamente, ou seja, sem ocorrer a saturação de sinal (saturação essa indicativa de quantidade elevada do alergénio em estudo). Após análise concluiu-se que o produto em análise (clara de ovo em pó) contém 1,7 mg/g (1,7 g/kg) do alergénio Gal d 3.

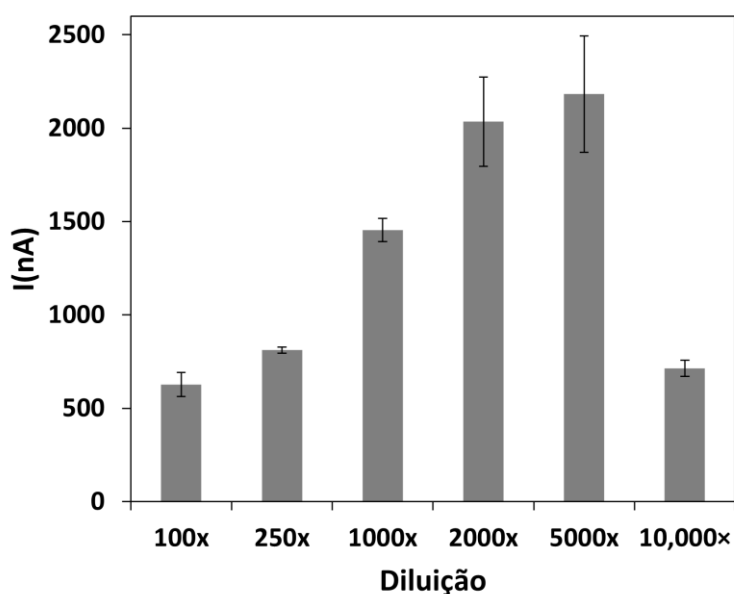


Figura 21 – Estudo da otimização da diluição da amostra alimentar (clara de ovo; diluições testadas: 100x; 250x; 1000x; 2000x; 5000x; 10.000x). Parâmetros experimentais: CAb (2,5 µg/mL), DAb-HRP (200x, em B1-BSA 0,5 %).

4.15. Avaliação da fortificação de uma amostra alimentar

Para efetuar o estudo da avaliação da presença efetiva de Gal d 3 em amostras comerciais utilizou-se o cereal integral como amostra alimentar, a qual foi fortificada com clara de ovo liofilizada, pelo facto de não existir amostras certificadas para a validação do método. A escolha do produto alimentar – cereal integral – foi efetuada tendo por base a sua composição nutricional e rótulo alimentar, o qual não contemplava a presença de ovo, nem vestígios deste alergénio. Assim, procedeu-se à adição de percentagens crescentes de clara de ovo (0,010; 0,10; 1,0; 5,0 %) à amostra alimentar. Foi efetuada a diluição de 250x uma vez que a quantificação foi efetuada para valores $\leq 5\%$. Os resultados obtidos referentes ao respetivo estudo encontram-se representados na **Figura 22**. Este estudo foi efetuado com o intuito de avaliar a eficácia do imunossensor na deteção de percentagens de clara de ovo indicadas nos rótulos, para assim efetuar a posterior análise e quantificação de amostras alimentares obtidas comercialmente com maior rigor.

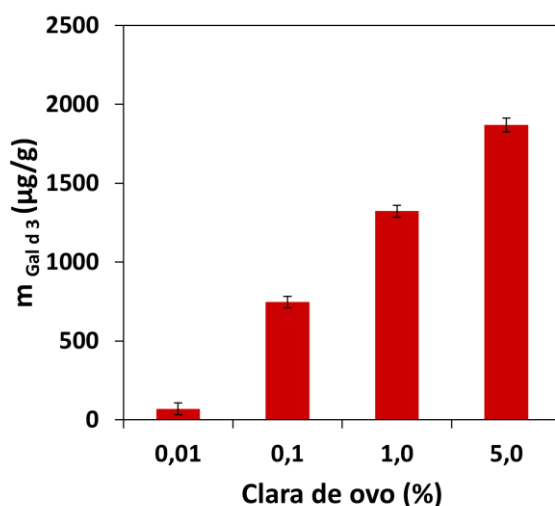


Figura 22 – Quantificação do alergénio Gal d 3 ($\mu\text{g/g}$) em percentagens (%) crescentes de clara de ovo previamente adicionada a cereal integral. Parâmetros experimentais: CAB (2,5 $\mu\text{g/mL}$), DAb-HRP (200x, em B1-BSA 0,5%).

Entre os objetivos propostos para a realização da presente dissertação constam o rastreamento em quantidades vestigiais de clara de ovo (contendo Gal d 3), a deteção deste alergénio (ausência/presença) em amostras alimentares e a sua quantificação. Este estudo permite assim verificar que o sensor desenvolvido e otimizado permite atingir os objetivos propostos. Ou seja, percentagens extremamente baixas (até 0,010%) podem ser analisadas adequadamente. Por outro lado, rótulos de produtos com as indicações especificadas podem ser validados utilizando o sensor desenvolvido. Por este motivo é possível depreender de acordo com os resultados obtidos que a análise/quantificação de Gal d 3 em produtos alimentares pode ser conseguida com eficiência.

4.16. Análise de produtos alimentares

Efetuuou-se uma série de ensaios de modo a quantificar o alergénio em estudo em amostras que se encontram em estados físicos diferentes (clara de ovo **sólido** e **líquido** (A e B, respetivamente)). Também foi estudada a influência da temperatura (clara **cozida** e clara **frita** (C e D, respetivamente)), do vinagre (influência química) (clara **escalfada** (E)) e a influência mecânica (clara **em castelo** (F)) na quantificação do alergénio. Para além destas, analisou-se o **ovo inteiro** (gema + clara (G)) uma vez que é frequente encontrar a menção de “pode conter vestígios de ovo” nos rótulos de alimentos sem especificar a clara ou a gema. Os resultados obtidos encontram-se representados na **Figura 23**.

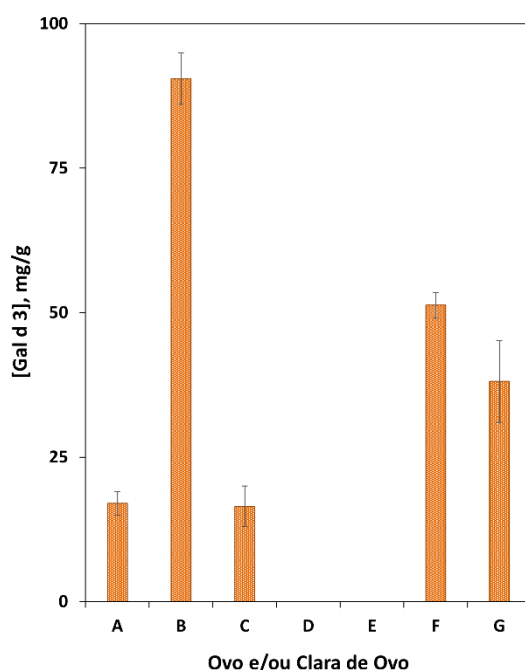


Figura 23 – Representação da quantificação de Gal d 3 (mg/g) num conjunto de amostras alimentares, utilizando o imunossensor desenvolvido. Parâmetros experimentais: (A) clara de ovo sólido; (B) clara de ovo líquido; (C) clara de ovo cozida; (D) clara de ovo frita; (E) clara de ovo escalfada; (F) clara de ovo em castelo; (G) ovo inteiro.

