



Desenvolvimento de um sensor eletroquímico molecularmente impresso para análise de um alergénio do aipo

SARA CATARINA MARTINHO TEIXEIRA

Outubro de 2022

P.PORTO



**Desenvolvimento de um sensor eletroquímico
molecularmente impresso para a análise de um
alergénio do aipo**

Sara Catarina Martinho Teixeira

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientação:

Doutor Hendrikus Nouws

Doutor João Pacheco

outubro de 2022

Agradecimentos

Após a realização deste projeto de investigação no GRAQ, não posso deixar de agradecer àqueles que de alguma forma me ajudaram a concretizar e finalizar este trabalho.

Ao doutor João Pacheco, um obrigada pela sua disponibilidade, paciência e dedicação a este projeto durante todos estes meses, mas também por todo o conhecimento que conseguiu transmitir-me com clareza.

Ao doutor Hendrikus Nouws, um obrigada por toda a orientação e acompanhamento que me foi dado e por tornar a execução deste trabalho possível. Trabalho este que 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 alérgenos 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.

Quero também agradecer aos restantes elementos do GRAQ, por todos os dias me receberem com simpatia e estarem dispostos a ajudar quando necessário.

Por fim, um obrigada à minha família e amigos por sempre me apoiarem e incentivarem na conclusão desta etapa da minha vida. A eles dedico todo o meu esforço e trabalho.



Resumo

Atualmente, as alergias alimentares constituem um problema de saúde crescente. O aumento significativo de casos é motivo para estudos tanto para diagnóstico como para a análise de alérgenos em produtos alimentares. A legislação da UE exige que a presença dos principais alérgenos seja indicada nos rótulos dos alimentos para garantir um elevado nível de defesa do consumidor. Assim, são necessários métodos analíticos que, na sua grande maioria, são dispendiosos e com tempos de análise longos. Os sensores eletroquímicos têm sido propostos como alternativos promissores para estas análises uma vez que são baratos, portáteis, de fácil utilização, fornecendo resultados precisos e exatos num curto espaço de tempo.

Neste trabalho foi desenvolvido um sensor eletroquímico molecularmente impresso para a análise de Api g1, uma das principais proteínas do aipo que causa reações alérgicas. O transdutor utilizado foi um elétrodo serigrafado de carbono (*SPCE, Screen-printed Carbon Electrode*), modificado com nanopartículas de ouro. O polímero molecularmente impresso (*MIP, Molecularly Imprinted Polymer*) foi sintetizado diretamente na superfície do SPCE através da eletropolimerização, por voltametria cíclica, de o-fenilenediamina na presença do alérgeno. Após a extração da Api g1, o sensor MIP foi incubado com uma solução do alérgeno e uma vez que este não é eletroativo, foi utilizado o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ para a análise (indireta).

Estabeleceu-se uma relação linear entre a diferença da intensidade de corrente após a extração e após a incubação com a proteína (Δi_p) e o logaritmo da concentração de proteína entre 0 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A precisão dos resultados, em termos de repetibilidade, não foi satisfatória uma vez que se obteve um coeficiente de variação de 15%.

Palavras-chave: Alergias alimentares; Alérgeno alimentar; Api g1; Sensor eletroquímico; Voltametria; Elétrodo serigrafado; Polímero Molecularmente Impresso.

Abstract

Nowadays food allergies are a growing health problem. The significant increase of incidences is reason for studies both for diagnosis and for the analysis of allergens in food products. EU legislation requires that the presence of major allergens must be indicated on food labels to ensure a high level of consumer protection. Therefore, analytical methods are required, which, generally, are expensive and have long analysis times. Electrochemical sensors have been proposed as promising alternatives for this purpose since they are cheap, fast, portable, easy to use, and provide precise and accurate results.

In this work, a molecularly imprinted electrochemical sensor was developed for the analysis of Api g1, one of the main celery proteins that causes allergic reactions. The transducer was a screen-printed carbon electrode (SPCE), modified with gold nanoparticles. The molecularly imprinted polymer (MIP) was synthesized directly on the surface of the SPCE through electropolymerization, by cyclic voltammetry, of o-phenylenediamine in the presence of the allergen. After extracting Api g1, the MIP sensor was incubated with a solution of the allergen and since it is not electroactive, the redox pair $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ was used for the (indirect) analysis.

A linear relationship was established between the difference in current intensity after extraction and after incubation with the protein (Δi_p) and the logarithm of the protein concentration between 0 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The precision of the results, in terms of repeatability, was not satisfactory because the obtained coefficient of variation was 15%.

Keywords: Food allergies; Food allergen; Api g1; Electrochemical sensor; Voltammetry; Screen-printed electrode; Molecularly Imprinted Polymer.