Analisando os dados presentes na figura é possível verificar que o valor mais elevado de Gal d 3 foi obtido para a amostra B, a qual contém o alergénio em estudo no seu formato integral/original. As amostras F e G apresentam aproximadamente metade do valor da amostra B. Na amostra F (claras batidas em castelo) verifica-se uma diminuição da tensão superficial das suas proteínas por ação mecânica. Por outro lado, a amostra G contém ambos os componentes do ovo – clara e gema (consistindo num maior volume de amostra).

Por sua vez, as amostras A e C (clara sólida; clara cozida) apresentam as concentrações mais baixas. Estes valores podem dever-se ao facto de a amostra A ser liofilizada, e a amostra C ser submetida ao processo de cozedura, porém com a casca, não tendo a amostra estado diretamente em contacto com a água. Já as amostras D e E não apresentaram uma concentração

quantificável, sendo este resultado devido a um processamento da amostra por temperatura elevada, estando a clara diretamente em contacto com a superfície aquecida. É ainda de referir que a amostra E (clara escalfada) foi submetida a uma variação de pH, ou seja, a cozedura deste produto é efetuada em água com a adição prévia de vinagre alimentar (ácido acético) que modifica o pH da água o que leva, provavelmente, a uma conformação proteica diferenciada (desnaturação), sendo este um dos principais motivos da não deteção da Gal de 3 na amostra.

Na alergia alimentar em estudo (ovo), a sensibilização alérgica é provocada maioritariamente por proteínas da clara do ovo (ovomucóide, ovalbumina, ovotransferrina, lisozima). A clara do ovo tem na sua constituição proteínas que podem ser destruídas pelo calor, como é o caso do alergénio em estudo – ovotransferrina. Contudo, está descrito na literatura que outros alergénios (p. ex. ovomucóide) podem ser resistentes a altas temperaturas.

Este facto explica o motivo para que alguns indivíduos apenas desencadeiem sintomas/reações alérgicas a ovo cru e/ou alimentos que contenham ovo cru, enquanto outros desencadeiam reações alérgicas tanto a ovo cru como cozinhado (mesmo que submetidos a processo de cozedura a altas temperaturas) [77]

Assim, com o presente estudo podemos verificar que indivíduos com hipersensibilidade à ovotransferrina não devem ingerir ovo cru, tendo especial atenção ao processo de cozedura, o qual deve ser efetuado a altas temperaturas, sem a casca do ovo.

Para além da análise de Gal d 3 em amostras de ovo e clara de ovo, procedeu-se à análise de outras amostras alimentares. Selecionaram-se ingredientes e/ou produtos alimentares, que foram adquiridos em superfícies comerciais locais (Porto, Portugal). A seleção dos produtos foi efetuada tendo por base alimentos e/ou ingredientes que contêm ovo; possam conter vestígios de ovo e/ou que não contêm ovo. Os alimentos escolhidos encontram-se presentes na categoria dos doces, snacks, sobremesas típicas portuguesas, entre outros (p. ex. caldos de legumes, massa, etc.) pois estes são geralmente confeccionados utilizando tanto a clara como a gema do ovo.

Os produtos alimentares foram agrupados nas seguintes categorias – **não contêm ovo**: 1 – Cereal Integral; 2 – Bolacha Belga; 3 – Farinha; 4 – Aipo; 5 – Sésamo; 6 – Soja; 7 – Amendoim; 8 – Avelã; 9 – Aveia; 10 – Pudim royal; 11 – Pudim flan em pó; **podem conter vestígios de ovo**: 12 – Bolacha de Amendoim e Ananás; 13 – Bolacha água e sal; 14 – Bolacha Maria; 15 – Caldo de legumes; 16 – Pão de ló da marca Branca; **contêm ovo**: 17 – Bolachas areias; 18 – Muffins (ovo 13%, clara de ovo 8%); 19 – Madalenas (clara de ovo 8%, ovo 5%); 20 – Massa alimentícia (60% sêmola de trigo, clara de ovo); 21 – Pudim flan (ovo 17,8%); 22 – Pudim de ovos (ovo 5%); 23 – Pão de ló (ovo em pó); 24 – Preparado de doce de ovos (ovo 13%); 25 – Torta enrolada (ovo 7%, clara de ovo 3%). Para extração do alergénio efetuou-se o procedimento experimental descrito na Parte Experimental (secção 3.3.3.). Os resultados obtidos encontram-se representados na

Figura 24.

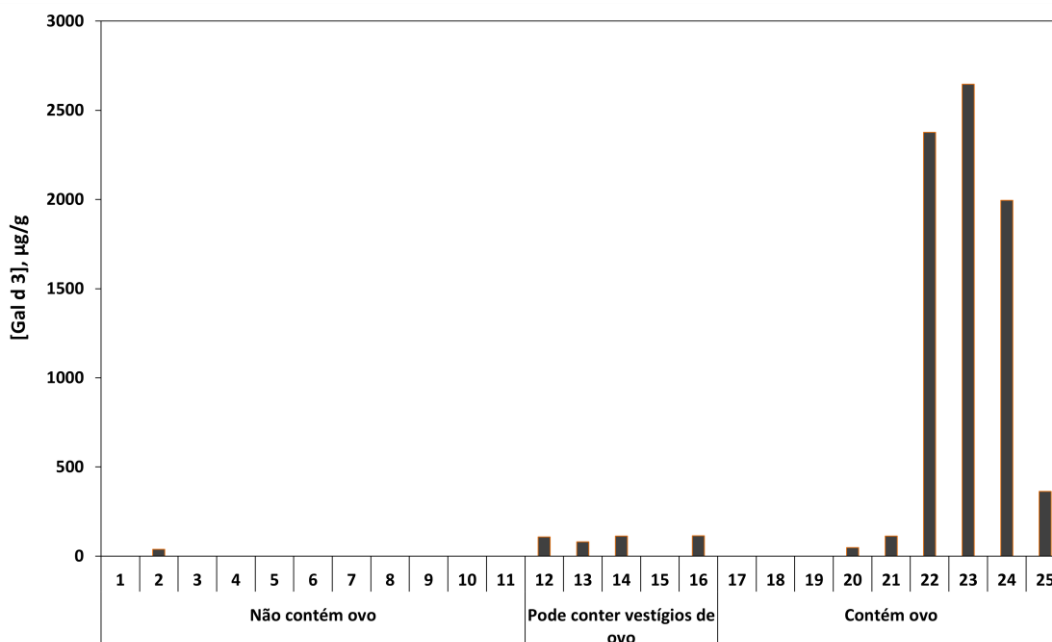


Figura 24 – Resultados da análise de Gal d 3 num conjunto de amostras alimentares, utilizando o imunossensor desenvolvido. **Não contém ovo**: 1 – Cereal Integral; 2 – Bolacha Belga; 3 – Farinha; 4 – Aipo; 5 – Sésamo; 6 – Soja; 7 – Amendoim; 8 – Avelã; 9 – Aveia; 10 – Pudim royal; 11 – Pudim flan em pó. **Pode conter vestígios de ovo**: 12 – Bolacha de Amendoim e Ananás; 13 – Bolacha água e sal; 14 – Bolacha Maria; 15 – Caldo de legumes; 16 – Pão de ló da marca Branca. **Contém ovo**: 17 – Bolachas areias; 18 – Muffins (ovo 13%, clara de ovo 8%); 19 – Madalenas (clara de ovo 8%, ovo 5%); 20 – Massa alimentícia 60% (sêmola de trigo, clara de ovo); 21 – Pudim flan (ovo 17,8%); 22 – Pudim de ovos (ovo 5%); 23 – Pão de ló (ovo em pó); 24 – Preparado de doce de ovos (ovo 13%); 25 – Torta enrolada (ovo 7%, clara de ovo 3%).

De entre as amostras analisadas, não foi possível quantificar o alergénio Gal d 3 nas amostras que não contêm ovo (1 a 11) com exceção da amostra 2 (Bolacha Belga). De entre as restantes constam outros alergénios alimentares referenciados no Regulamento (UE) 1169/2011, bem como ingredientes que constam em rótulos de produtos alimentares que podem conter ou contêm ovo.

Foi efetuada a análise de produtos que não referiam a presença de ovo, mas cuja receita original contém ovo (Pudim royal; Pudim flan em pó). No caso da amostra 2 o rótulo não tinha qualquer indicação acerca da presença/ausência do ovo. Por este motivo esta amostra foi analisada uma vez que a sua receita original comumente indica a presença de ovo. Tal como se pode verificar na **Figura 24**, o imunossensor desenvolvido permite rastrear a presença de Gal d 3 nessa amostra. Assim sendo, este produto não se encontra em conformidade com a legislação em vigor.

Por sua vez, no grupo dos alimentos que podem conter vestígios de ovo (12 a 16) verifica-se que o Gal d 3 é quantificável nas amostras em estudo com exceção da amostra 15, ou seja, as amostras 12, 13,14 e 16 efetivamente contêm ovo tal como indicado no seu rótulo, mas a amostra 15 tem um rótulo de precaução, ou seja, provavelmente a produção deste produto alimentar é efetuada em local onde outras amostras com ovo são processadas e como tal, o produtor deste produto pretende apenas advertir o consumidor final.

Por outro lado, no conjunto de amostras que contêm ovo (17 a 25) verifica-se que não é possível quantificar Gal d 3 em todas, sendo que nas amostras: 17 – Bolachas areias; 18 – Muffins (ovo 13%, clara de ovo 8%); 19 – Madalenas (clara de ovo 8%, ovo 5%) não é possível tal quantificação apesar de ser descrita na sua lista de ingredientes a presença de ovo e/ou clara de ovo. Estes resultados podem ser dever-se ao facto de os produtos em questão serem confeccionados no forno a temperaturas superiores às da cozedura em água. As amostras 20 (Massa alimentícia 60% (sêmola de trigo, clara de ovo)), 21 (Pudim flan (ovo 17,8%)) e 25 (Torta enrolada (ovo 7%, clara de ovo 3%)) foram quantificáveis; porém, a concentração obtida era bastante baixa. A amostra 20 é processada sobre o efeito da temperatura cozinhada em água (banho-maria). O rótulo da amostra 21 não refere se o conteúdo de ovo representa o ovo completo, ou apenas a gema e/ou a clara. A amostra 25 consiste em massa previamente cozida no forno com adição subsequente de um creme que contém clara e que não é submetido ao anterior efeito da temperatura. Assim sendo, é possível quantificar o alergénio em concentrações baixas devido aos processamentos decorrentes das 3 amostras, resultando na diminuição da alergenicidade devido a possível desnaturação da proteína/alergénio. Por fim, as amostras 22 (Pudim de ovos (ovo 5%)), 23 (Pão de ló (ovo em pó)) e 24 (Preparado de doce de ovos (ovo 13%)) apresentam concentrações elevadas de Gal d 3. É ainda de salientar que estas 3 amostras contêm ovo em pó uma vez que as amostras são compradas em forma liofilizada. Para além disto, é apenas referida a presença de ovo sem qualquer referência à diferenciação entre clara e gema de ovo.

4.17. Validação dos resultados

Após a análise das amostras alimentares utilizando o imunossensor amperométrico desenvolvido, realizou-se a avaliação dos resultados das mesmas utilizando o método tradicional – ELISA. Os dados obtidos para os dois métodos encontram-se na **Tabela 6**. O protocolo utilizado encontra-se descrito na Parte Experimental (secção 3.5.).

Tabela 6 – Análise de Gal d 3 em ingredientes/produtos alimentares comerciais utilizando o imunossensor amperométrico desenvolvido e o método convencional ELISA.

	Ingrediente / Produto Alimentar	Imunossensor	ELISA
Não contém ovo	Cereal Integral	<LOQ	<LOQ
	Bolacha Belga	38,5±3,2	<LOQ
	Farinha	<LOQ	<LOQ
	Aipo	<LOQ	<LOQ
	Sésamo	<LOQ	<LOQ
	Soja	<LOQ	<LOQ
	Amendoim	<LOQ	<LOQ
	Avelã	<LOQ	<LOQ
	Aveia	<LOQ	<LOQ
	Pudim royal	<LOQ	<LOQ
	Pudim flan em pó	<LOQ	<LOQ
Pode conter vestígios de ovo	Gal d 3 (µg/g)		
	Bolacha amendoim+ananás	108,4±10,1	<LOQ
	Bolacha água e sal	80,1±5,8	<LOQ
	Bolacha maria	112,4±3,0	<LOQ
	Caldo de legumes	<LOQ	<LOQ
Pão de ló Branca	115,0±4,2	<LOQ	
Contém ovo	Bolachas areias	<LOQ	12,9±1,7
	Muffins (ovo 13%, clara de ovo 8%)	<LOQ	<LOQ
	Madalenas (clara de ovo 8%, ovo 5%)	<LOQ	<LOQ
	Massa alimentícia 60% (sêmola de trigo, clara de ovo)	48,7±3,7	<LOQ
	Pudim flan (ovo 17,8%)	112,8±4,9	112,1±2,3
	Pudim de ovos (ovo 5%)	2376±15,8	2242±4,5
	Pão de ló (ovo em pó)	2646±23,8	2436±18,2
	Preparado de doce de ovos (ovo 13%)	1995±42,7	1755±10,1
	Torta enrolada (ovo 7%, clara de ovo 3%)	362,8±21,5	307,1±4,2
Ovo	Gal d 3 (mg/g)		
	Clara de ovo sólida (pó)	17,0±1,6	20,3±1,1
	Clara de ovo líquida	90,5±4,4	87,2±3,1
	Clara cozida	16,5±4,1	8,1±1,7
	Clara frita	<LOQ	<LOQ
	Clara escalfada	<LOQ	<LOQ
	Clara em castelo	51,3±2,2	53,6±4,3
	Ovo inteiro	38,1±3,9	35,9±3,5

* <LOQ –Inferior ao limite de quantificação (55 ng/mL)

Os valores obtidos e apresentados na **Tabela 6**, utilizando as técnicas acima mencionadas são correlacionáveis entre si, tal como se pode observar na **Figura 25**.