Índice

Agradecimentos	I
Resumo	III
Abstract.....	V
Lista de Figuras.....	IX
Lista de Abreviaturas	X
1. Introdução	1
1.1. Enquadramento	2
1.2. Objetivos	2
1.3. Motivação	2
1.4. Grupo de Reação e Análises Químicas (GRAQ).....	3
1.5. Organização do relatório.....	3
2. Fundamentos teóricos	4
2.1. Alergias alimentares.....	4
2.1.1. Mecanismos das reações alérgicas alimentares	5
2.1.2. Sintomas.....	5
2.1.3. Diagnóstico	6
2.1.4. Potenciais tratamentos	8
2.1.5. Prevenção.....	10
2.2. Alergénios alimentares.....	10
2.2.1. Api g1.....	11
2.3. Sensores eletroquímicos.....	12
2.4. Métodos eletroquímicos.....	13
2.4.1. Potenciometria	14
2.4.2. Amperometria	14
2.4.3. Coulometria.....	14

2.4.4. Voltametria	15
2.5. Eléttodos serigrafados	17
2.6. Polímeros Molecularmente Impressos	19
3. Materiais e Métodos.....	22
3.1. Reagentes	22
3.2. Soluções	22
3.3. Equipamento	23
3.4. Preparação do Polímero Molecularmente Impresso	23
3.5. Medições eletroquímicas	24
4. Resultados e Discussão	25
4.1. Síntese do MIP	27
4.1.1. Otimização das condições de polimerização	29
4.1.2. Concentração de o-fenilenodiamina	29
4.1.3. Concentração de Api g 1	30
4.1.4. Número de ciclos	32
4.1.5. Solvente de extração	32
4.1.6. Tempo de extração	33
4.1.7. Tempo de incubação	34
4.2. Caraterização do sensor	35
4.3. Avaliação da performance analítica do sensor.....	37
5. Conclusões e Sugestões para trabalhos futuros	39
Referências.....	41

Lista de Figuras

Figura 1 – Diagrama de um sensor eletroquímico [22]	13
Figura 2 – Potencial aplicado em função do tempo em voltametria cíclica (CV) [22]	16
Figura 3 – Diagrama da aplicação de pulsos na técnica de voltametria de impulso diferencial (DPV) [22].	17
Figura 4 – Eléctrodo serigrafado de carbono (Metrohm-DropSense) [33]	18
Figura 5 – Esquema da impressão molecular [38]	20
Figura 6 – Esquema de construção e funcionamento de um sensor MIP e o seu funcionamento. Adaptado de Pacheco, J. 2017	26
Figura 7 – Voltamogramas registados durante a polimerização por CV. A) Voltamograma da polimerização de um MIP; B) Voltamograma da polimerização de um NIP; C) Primeiro ciclo de polimerização de um MIP e de um NIP	28
Figura 8 – Resultados obtidos na otimização da concentração de o-fenilenodiamina na síntese do MIP	30
Figura 9 – Resultados obtidos na concentração de Api g1 na síntese do MIP	31
Figura 10 – Resultados obtidos na otimização do número de ciclos na síntese do MIP	32
Figura 11 – Resultados obtidos na otimização dos solventes de extração na síntese do MIP	33
Figura 12 – Resultados obtidos na otimização do tempo de extração	34
Figura 13 – Resultados obtidos na otimização do tempo de incubação	35
Figura 14 – Caraterização de cada etapa de construção e funcionamento do sensor MIP	36
Figura 15 – (A) Valores de Δip obtidas para concentrações entre 0 e 500 μ g/mL; (B) Reta de calibração do sensor MIP	38

Lista de Abreviaturas

BAT	Teste de ativação de basófilos (<i>Basophil Activation Test</i>)
CE	Eléctrodo de contagem (<i>Counter Electrode</i>)
CRD	Diagnóstico resolvido por componentes (<i>Component Resolved Diagnosis</i>)
CEQUP	Centro de Química da Universidade do Porto
CV	Voltametria cíclica (<i>Cyclic Voltammetry</i>)
DPV	Voltametria de pulso diferencial (<i>Differential Pulse Voltammetry</i>)
DFI	Departamento de Física
EPIT	Imunoterapia epicutânea (<i>Epicutaneous Immunotherapy</i>)
FAIT	Imunoterapia para a alergia alimentar (<i>Food Allergy Immunotherapy</i>)
GRAQ	Grupo de Reações e Análises Químicas
H1	Histamina 1 (<i>Histamine 1</i>)
H2	Histamina 2 (<i>Histamine 2</i>)
IgA	Imunoglobulina A (<i>Immunoglobulin A</i>)
IgE	Imunoglobulina E (<i>Immunoglobulin E</i>)
IgG	Imunoglobulina G (<i>Immunoglobulin G</i>)
IgM	Imunoglobulina M (<i>Immunoglobulin M</i>)
ISEP	Instituto Superior de Engenharia do Porto
kDa	Kidodalton
LAQV	Laboratório Associado para a Química Verde
MIP	Polímero molecularmente impresso (<i>Molecularly Imprinted Polymer</i>)
NIP	Polímero não impresso (<i>Non Imprinted Polymer</i>)
OIT	Imunoterapia oral (<i>Oral Immunotherapy</i>)
OFC	Desafio alimentar oral (oral food challenge)
RE	Eléctrodo de referência (<i>Reference electrode</i>)
REQUIMTE	Rede de Química e Tecnologia
SPE	Eléctrodos serigrafados (<i>Screen-printed electrodes</i>)
SLIT	Imunoterapia sublingual (<i>Sublingual Immunotherapy</i>)
SWV	Voltametria de onda quadrada (<i>Square Wave voltammetry</i>)
WE	Eléctrodo de trabalho (<i>Working electrode</i>)

1. Introdução

As alergias alimentares estão a tornar-se um grave problema de saúde pública em todo o mundo, estando associado a uma morbilidade considerável, a um nível de mortalidade não negligenciável e à menor qualidade de vida. Assim, é evidente o impacto destas alergias nos hábitos alimentares e na integração social dos alérgicos alimentares [1].