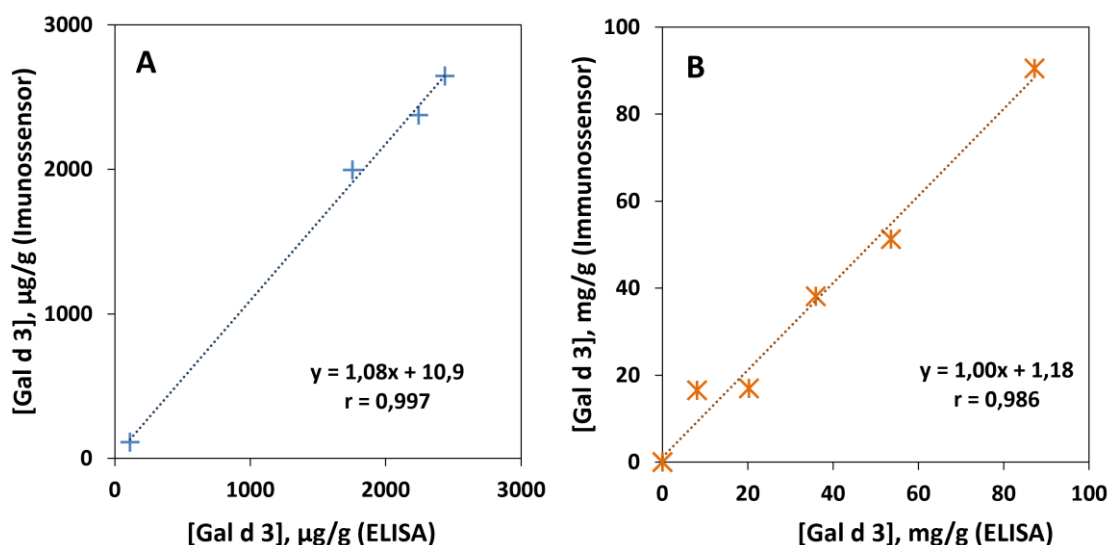


Figura 25 – Correlação entre os valores obtidos utilizando o imunossensor amperométrico desenvolvido e ELISA como técnica tradicional. **(A)** Correlação para Ingredientes / Produtos Alimentares que não contêm, podem conter vestígios ou contêm ovo; **(B)** Correlação para ovo e/ou clara de ovo.

Verifica-se que a correlação entre os resultados para o imunossensor vs. ELISA apresentam declives de 1,08 e 1,00 para os dados representados na Figura 25 (A) e (B) respetivamente. Estes dados permitem concluir que não existem diferenças significativas entre os dois métodos. Assim, o método tradicional utilizado valida os dados obtidos utilizando o imunossensor.

De entre os resultados obtidos para o conjunto de 25 amostras, verifica-se que é possível quantificar Gal d 3 em alguns produtos utilizando o imunossensor, porém não é possível tal quantificação através do método tradicional (p. ex. Bolacha Belga). Um outro dado importante é referente à amostra de clara cozida em que o valor obtido por ELISA é inferior comparativamente com o valor obtido pelo imunossensor. Este resultado pode dever-se a uma série de fatores, tais como imprecisões na adição de reagentes/padrões/soluções uma vez que utilizando uma pipeta multicanal é necessária maior atenção ao volume e sendo uma adição múltipla há maior probabilidade de erro uma vez que esta técnica tem como característica a exigência de pessoas especializadas para o manuseio (torna-se difícil o controlo dos volumes adicionados utilizando uma pipeta multicanal).

É ainda de salientar que os métodos utilizados (imunossensor vs. ELISA) apresentam características diferenciadas:

- O tempo total de ensaio para o imunossensor é de 30 minutos e do ELISA 2h e 10 min;
- O kit ELISA requer etapas de lavagem exaustivas (2x cada etapa) comparativamente com o imunossensor (1x cada etapa);
- Utilizam-se eletrodos de uso único no caso do biossensor, porém é necessária uma placa de 96 poços para realizar o ELISA. Assim, no caso de serem necessárias análises unitárias o biossensor é mais adequado e sustentável. Para além disso, o ELISA requer maior volume de soluções (100 μL por poço) comparativamente ao biossensor (40 μL);
- Para além dos fatores mencionados o imunossensor amperométrico apresenta vantagens como miniaturização, baixo custo, portabilidade, etc., permitindo ainda que as análises possam ser efetuadas num local de amostragem.

Por todos os pontos acima considerados, o biossensor desenvolvido demonstra ser mais vantajoso comparativamente ao método convencional.

4.18. Comparação do Imunossensor desenvolvido com trabalhos descritos na literatura

As características analíticas mais importantes do presente imunossensor e de outros imunoenaios eletroquímicos descritos na literatura para a análise de alérgenos do ovo em amostras alimentares encontram-se sumariamente descritos na **Tabela 7**.

Tabela 7 – Sumário de algumas características analíticas de imunossensores e imunoenaios eletroquímicos para a análise de alérgenos do ovo.

Alergénio	Construção do imunossensor e método de deteção	Tempo de ensaio	LOD	Amostras	Ref
Ovotransferrina (Gal d 3)	SPCE sem nanoestruturação; CAb imobilizado por adsorção física; ensaio <i>sandwich</i> ; deteção por cronoamperometria (TMB)	30 min	16 ng/mL	Bolachas, snacks, biscoitos, alérgenos alimentares, sobremesas/doces típicos, massas, ovo e clara de ovo	Este trabalho
Ovalbumina (Gal d 2)	SPCE/grafeno; CAb imobilizado por ligação covalente (EDC/ NHS); ensaio <i>label-free</i> ; deteção por DPV [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-}	1h 15 min	0,83 pg/mL	Extrato de bolo sem ovo	[67]
Ovalbumina (Gal d 2)	SPPE/MBs; CAb imobilizado covalentemente (EDC/NHS); ensaio <i>sandwich</i> ; deteção por LSV (H ₂ O ₂)	2h 15 min	5,0 nM	n.r.	[68]
Ovalbumina (Gal d 2)	GCE/MBs; CAb imobilizado covalentemente (EDC/ NHS); ensaio <i>label-free</i> ; deteção por DPV (tirosina)	65 min	5.0 x 10 ⁻¹³ M	n.r.	[69]
Ovomucóide (Gal d 1)	SPCE/MBs; CAb imobilizado covalentemente (EDC/NHS); ensaio <i>sandwich</i> ; deteção por amperometria (HQ)	30 min	0,1 ng/mL	Ovos de galinha e pão	[70]
Ovalbumina (Gal d 2)	SPGE/nanocompósito; CAb imobilizado covalentemente; ensaio <i>label-free</i> ; deteção por DPV [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-}	1h 15 min	0,01 pg/mL	Biscoitos sem ovo	[71]
Ovalbumina (Gal d 2)	8-SPCA/MBs; CAb imobilizado por ligação covalente; ensaio <i>sandwich</i> ; deteção por amperometria (HQ)	32 min	0,2 fg/mL	Amostras de vinho	[72]

* 8-SPCA/MBs – Array serigrafado, com 8 elétrodos de trabalho de carbono; CAb – Anticorpo captura; DPV – Voltametria diferencial de impulso; EDC – 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide; GCE – elétrodo de carbono vítreo; HQ – Hidroquinona; LSV – Voltametria de varrimento linear; MBs – Partículas magnéticas; NHS – N-hidroxissuccinimida; SPCE – elétrodo serigrafado de carbono; SPGE – elétrodo serigrafado de grafeno; SPPE – elétrodo serigrafado de platina; TMB – 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidine; n.r. – não reportada.

De acordo com os artigos reportados na literatura (publicados em revistas indexadas no Clarivate Web of Science) para a análise de alérgenos do ovo [67-72], verifica-se que até à data,

nenhum imunossensor eletroquímico para a detecção do alergénio ovotransferrina (Gal d 3) foi desenvolvido. Deste modo, esta dissertação apresenta pela primeira vez a construção de um imunossensor eletroquímico para a análise, detecção e quantificação de Gal d 3 em amostras alimentares. De acordo com as características analíticas sumariadas na Tabela 26, os estudos descritos são referentes aos alergénios ovomucóide (Gal d 1) e ovalbumina (Gal d 2), correspondentes a outros importantes alergénios do ovo, nomeadamente, da clara do ovo. Verifica-se que a vasta maioria dos trabalhos utiliza elétrodos serigrafados uma vez que são utilizados volumes reduzidos e sistemas miniaturizáveis e portáteis, com exceção de um único trabalho [69] que utiliza elétrodos convencionais e que por este motivo utiliza um maior volume de amostra/solução. Com exceção do presente trabalho, os restantes trabalhos utilizam nano/micro materiais o que torna o desenvolvimento da plataforma transdutora mais trabalhosa, demorada e mais cara uma vez que envolve reagentes e soluções adicionais para a sua preparação. Os ensaios apresentados são do tipo sandwich ou label-free, não existindo qualquer ensaio do tipo competitivo. Entre as técnicas eletroquímicas utilizadas destacam-se as voltamétricas e as amperométricas. O tempo total de ensaio do biossensor desenvolvido (30 min) é vantajoso sendo que com exceção dos trabalhos [70] e [72] que apresentam tempos (quase) iguais, todos os restantes necessitam de um tempo bastante superior. Apesar de o presente trabalho apresentar um limite de detecção mais elevado, é de referir que não existem outros imunossensores para a análise de Gal d 3, não sendo comparável o LOD obtido com os restantes trabalhos, uma vez que, cada alergénio apresenta características diferenciadas.

No presente trabalho foram analisadas 25 amostras alimentares, sendo este número consideravelmente superior comparativamente com os restantes trabalhos. Deste modo, foi possível avaliar um conjunto vasto de amostras que não contêm ovo, podem conter vestígios de ovo e contêm ovo.

5. Conclusão

As alergias alimentares são um problema de saúde pública que afeta entre 200 e 250 milhões de indivíduos a nível mundial. Por ser um dos principais alergénios alimentares que afeta uma elevada percentagem de população, a menção à presença/ausência de ovo em produtos alimentares tem particular relevância na legislação da UE. A confeção de sobremesas e doces portugueses implica a utilização de uma elevada quantidade de ovo, sendo que o alergénio ovotransferrina (Gal d 3) presente na clara de ovo apresenta uma prevalência de 12%. Assim, torna-se necessária a prevenção da ingestão de alimentos/produtos que apresentem ovo através de uma rotulagem eficaz dos mesmos.

O imunossensor amperométrico desenvolvido permitiu a análise e quantificação do Gal d 3. Para a construção deste sensor utilizou-se como transdutor elétrodos serigrafados de carbono sem qualquer nanoestruturação. O imunoenensaio realizado foi do tipo *sandwich*, sendo que este apresenta um tempo total de ensaio de 30 min, com um tempo de manuseio de aproximadamente 10 min e tempo de medição de 1 min. O sinal analítico foi obtido utilizando a cronoamperometria. Em condições experimentais otimizadas, verificou-se que a resposta linear do imunossensor se encontrava entre 55 e 1000 ng/mL, obtendo-se um limite de deteção de 16 ng/mL e um período de estabilidade de 20 dias (correspondente a 99,4% do sinal inicial).

Para a análise do alergénio Gal d 3 foram testados diversos produtos e/ou ingredientes alimentares, tais como, aqueles que não contêm ovo, os que contêm vestígios de ovo e os que contêm ovo. Para além destes, analisou-se o ovo inteiro e a clara do ovo em diferentes estados. Estes produtos encontram-se incluídos em grupos alimentícios diversificados, tais como: bolachas, snacks, biscoitos, sobremesas típicas, massas e caldos. Por fim, de forma a ser possível efetuar a validação do imunossensor desenvolvido, os respetivos produtos foram posteriormente analisados e quantificados pela técnica convencional ELISA.

Até à data, um imunossensor eletroquímico sem qualquer nanoestruturação do elétrodo serigrafado para a análise da ovotransferrina em produtos alimentares ainda não foi descrita na literatura, sendo esta descrita pela primeira vez nesta dissertação.

Comparativamente às técnicas convencionais, tais como, o ELISA, o imunossensor desenvolvido apresenta diversas vantagens, tais como: elevada sensibilidade, possibilidade de portabilidade e miniaturização, baixo custo e possibilidade que as análises possam ser efetuadas no local de amostragem.

O biossensor descrito permite a deteção de um alergénio do ovo em quantidades vestigiais, ou seja, permite analisar de forma precisa e exata amostras de produtos alimentares que apresentem no seu rótulo “pode conter vestígios de”.

Por fim, como perspectivas futuras, algumas sugestões de trabalhos a realizar são, por exemplo, o desenvolvimento de metodologias que sejam mais sustentáveis. Esta característica pode ser atingida através da realização/utilização de transdutores de papel, sendo que estes podem ser recicláveis e/ou biodegradáveis e apresentam baixo custo comparativamente aos transdutores tradicionais (comerciais). Para além disto, de forma a ser possível melhorar o sinal analítico e obter uma maior sensibilidade sugere-se a nanoestruturação do transdutor com, por exemplo, partículas magnéticas. Por outro lado, é possível utilizar anticorpos de deteção com diferentes conjugações (p.ex. biotina, avidina, etc.) que permitem assim a ligação da biomolécula a outros compostos (p. ex., quantum dots modificados com estreptavidina) e a outras enzimas (fosfatase alcalina) que após reação com um substrato adequado e um catião metálico permite obtenção de um sinal analítico mais elevado (reação metaloenzimática, utilizando como substrato o indoxil fosfato e nitrato de prata).

Para além destas sugestões, poder-se-ia testar o ensaio no formato *label-free* de modo a reduzir o tempo total de ensaio e a quantidade de biomoléculas necessárias. Outra alternativa, consiste no desenvolvimento de sensores molecularmente impressos (MIPs, do inglês *Molecularly Imprinted Polymers*) os quais permitem mimetizar o anticorpo, não necessitando desta biomolécula e a marca enzimática, contudo necessitam de etapas adicionais para a síntese do polímero impresso.