Estima-se que cerca de 25% da população mundial tenha tido, pelo menos, um episódio de uma reação adversa a qualquer alimento. Já que os alimentos alérgicos variam de acordo com as práticas alimentares e a disponibilidade dos mesmos, é de esperar que a sensibilização da população a certos alimentos seja diferente de continente para continente. Assim, enquanto a alergia ao amendoim e às nozes é mais frequente nos EUA, as reações ao peixe e ao marisco têm maior incidência em Portugal e Espanha.

Nwaru et al., referiram que a prevalência global de alergia alimentar na Europa foi de 17,3% [2].

Embora qualquer tipo de alimento possa causar alergia, a *European Food Safety Authority* menciona que aproximadamente 75% das reações alérgicas entre crianças são devidas ao ovo, ao amendoim, ao leite de vaca, ao peixe e aos frutos secos e que cerca de 50% das reações alérgicas em adultos devem-se a frutos do grupo látex - “*Latex-fruit syndrome*”, a frutos da família das Rosáceas (amoras, morangos, framboesas), a frutos secos e a vegetais da família *Apiaceae* (como o aipo) [3].

O aipo contém 7 alérgenos desde o Api g1 ao Api g7 [4], existindo uma grande diversidade de produtos que o possam conter. Assim, há uma preocupação crescente na presença de aipo em alimentos ou produtos que não indicam essa existência, em consequência de uma reação anafilática ou até mesmo morte de um indivíduo alérgico a este alimento.

Nos últimos anos, os sensores MIPs têm sido muito estudados e têm gerado muito interesse na comunidade científica uma vez que oferecem a especificidade e seletividade dos recetores biológicos com as vantagens de serem duráveis em relação às condições ambientais e de baixo custo [5]. Estes têm como propósito o reconhecimento da proteína em estudo.

Sendo assim, o principal objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um sensor molecularmente impresso para a quantificação do alérgeno alimentar Api g1, o aipo.

1.1. Enquadramento

Com o propósito de estudar uma forma diversificada de deteção de alergénios com interesse para a comunidade em geral, desenvolveu-se um projeto de investigação no âmbito da unidade curricular Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica, pertencente ao Departamento de Física (DFI) do Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP). Este projeto foi realizado no laboratório de eletroquímica do Grupo de Reação e Análises Químicas (GRAQ), sob o acompanhamento do professor Hendrikus Nouws (ISEP) e do investigador João Pacheco (REQUIMTE/LAQV).

1.2. Objetivos

O objetivo deste projeto foi o desenvolvimento de um sensor eletroquímico para a deteção da proteína alergénica do aipo, Api g1. Com esta finalidade, recorreu-se a elétrodos serigrafados impressos e não impressos molecularmente e a técnicas de voltametria para quantificação do alergénio alimentar. Este objetivo foi cumprido com o auxílio dos orientadores e restantes colegas do GRAQ.

1.3. Motivação

O tema desta dissertação é de elevado interesse para a indústria alimentar devido ao impacto que os alergénios alimentares têm na sociedade. Deste modo, torna-se necessário para a esta indústria dispor de métodos analíticos para cumprir a legislação. No entanto, a maioria destes métodos são dispendiosos (i.e., requerem equipamentos de elevados custos de aquisição e manutenção, e operadores qualificados) e o tempo de análise é geralmente longo. Assim, os sensores eletroquímicos têm sido propostos e cada vez mais desenvolvidos com o intuito de contornar alguns destes problemas, uma vez que são mais resistentes a variações físicas e químicas, têm custos mais reduzidos, são portáteis e de fácil utilização e fornecem resultados precisos e exatos num curto espaço de tempo. Desta forma, pretendeu-se com este trabalho obter uma alternativa para a análise de um alergénio alimentar.

1.4. Grupo de Reação e Análises Químicas (GRAQ)

O GRAQ consiste numa equipa pluridisciplinar de investigadores cujo intuito é a investigação no domínio da Engenharia Química e da Química Verde, contribuindo para a criação, aplicação e divulgação de conhecimento e promoção da inovação. Este existe desde janeiro de 1999, sendo um grupo com autonomia científica e financeira incorporado no Centro de Química da Universidade do Porto (CEQUP). Já em novembro de 2001, passou a pertencer à Rede de Química e Tecnologia (REQUIMTE), integrando-se no Laboratório Associado para a Química Verde (LAQV) [6].

A REQUIMTE foi formalmente constituída em janeiro de 2003, como sendo uma organização sem fins lucrativos, em parceria das Universidades do Porto e da Nova Lisboa. Esta resulta de uma colaboração de muitos anos nas áreas da Química, Bioquímica, Engenharia Química e Biotecnologia, Farmacologia e Ciência e Tecnologia Alimentar. Em novembro de 2001, esta rede foi oficialmente reconhecida pelo Ministro da Ciência e Ensino Superior de Portugal, como anfitriã de um Centro de Excelência em Investigação em Química Verde, o Laboratório Associado para a Química Verde [7].

1.5. Organização do relatório

Este relatório está dividido em 5 capítulos, o primeiro que aborda a introdução, o segundo consiste nos fundamentos e conceitos teóricos sobre o tema em estudo, os materiais e os métodos utilizados na execução do trabalho incluem-se no terceiro, a quarta secção apresenta os resultados obtidos e a discussão dos mesmos e, por fim, o quinto capítulo engloba a conclusão e as propostas para trabalhos futuros.

2. Fundamentos teóricos

Neste capítulo serão apresentados alguns conceitos e as suas definições, mas também os fundamentos teóricos essenciais para a percepção e enquadramento do tema estudado.

2.1. Alergias alimentares

O consumo de alimentos é uma das principais atividades da vida humana. Os ingredientes amplamente tolerados pela população em geral podem não ser bem tolerados por algumas pessoas. Esta situação específica traz consequências muito graves, por vezes pondo em risco a vida humana [8]. Assim, introduz-se o termo alergia alimentar, que é muito comum em todo o mundo e está a tornar-se um grande problema de saúde pública [9]. A alergia alimentar é definida como uma reação adversa a um antigénio alimentar específico, causada pelo anticorpo da imunoglobulina E (IgE) [10], que é mediada por mecanismos imunológicos e surge num indivíduo suscetível a esse alergénio específico [9], [11]. Esta difere dos diversos efeitos causados por toxinas ou patogénicos contidos no alimento, assim como das chamadas intolerâncias alimentares, que apresentam os mesmos sintomas, mas reconhecem mecanismos patogénicos diferentes [11].

Estima-se que mais de 220 milhões de pessoas em todo o mundo sofram de alergias aos alimentos, sendo que estas alergias afetam cerca de 2 a 5% dos adultos e 6 a 10% das crianças [9], [10]. Apesar de, por muito tempo, ser apelidada de uma doença exclusivamente pediátrica, houve uma alteração na epidemiologia da mesma com um aumento crescente em idade avançada. Esse aumento deve-se ao crescimento da população idosa, principalmente nos países ocidentais, às mudanças ambientais e ao estilo de vida da população [9]. Contudo, as taxas de alergia alimentar variam de acordo com vários fatores, como por exemplo, a melhoria da higiene, a composição microbiana intestinal, a exposição química ambiental, o estilo de vida, a dieta e a nutrição. Estes são vistos como fatores responsáveis pelo aumento da patologia alérgica nas populações ocidentais e são designados de ambientais [8], [11], [12]. Também os fatores genéticos como a predisposição genética de um indivíduo, o grau de exposição ao alimento e as características moleculares do alergénio, influenciam na ocorrência destas alergias, sendo estes a maior causa do desenvolvimento das mesmas [8]. O crescimento exponencial da

alergia alimentar e a significativa variabilidade da distribuição geográfica são resultado da influência de fatores ambientais e dos estilos de vida na predisposição genética [9].

2.1.1. Mecanismos das reações alérgicas alimentares

O que distingue a alergia alimentar de outras reações adversas aos alimentos é, portanto, o mecanismo patogénico subjacente. Com base na imunopatogénese específica é possível distinguir os alergénios mediados por imunoglobulina E (IgE), reações não mediadas por IgE e reações mistas a alimentos [9]. Se o alimento nocivo desencadeia a resposta imune anormal, os anticorpos IgE estão envolvidos e os sintomas clínicos ocorrem logo após a ingestão do alimento ou num curto período de tempo. Já a resposta imune adversa induzida por alimentos pode ser um sinal de outros mecanismos patogénicos de reação alérgica, quando as outras células imunologicamente competentes estão envolvidas. Devido ao mecanismo patogénico dessas reações, elas são descritas como independentes de IgE [8].

Os indivíduos saudáveis, sem alergia alimentar frequente, apresentam baixas concentrações de anticorpos IgG, IgM e IgA específicos de alimentos. Sendo que os anticorpos IgG específicos para proteínas alimentares tendem a aumentar nos primeiros meses após a introdução de um alimento e, em seguida, geralmente diminuem, mesmo que a proteína alimentar continue a ser ingerida. Assim, sujeitos com vários distúrbios inflamatórios intestinais, um dos quais alergia alimentar, frequentemente apresentam níveis elevados de anticorpos IgG e IgM específicos de alimentos, mas não há evidências de que esses anticorpos sejam patogénicos [12].

2.1.2. Sintomas

As manifestações clínicas da alergia alimentar podem afetar vários órgãos e sistemas, incluindo pele, intestino e sistema respiratório, cardiovascular e nervoso. Além disso, os sintomas interligam-se de forma variada, dando origem a quadros complexos de doenças [9].