Referências Bibliográficas

1. Pawankar, R. Allergic Diseases and Asthma: A Global Public Health Concern and a Call to Action. *World Allergy Organ J* **2014**, *7*, doi:10.1186/1939-4551-7-12.
2. Five Things Science Tells Us about Food Allergens | FAO Stories | Food and Agriculture Organization of the United Nations Available online: <https://www.fao.org/fao-stories/article/en/c/1472294/> (accessed on 26 April 2022).
3. Loh, W.; Tang, M.L.K. The Epidemiology of Food Allergy in the Global Context. *Int J Environ Res Public Health* **2018**, *15*, doi:10.3390/IJERPH15092043.
4. Messina, M.; Venter, C. Recent Surveys on Food Allergy Prevalence. *Nutr Today* **2020**, *55*, 22–29, doi:10.1097/NT.0000000000000389.
5. Gendel, S.M. Comparison of International Food Allergen Labeling Regulations. *Regul Toxicol Pharmacol* **2012**, *63*, 279–285, doi:10.1016/J.YRTPH.2012.04.007.
6. Filho, W.R.; Scalco, M.F.; Pinto, J.A. Alergia à Proteína Do Leite de Vaca. *Revista Médica de Minas Gerais* **2014**, *24*, 374–380, doi:10.5935/2238-3182.20140105.
7. Campuzano, S.; Montiel, V.R.V.; Serafín, V.; Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J.M. Cutting-Edge Advances in Electrochemical Affinity Biosensing at Different Molecular Level of Emerging Food Allergens and Adulterants. *Biosensors 2020*, Vol. 10, Page 10 **2020**, *10*, 10, doi:10.3390/BIOS10020010.
8. Abrams, E.M.; Sicherer, S.H. Diagnosis and Management of Food Allergy. *CMAJ : Canadian Medical Association Journal* **2016**, *188*, 1087, doi:10.1503/CMAJ.160124.
9. Gallo, M.; Krisnawati, D.I.; Alimansur, M.; Atmojo, D.S.; Rahmawati, E.Q.; Rahayu, D.; Susilowati, E.; Kuo, T.-R. Food Allergies: Immunosensors and Management. *Applied Sciences 2022*, Vol. 12, Page 2393 **2022**, *12*, 2393, doi:10.3390/APP12052393.
10. Croote, D.; Quake, S.R. Food Allergen Detection by Mass Spectrometry: The Role of Systems Biology. *NPJ Syst Biol Appl* **2016**, *2*, doi:10.1038/NPJSBA.2016.22.
11. Jorge, A.; Soares, E.; Sarinho, E.; Lorente, F.; Gama, J.; Taborda-Barata, L. Prevalence and Clinical Features of Adverse Food Reactions in Portuguese Children. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* **2017**, *13*, 40, doi:10.1186/s13223-017-0212-y.
12. Lozoya-Ibáñez, C.; Morgado-Nunes, S.; Rodrigues, A.; Fernandes, P.; Lourenço, O.; Mafalda Fonseca, A.; Taborda-Barata, L. Prevalence and Clinical Features of Adverse Food Reactions in Portuguese Adolescents. *World Allergy Organization Journal* **2020**, *13*, 100453, doi:10.1016/J.WAOJOU.2020.100453.
13. Lozoya-Ibáñez, C.; Morgado-Nunes, S.; Rodrigues, A.; Lobo, C.; Taborda-Barata, L. Prevalence and Clinical Features of Adverse Food Reactions in Portuguese Adults. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology* **2016**, *12*, 1–10, doi:10.1186/S13223-016-0139-8/TABLES/1.

14. Monaci, L.; Visconti, A. Mass Spectrometry-Based Proteomics Methods for Analysis of Food Allergens. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2009**, *28*, 581–591, doi:10.1016/J.TRAC.2009.02.013.
15. Zhou, J.; Qi, Q.; Wang, C.; Qian, Y.; Liu, G.; Wang, Y.; Fu, L. Surface Plasmon Resonance (SPR) Biosensors for Food Allergen Detection in Food Matrices. **2019**, doi:10.1016/j.bios.2019.111449.
16. Gómez-Arribas, L.N.; Benito-Peña, E.; Hurtado-Sánchez, M. del C.; Moreno-Bondi, M.C. Biosensing Based on Nanoparticles for Food Allergens Detection. *Sensors* **2018**, *Vol. 18*, Page 1087 **2018**, *18*, 1087, doi:10.3390/S18041087.
17. Comissão Europeia (CE) Comunicações Das Instituições, Órgãos e Organismos Da União Europeia Available online: [https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:52017XC1213\(01\)&from=EN](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:52017XC1213(01)&from=EN) (accessed on 5 April 2022).
18. Comissão Europeia (CE) Directiva 2003/89/CE Do Parlamento Europeu e Do Conselho de 10 de Novembro de 2003 Que Altera a Directiva 2000/13/CE Relativamente à Indicação Dos Ingredientes Presentes Nos Géneros Alimentícios. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003L0089&from=EN> (accessed on 5 April 2022).
19. Comissão Europeia (CE) Directiva 2006/ /CE Da Comissão de 22 de Dezembro de 2006 Que Altera o Anexo III A Da Directiva 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 Available online: [https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006L0142R\(01\)&from=PT](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006L0142R(01)&from=PT) (accessed on 5 April 2022).
20. van Hengel, A.J. Food Allergen Detection Methods and the Challenge to Protect Food-Allergic Consumers. *Anal Bioanal Chem* **2007**, *389*, 111–118, doi:10.1007/S00216-007-1353-5/TABLES/1.
21. Comissão Europeia (CE) Regulamento (UE) N°1169/2011 Do Parlamento Europeu e Do Conselho de 25 de Outubro de 2011 Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:02011R1169-20180101&from=EN> (accessed on 5 April 2022).
22. Pádua, I.; Moreira, A.; Moreira, P.; Melo de Vasconcelos, F.; Barros, R. Impact of the Regulation (EU) 1169/2011: Allergen-Related Recalls in the Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) Portal. *Food Control* **2019**, *98*, 389–398, doi:10.1016/J.FOODCONT.2018.11.051.
23. Hugo da Silva Melo, V.; Isabel Maria Sousa Gomes Mafra Profª Doutora Maria Letícia Miranda Fernandes Estevinho Bragança, D. Detecção de Avelã Como Potencial Alergénio Em Chocolates Por Técnicas de Biologia Molecular. **2011**.
24. Marra, C.A.; Harvard, S.; Grubisic, M.; Galo, J.; Clarke, A.; Elliott, S.; Lynd, L.D. Consumer Preferences for Food Allergen Labeling. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology* **2017**, *13*, doi:10.1186/S13223-017-0189-6.