Recentemente, foi proposta uma classificação clínico-patogenética, na qual são reconhecidos diferentes fenótipos e endótipos, que partilham um grau razoável de

sobreposição. As expressões clínicas são extremamente variáveis, desde manifestações leves e localizadas de hipersensibilidade a alimentos, como por exemplo, a urticária, até reações graves, sistêmicas e muitas vezes fatais, como é o caso da anafilaxia, sendo esta uma reação aguda que afeta dois ou mais sistemas orgânicos que podem ser fatais [9], [11]. Estas manifestações podem tornar-se mais ou menos graves conforme os fatores ambientais associados. O exercício, o álcool e as infecções são alguns desses fatores que podem favorecer o desencadeamento de uma alergia alimentar e a gravidade da sua manifestação clínica [9].

Assim, esta doença do foro alimentar pode ser dividida em dois tipos: a alergia alimentar de reação imediata e a de reação tardia. Na de reação imediata, os sintomas ocorrem dentro de alguns instantes após o consumo do alimento, sendo o caso da anafilaxia, da urticária e do edema angioneurótico. Já a de reação tardia, os sintomas aparecem algumas horas e até alguns dias após a ingestão do alimento, como por exemplo, a fadiga, a insónia, a indigestão, as cólicas e a diarreia. Neste último caso, torna-se mais difícil determinar qual o alimento que causa a alergia.

Dentro dos sintomas supracitados, esta doença pode manifestar uma ampla gama de indícios considerados os mais comuns, como o aparecimento de comichão nos lábios ou na língua, vômitos repetidos e diarreia frequente ou urticária. Já a dor, rigidez e laceração muscular do ombro, pescoço e costas, que podem ocorrer com dor de cabeça e os distúrbios psiquiátricos como, por exemplo, o nervosismo, a ansiedade e a depressão, são indicadores comuns em indivíduos alérgicos, podendo prevalecer durante dias a semanas [8].

2.1.3. Diagnóstico

Para que o diagnóstico da doença seja amplo, requer-se uma avaliação completa e um exame físico, com a finalidade de determinar possíveis alimentos desencadeantes e uma base fisiopatológica geral, isto se, especificamente, o distúrbio alérgico induzido por alimentos for mediado por IgE, o que orienta o exame. Esta avaliação tem em conta a determinação do possível alimento ou dos alimentos causais, a quantidade ingerida, a evolução temporal da reação, os fatores auxiliares e a consistência da reação, podendo ainda concentrar-se em detalhes e estimar a probabilidade prévia de uma reação alérgica a um certo alimento [12], [13].

Neste contexto, testes diagnósticos mais sofisticados e precisos, incluindo diagnósticos resolvidos por componentes e a reatividade do epítopo, podem permitir análises mais direcionadas, avaliações prognósticas mais precisas e melhor escolha da abordagem terapêutica. A história clínica, testes cutâneos de puntura, pesquisa de IgE sérica específica, dietas de eliminação e subsequentes desafios alimentares orais são importantes ferramentas de diagnóstico de alergias alimentares [9], [13].

Quanto aos testes cutâneos, estes fornecem um meio rápido para detectar a sensibilização, para distúrbios mediados por IgE. No entanto, não são fiáveis a 100%, sendo que uma resposta negativa confirma a ausência de reatividade alérgica mediada por IgE, mas uma resposta de teste positiva não prova necessariamente que o alimento é a causa. Assim, é preciso ter em consideração a história clínica do paciente e a fisiopatologia da doença, maximizando a utilidade dos resultados dos testes [12].

Os imunoensaios séricos para determinar anticorpos IgE específicos de alimentos fornecem outra modalidade para avaliar a alergia alimentar mediada por imunoglobulina E. As concentrações cada vez mais altas de níveis de IgE específicos de alimentos correlacionam-se com uma probabilidade crescente de uma reação clínica, mas geralmente não se correlacionam muito bem com a gravidade da reação. Estes testes apresentam uma variação de valores preditivos, que podem estar associados a fatores como dieta, idade e doença [12], [14].

Embora não disponível comercialmente, a determinação de epítopos específicos de ligação à IgE de um alergénio pode fornecer maior utilidade diagnóstica. Os perfis específicos de epítopos podem refletir distinções na ligação a áreas de um alergénio que são dependentes do envelhecimento de proteínas e são uma característica distintiva de uma alergia leve/transitória versus uma alergia persistente grave. Além disso, as respostas de IgE a proteínas específicas em alimentos podem ser responsáveis por resultados específicos [12].

A desafio alimentar oral (OFC) é um teste essencial para o diagnóstico da alergia alimentar, mas também se torna complexo e coloca o paciente em risco de reações anafiláticas graves. Este é composto por uma alimentação gradual de um possível alergénio sob supervisão médica para determinar a tolerância ou reatividade clínica [9], [15]. Outros testes úteis para prever o risco de reações anafiláticas graves são: o diagnóstico resolvido por componentes (CRD) e o teste de ativação de basófilos (BAT).

Estes foram desenvolvidos nos últimos anos e podem ser utilizados para planejar o tratamento personalizado com base nas características do paciente, perfil molecular e clínico. O BAT usa o alergénio suspeito *in vitro* para estimular os basófilos do paciente. Este teste oferece um parecer sobre o grau de reatividade específica do alergénio e sobre o risco de reações graves aos testes de provocação. Já o CRD define a sensibilização alérgica em nível molecular usando alergénios recombinantes ou purificados, permitindo determinar o perfil individual de reatividade molecular alérgica, formular uma opinião prognóstica e prever a persistência de uma alergia alimentar. Este teste tem vantagens em relação a outros testes padrão, uma vez que é preciso no diagnóstico, discrimina a verdadeira sensibilização alérgica dos fenómenos de sensibilização cruzada e estratifica o risco clínico associado a perfis específicos de sensibilização [9], [16], [17].

2.1.4. Potenciais tratamentos

Atualmente, o padrão de cuidado para alergia alimentar é evitar alimentos e usar canetas de injeção de epinefrina em caso de exposições acidentais. As estratégias de prevenção podem ser altamente eficazes, mas uma vez que a alergia é estabelecida, a tolerância imunológica por meio da intervenção é difícil de alcançar [11].

Vários são os medicamentos que podem proporcionar alívio para certos aspetos de distúrbios induzidos por alimentos. Por exemplo, os anti-histamínicos podem aliviar parcialmente os sintomas da síndrome de alergia oral e os sintomas cutâneos mediados por IgE, uma vez que bloqueiam recetores H1 e H2 específicos [9]. Já as terapias anti-inflamatórias podem ser benéficas para esofagite eosinofílica alérgica ou gastroenterite. Contudo, o principal tratamento para anafilaxia induzida por alimentos é a administração imediata de epinefrina [12]. Esta é administrada nos primeiros sinais clínicos de anafilaxia após a ingestão do alimento causal, capaz de reverter, em poucos minutos, a hipotensão, o choque anafilático e outros sintomas alérgicos. A epinefrina é um medicamento bastante específico, mas só pode ser usado em particular para aqueles pacientes que foram prescritos para tomá-lo [9]. Com base nas recentes descobertas, as opções de tratamento futuras para a alergia alimentar incluem as estratégias que visam alimentos específicos e as que bloqueiam as respostas alérgicas e não são específicos para alimentos [9], [12]. Como resultado, obtém-se terapias seguras e eficazes contra alvos moleculares-chave e vias de sinal patogeneticamente relevantes [9]. Assim, surgem as abordagens

imunoterapêuticas que tentam evitar efeitos adversos graves que, de outra forma, seriam desencadeados pela injeção de alérgenos nativos [12].

A imunoterapia para alergia alimentar (FAIT) destina-se a obter uma falta de resposta permanente aos alérgenos alimentares ou, pelo menos, aumentar a dose limite de alimentos necessária para desencadear uma reação alérgica [9]. O objetivo da imunoterapia alérgeno-específica é alterar a resposta alérgica a um alérgeno alimentar, de modo que o paciente se torne dessensibilizado ou, possivelmente, tolerante ao alimento específico. As terapias específicas para alérgenos alimentares sob investigação incluem imunoterapia oral, sublingual e epicutânea [10].

A imunoterapia oral (OIT) está sob investigação como uma abordagem potencial para o tratamento da alergia alimentar [10], a qual envolve a ingestão de doses diárias baixas e progressivamente crescentes de alérgenos [9], [12]. Presume-se que esta restaure ou induza um estado tolerante, todavia, estudos até ao momento indicam que a OIT induz a dessensibilização, mas ainda não é fidedigno que a tolerância é alcançada [12]. Consta-se que o uso desta terapia seja a que tem maior eficácia e esse facto deve-se à ingestão de um antígeno alimentar, resultando, preferencialmente, em tolerância oral, que é uma resposta imune ativa. A maioria dos pacientes tratados com imunoterapia oral torna-se dessensibilizada, o que fornece proteção contra reações à ingestão não intencional de pequenas quantidades de alérgeno alimentar.

Na imunoterapia sublingual (SLIT), os extratos alimentares são colocados sob a língua, onde há poucas células efectoras, sendo estes extratos não absorvidos sistemicamente [9], [10]. Uma das vantagens desta terapia é o facto desta parecer ser mais segura do que a administração oral, com apenas uma reação relatada que exigiu administração de epinefrina. No entanto, a dose mais baixa utilizada tem sido associada à eficácia reduzida na quantidade de doses de desafio alimentar toleradas em comparação com a imunoterapia oral [10].

Já na imunoterapia epicutânea (EPIT), a via de administração é a superfície da pele através de dispositivos adesivos especiais contendo o alérgeno [9]. A sua função é solubilizar o alérgeno pela transpiração e disseminá-lo na espessura do estrato córneo. Esta terapia caracteriza-se por não ser invasiva e apresenta um risco menor de reações sistémicas do que outras abordagens de entrega de alérgenos alimentares em estudo, uma

vez que as doses são mais baixas do que as usadas para outras terapias, não havendo fase de escalonamento da dose: a dose inicial é a dose de manutenção [10].

2.1.5. Prevenção

O princípio básico do tratamento da alergia alimentar é evitar os alimentos que causam reações alérgicas. Isso exige um critério de seleção de produtos para a refeição, o que envolve a obrigatoriedade de leitura da composição dos produtos indicada nos rótulos [8], [12]. Outros procedimentos que fazem parte da educação sobre a prevenção incluem o cuidado na obtenção de alimentos em restaurantes e estabelecimentos de alimentos e, ainda, o impedimento do contacto cruzado de alimentos com um alergénio durante a preparação das refeições.