25. Planque, M.; Arnould, T.; Gillard, N. Food Allergen Analysis: Detection, Quantification and Validation by Mass Spectrometry. *Allergen* **2017**, doi:10.5772/INTECHOPEN.69361.
26. Miranda, J.M.; Anton, X.; Redondo-Valbuena, C.; Roca-Saavedra, P.; Rodriguez, J.A.; Lamas, A.; Franco, C.M.; Cepeda, A. Egg and Egg-Derived Foods: Effects on Human Health and Use as Functional Foods. *Nutrients* **2015**, *7*, 706, doi:10.3390/NU7010706.
27. Rupa, P.; Mine, Y. Egg Proteins. *Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease* **2005**, 445–459, doi:10.1533/9780857093639.150.
28. Gracia, A.; Albisu, L.M. Food Consumption in the European Union: Main Determinants and Country Differences. *Agribusiness* **2001**, *17*, 469–488, doi:10.1002/AGR.1030.
29. Hoffman, J.R.; Falvo, M.J. *PROTEIN-WHICH IS BEST?*; Las, 2004; Vol. 3;.
30. Zeidler, G. Quality and Functionality of Egg Products. *Commercial Chicken Meat and Egg Production* **2002**, 1219–1228, doi:10.1007/978-1-4615-0811-3_61.
31. International Union of Immunological Societies (IUIS) Gallus Domesticus (G. Gallus) (Chicken) Available online: [http://www.allergen.org/search.php?Species=Gallus%20domesticus%20\(G.%20gallus\)](http://www.allergen.org/search.php?Species=Gallus%20domesticus%20(G.%20gallus)) (accessed on 9 April 2022).
32. Caubet, J.-C.; Wang, J. Current Understanding of Egg Allergy., doi:10.1016/j.pcl.2011.02.014.
33. Montiel, V.R.V.; Torrente-Rodríguez, R.M.; Campuzano, S.; Pellicanò, A.; Reviejo, Á.J.; Cosio, M.S.; Pingarrón, J.M. Simultaneous Determination of the Main Peanut Allergens in Foods Using Disposable Amperometric Magnetic Beads-Based Immunosensing Platforms. *Chemosensors 2016, Vol. 4, Page 11* **2016**, *4*, 11, doi:10.3390/CHEMOSENSORS4030011.
34. Angulo-Ibáñez, A.; Eletxigerra, U.; Lasheras, X.; Campuzano, S.; Merino, S. Electrochemical Tropomyosin Allergen Immunosensor for Complex Food Matrix Analysis. *Anal Chim Acta* **2019**, *1079*, 94–102, doi:10.1016/J.ACA.2019.06.030.
35. Alves, R.C.; Barroso, M.F.; González-García, M.B.; Oliveira, M.B.P.P.; Delerue-Matos, C. New Trends in Food Allergens Detection: Toward Biosensing Strategies. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2016**, *56*, 2304–2319, doi:10.1080/10408398.2013.831026.
36. Hua, Z.; Yu, T.; Liu, D.; Xianyu, Y. Recent Advances in Gold Nanoparticles-Based Biosensors for Food Safety Detection. *Biosens Bioelectron* **2021**, *179*, 113076, doi:10.1016/J.BIOS.2021.113076.
37. Vasilescu, A.; Nunes, G.; Hayat, A.; Latif, U.; Marty, J.L. Electrochemical Affinity Biosensors Based on Disposable Screen-Printed Electrodes for Detection of Food Allergens. *Sensors (Basel)* **2016**, *16*, doi:10.3390/S16111863.
38. Liu, A.; Anfossi, L.; Shen, L.; Li, C.; Wang, X. Non-Competitive Immunoassay for Low-Molecular-Weight Contaminant Detection in Food, Feed and Agricultural Products: A Mini-Review. **2017**, doi:10.1016/j.tifs.2017.11.014.
39. Baumert, J.L. Detecting and Measuring Allergens in Food. *Risk Management for Food Allergy* **2013**, 215–226, doi:10.1016/B978-0-12-381988-8.00013-0.

40. Hunter O Lin Lateral Flow-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay as a Point-of-Care Technique to Predict Type I Reversal Reactions in Lepromatous Patients. *BIOLOGY IN SOUTH INDIA* **2016**.
41. Bhalla, N.; Jolly, P.; Formisano, N.; Estrela, P. Introduction to Biosensors. *Essays Biochem* **2016**, 60–61, doi:10.1042/EBC20150001.
42. Kucherenko, I.S.; Soldatkin, O.O.; Dzyadevych, S. v.; Soldatkin, A.P. Electrochemical Biosensors Based on Multienzyme Systems: Main Groups, Advantages and Limitations – A Review. *Anal Chim Acta* **2020**, 1111, 114–131, doi:10.1016/J.ACA.2020.03.034.
43. Asal, M.; Özen, Ö.; Şahinler, M.; Polatoğlu, İ. Recent Developments in Enzyme, DNA and Immuno-Based Biosensors. *Sensors 2018, Vol. 18, Page 1924* **2018**, 18, 1924, doi:10.3390/S18061924.
44. Mehrvar, M.; Abdi, M. Recent Developments, Characteristics, and Potential Applications of Electrochemical Biosensors. *Analytical Sciences* **2004**, 20, 1113–1126, doi:10.2116/ANALSCI.20.1113.
45. Korotkaya, E. v STANDARDIZATION, CERTIFICATION, QUALITY, AND SAFETY BIOSENSORS: DESIGN, CLASSIFICATION, AND APPLICATIONS IN THE FOOD INDUSTRY. **2014**, 2, doi:10.12737/5476.
46. Patel, P.D. (Bio)Sensors for Measurement of Analytes Implicated in Food Safety: A Review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2002**, 21, 96–115, doi:10.1016/S0165-9936(01)00136-4.
47. Naresh, V.; Lee, N. A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. *Sensors 2021, Vol. 21, Page 1109* **2021**, 21, 1109, doi:10.3390/S21041109.
48. Curulli, A. Molecules Electrochemical Biosensors in Food Safety: Challenges and Perspectives. **2021**, doi:10.3390/molecules26102940.
49. Menon, S.; Mathew, M.R.; Sam, S.; Keerthi, K.; Kumar, K.G. Recent Advances and Challenges in Electrochemical Biosensors for Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2020**, 878, 114596, doi:10.1016/J.JELECHEM.2020.114596.
50. Cho, I.H.; Kim, D.H.; Park, S. Electrochemical Biosensors: Perspective on Functional Nanomaterials for on-Site Analysis. *Biomaterials Research 2020 24:1* **2020**, 24, 1–12, doi:10.1186/S40824-019-0181-Y.
51. Sheng, K.; Jiang, H.; Fang, Y.; Wang, L.; Jiang, D. Emerging Electrochemical Biosensing Approaches for Detection of Allergen in Food Samples: A Review. *Trends Food Sci Technol* **2022**, 121, 93–104, doi:10.1016/J.TIFS.2022.01.033.
52. Felix, F.S.; Angnes, L. Electrochemical Immunosensors – A Powerful Tool for Analytical Applications. *Biosens Bioelectron* **2018**, 102, 470–478, doi:10.1016/J.BIOS.2017.11.029.
53. Mistry, K.K.; Layek, K.; Mahapatra, A.; RoyChaudhuri, C.; Saha, H. A Review on Amperometric-Type Immunosensors Based on Screen-Printed Electrodes. *Analyst* **2014**, 139, 2289–2311, doi:10.1039/C3AN02050A.