Já os doentes e os seus cuidadores devem ser ensinados a reconhecer sintomas e a usar epinefrina autoinjetável e, ainda, ser instruídos sobre a ativação de serviços de emergência.

No que diz respeito às crianças, os profissionais de saúde e as organizações associadas concluíram que não há evidências suficientes sobre a redução da doença atópica para recomendar a prevenção materna de alergénios durante a gravidez ou lactação, embora haja alguma evidência de que essa prevenção durante a lactação possa estar relacionada à redução da dermatite atópica. Também para a redução desse mesmo risco, devem-se evitar os alimentos sólidos nos primeiros 4 a 6 meses, no entanto, após essa idade, não há dados suficientes que sustentem essa evidência [12].

2.2. Alergénios alimentares

Relativamente aos alergénios alimentares, estes caracterizam-se por serem proteínas cujo peso molecular varia de 15 kDa a 40 kDa ou glicoproteínas solúveis em água com peso molecular de 10 kDa a 70 kDa e estáveis ao calor, ácido e protéases, causando alergias como resposta anormal imunologicamente condicionada do organismo [8], [12].

Ainda que uma alergia possa ser desencadeada por praticamente qualquer alimento, os alergénios que são responsáveis pelas reações mais significativas, incluem leite, ovo, amendoim, nozes, marisco, peixe, trigo e soja [10]. No entanto, é evidente que aspetos

adicionais, como a preparação dos alimentos e a maneira como estes são ingeridos, podem ser relevantes e afetar a alergenicidade [12].

Um papel importante na estrutura molecular dos alergénios é desempenhado pelos epítomos. Estes são fragmentos do antigénio, que se ligam ao anticorpo, interagindo diretamente com o mesmo e estimulando mais ou menos o sistema imunológico humano. Os epítomos de antigénios geram uma resposta imune mais forte num determinado indivíduo e são designados por determinantes imunodominantes [8].

2.2.1. Api g1

O alergénio estudado neste trabalho (Api g1) é um alergénio do aipo. Este pertence à família PR-10 de proteínas relacionadas à patogénese e tem uma massa molecular de aproximadamente 16 kDa. Até agora, só foram detetadas duas isoformas diferentes. A alergia ao aipo é uma das alergias alimentares mais importantes na Europa Central e é particularmente prevalente na Suíça, Alemanha e França [13].

O aipo é uma causa frequente de alergia alimentar em pacientes sensibilizados ao pólen de bétula e artemísia, sensibilização esta conhecida como síndrome do pólen alimentar [14], [18]. A síndrome do alimento polínico geralmente ocorre em pessoas que já são alérgicas ao pólen e têm rinite alérgica. Este facto é confirmado uma vez que o IgE policlonal em doentes alérgicos ao pólen de bétula ligam-se a proteínas do aipo e os estudos serológicos concluem que estes partilham vários topos de epinefrina de células B, ocorrendo a reação [16]. Contudo, se este for cozido, a reação será improvável de acontecer.

As reações alérgicas ao aipo, quando ocorrem, podem ser graves para algumas pessoas. Sendo este alimento usado de várias formas, incluindo: folhas, especiarias e sementes, podendo estas últimas serem utilizadas para fazer sal de aipo, é necessário ter muito cuidado [18].

Estima-se que aproximadamente 50% dos pacientes alérgicos ao pólen relataram reações sistémicas em relação ao aipo. A taxa de sensibilização deste alimento corresponde a 3,5%. Desses 3,5%, cerca de 20% deles sofrem de uma alergia alimentar associada, principalmente direcionada a membros da família *Apiaceae*, como é o caso do aipo, da cenoura, da erva-doce, da salsa e dos anis [17].

Essas pessoas alérgicas ao aipo podem manifestar alguns sintomas comuns a todas as outras alergias, como: erupção cutânea; formigueiro ou cócegas na boca ou garganta; inchaço no rosto, garganta e/ou boca; dificuldade em respirar; asma grave e dor abdominal, náuseas e vômitos. Em casos extremos, pode ocorrer uma queda dramática da pressão arterial ou choque anafilático [18]. À luz dos conhecimentos atuais, estes sintomas têm as características das reações alérgicas mediadas por IgE [16].

Para diagnóstico, recorre-se a testes cutâneos e exames de sangue, não sendo estes totalmente fidedignos, como já foi referido. Quando a dúvida persiste, recomenda-se o “desafio alimentar”, onde o paciente come uma pequena quantidade do alimento (aipo), aumentando a dose gradualmente, e testa-se se ocorre ou não reação alérgica. Este desafio é feito num ambiente médico com a supervisão do mesmo. Também o histórico é importante, pois contém pistas sobre a gravidade da alergia [18].