54. Kim, J.; Park, M. Recent Progress in Electrochemical Immunosensors. *Biosensors (Basel)* **2021**, *11*, doi:10.3390/BIOS11100360.
55. Vondrák, J. Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications. *Surface Technology* **1983**, *20*, 91–92, doi:10.1016/0376-4583(83)90080-8.
56. Beitollahi, H.; Mohammadi, S.Z.; Safaei, M.; Tajik, S. Applications of Electrochemical Sensors and Biosensors Based on Modified Screen-Printed Electrodes: A Review. *Analytical Methods* **2020**, *12*, 1547–1560, doi:10.1039/C9AY02598G.
57. Kuberský, P.; Navrátil, J.; Syrový, T.; Sedlák, P.; Nešpůrek, S.; Hamáček, A. An Electrochemical Amperometric Ethylene Sensor with Solid Polymer Electrolyte Based on Ionic Liquid. *Sensors (Switzerland)* **2021**, *21*, 1–14, doi:10.3390/S21030711.
58. Menon, S.; Mathew, M.R.; Sam, S.; Keerthi, K.; Kumar, K.G. Recent Advances and Challenges in Electrochemical Biosensors for Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2020**, *878*, 114596, doi:10.1016/J.JELECHEM.2020.114596.
59. Miura, D.; Asano, R. Biosensors: Immunosensors. *Reference Module in Biomedical Sciences* **2021**, doi:10.1016/B978-0-12-822548-6.00008-X.
60. Shah, N.; Arain, M.B.; Soylak, M. Historical Background: Milestones in the Field of Development of Analytical Instrumentation. *New Generation Green Solvents for Separation and Preconcentration of Organic and Inorganic Species* **2020**, 45–73, doi:10.1016/B978-0-12-818569-8.00002-4.
61. Thévenot, D.R.; Toth, K.; Durst, R.A.; Wilson, G.S. Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification. *Biosens Bioelectron* **2001**, *16*, 121–131, doi:10.1016/S0956-5663(01)00115-4.
62. Franklin, R.K.; Martin, S.M.; Strong, T.D.; Brown, R.B. Chemical and Biological Systems: Chemical Sensing Systems for Liquids. *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering* **2016**, doi:10.1016/B978-0-12-803581-8.00549-X.
63. Grieshaber, D.; Mackenzie, R.; Vörös, J.; Reimhult, E. Electrochemical Biosensors-Sensor Principles and Architectures. *Sensors* **2008**, *8*, 1400–1458.
64. Allen J. Bard, L.R.F. *Electrochemical Methods Fundamentals of Electrochemistry.*; 2nd ed.; John Wiley & Sons, Inc. : New York, USA., 2001;
65. Neves, M.M.P.S.; Nouws, H.P.A.; Delerue-Matos, C.; Martín-Yerga, D. Electrochemical Detection and Characterization of Nanoparticles: A Potential Tool for Environmental Purposes. *Curr Opin Electrochem* **2020**, *22*, 58–64, doi:10.1016/J.COEELEC.2020.04.007.
66. Antuña-Jiménez, D.; González-García, M.B.; Hernández-Santos, D.; Fanjul-Bolado, P. Screen-Printed Electrodes Modified with Metal Nanoparticles for Small Molecule Sensing. *Biosensors 2020, Vol. 10, Page 9* **2020**, *10*, 9, doi:10.3390/BIOS10020009.
67. Eissa, S.; L'Hocine, L.; Siaj, M.; Zourob, M. A Graphene-Based Label-Free Voltammetric Immunosensor for Sensitive Detection of the Egg Allergen Ovalbumin. *Analyst* **2013**, *138*, 4378–4384, doi:10.1039/C3AN36883A.

68. Čadková, M.; Metelka, R.; Holubová, L.; Horák, D.; Dvořáková, V.; Bílková, Z.; Korecká, L. Magnetic Beads-Based Electrochemical Immunosensor for Monitoring Allergenic Food Proteins. *Anal Biochem* **2015**, *484*, 4–8, doi:10.1016/J.AB.2015.04.037.
69. Sugawara, K.; Kuramitz, H.; Shinohara, H. Fabrication of Micromagnetic Beads with Molecular Recognition/Electron-Transfer Peptides for the Sensing of Ovalbumin. *Anal Chim Acta* **2017**, *958*, 30–37, doi:10.1016/J.ACA.2016.12.028.
70. Benedé, S.; Ruiz-Valdepeñas Montiel, V.; Povedano, E.; Villalba, M.; Mata, L.; Galán-Malo, P.; Torrente-Rodríguez, R.M.; Vargas, E.; Reviejo, A.J.; Campuzano, S.; et al. Fast Amperometric Immunoplatform for Ovomuroid Traces Determination in Fresh and Baked Foods. *Sens Actuators B Chem* **2018**, *265*, 421–428, doi:10.1016/J.SNB.2018.03.075.
71. Mohamad, A.; Rizwan, M.; Keasberry, N.A.; Ahmed, M.U. Fabrication of Label-Free Electrochemical Food Biosensor for the Sensitive Detection of Ovalbumin on Nanocomposite-Modified Graphene Electrode. *Biointerface Res Appl Chem* **2019**, *9*, 4655–4662, doi:10.33263/BRIAC96.655662.
72. Baldo, T.A.; Proença, C. dos A.; Felix, F. da S.; Freitas, T.A.; Sakata, S.K.; Angnes, L.; Faria, R.C. Disposable Electrochemical Microfluidic Device for Ultrasensitive Detection of Egg Allergen in Wine Samples. *Talanta* **2021**, *232*, doi:10.1016/J.TALANTA.2021.122447.
73. Wagner, L.-M.; Pilecky, M.; Mazza, G.; Preininger, C.; Brandl, M. Simulation and Performance Optimization of an Amperometric Histamine Detection System. **2018**, *853*, doi:10.3390/PROCEEDINGS2130853.
74. Freitas, M.; Carvalho, A.; Nouws, H.P.A.; Delerue-Matos, C. Tracking Arachis Hypogaea Allergen in Pre-Packaged Foodstuff: A Nanodiamond-Based Electrochemical Biosensing Approach. **2022**, doi:10.3390/bios12060429.
75. Freitas, M.; Nouws, H.P.A.; Delerue-Matos, C. Electrochemical Sensing Platforms for HER2-ECD Breast Cancer Biomarker Detection. *Electroanalysis* **2019**, *31*, 121–128, doi:10.1002/ELAN.201800537.
76. Freitas, M.; Neves, M.M.P.S.; Nouws, H.P.A.; Delerue-Matos, C. Quantum Dots as Nanolabels for Breast Cancer Biomarker HER2-ECD Analysis in Human Serum. *Talanta* **2020**, *208*, 120430, doi:10.1016/J.TALANTA.2019.120430.
77. Grupo de interesse de Alergia a Alimentos da SPAIC Alergia Alimentar: Conceitos, Conselhos e Precauções. 2ª Edição - Editores: Célia Costa, Sara Prates, Isabel Carrapatoso (accessed on 2 September 2022).