Com base na lista da Food and Agriculture Organization, o International Life Science Institute Europe definiu critérios, em 1995, para a seleção de alimentos que devem ser incluídos numa lista dos principais alergénios. Embora o aipo tenha sido sempre uma causa frequente de reações alérgicas na Europa, decidiu-se que este não preenchia os critérios de inclusão na lista de alergénios alimentares para rotulagem, devido ao facto de nenhum desafio alimentar duplo-cego, controlado por placebo, ser realizado com esse vegetal [14]. Contudo, em 2011 o Regulamento (EU) n°1169/2011, implementou a obrigatoriedade de incluir este alergénio nas rotulagens de produtos que o contivessem, tal como outras substâncias ou alimentos que se caracterizavam por provocar alergias ou intolerâncias [19].

2.3.Sensores eletroquímicos

Um sensor é um objeto que deteta sinais no ambiente circundante e converte-os em informações quantificáveis. Em química, estes têm um objetivo que se define na tradução de reações e condições em dados para análise, num determinado ambiente [20].

Deste modo, os sensores eletroquímicos representam-se como dispositivos que permitem a recolha de dados e a obtenção de informações com a mínima manipulação do sistema estudado [21]. Estes tipos de sensores são constituídos essencialmente por três componentes: um recetor que é responsável pelo reconhecimento específico do analito,

um analito e um transdutor para converter a reação num sinal elétrico possível de se medir (figura 1) [20]. O elemento do transdutor é um eletrodo [22].

Os sensores eletroquímicos têm como principais vantagens a melhoria do desempenho das ferramentas analíticas convencionais, substituindo-as por ferramentas mais baratas, portáteis e simples de manusear e, ainda, a diminuição do tempo de análise [21], [22]. Porém, têm algumas limitações no que diz respeito a interferências eletroquimicamente ativas na amostra e à fraca estabilidade a longo prazo. Contudo, estes sensores oferecem inúmeras aplicações no diagnóstico clínico, na monitorização ambiental e na análise de alimentos.

A maioria destes dispositivos são baseados em medições potenciométricas, amperométricas ou de condutividade [23].

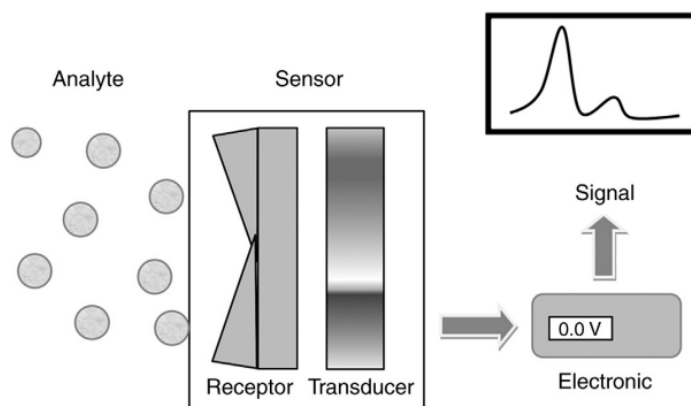


Figura 1 Diagrama de um sensor eletroquímico [22]

2.4. Métodos eletroquímicos

Os métodos eletroquímicos podem ser divididos em dois grupos principais: métodos interfaciais e métodos não interfaciais (de solução). Os métodos interfaciais são métodos que respondem direta ou indiretamente à presença do analito na superfície do eletrodo, resultando numa perturbação de um sinal elétrico que pode ser medido. Por sua vez, os métodos não interfaciais, baseiam-se essencialmente numa célula de tamanho conhecido, com dois eletrodos equidistantes que medem a condutância elétrica de uma solução como um todo. Dentro dos métodos interfaciais, estes ainda podem dividir-se em estáticos e dinâmicos, sendo os estáticos aqueles em que não há perturbação e a corrente elétrica é

zero. Já os dinâmicos definem-se por aqueles que exploram uma reação oxidação-redução, isto é, a transferência de elétrons ocorre entre o eletrodo e o analito [22]. A potenciometria, a amperometria, a coulometria, a voltametria e a condutimetria são alguns dos métodos eletroquímicos existentes.

2.4.1. Potenciometria

A potenciometria insere-se nos métodos interfaciais estáticos mais utilizados em aplicações analíticas, como é o exemplo do medidor de pH [22]. Este método utiliza um voltímetro de alta impedância para medir a diferença de potencial entre o eletrodo de referência e o indicador. O eletrodo de referência é necessário para fornecer um potencial constante de meia-célula. Já o eletrodo indicador desenvolve um potencial variável em função da atividade de um analito específico em solução [23]. A utilização do voltímetro de alta impedância assegura que o fluxo de corrente é negligenciável e, por conseguinte, o sistema está em equilíbrio [24].

2.4.2. Amperometria

A amperometria distingue-se por ser um método de análise em que o sinal de interesse é uma corrente que, em certas condições experimentais, é diretamente proporcional à concentração da substância a analisar [25]. Como certas espécies químicas são oxidadas ou reduzidas em eletrodos metálicos inertes, os elétrons são transferidos do analito para o eletrodo (oxidação) ou do eletrodo para o analito (redução). A direção do fluxo de elétrons depende das propriedades da substância a analisar e pode ser controlada pelo potencial elétrico aplicado ao eletrodo de trabalho [23].

2.4.3. Coulometria

A coulometria é um método eletroquímico onde é medida a carga total consumida na conversão oxidação-redução de um analito num eletrodo. A carga é calculada aplicando as Leis de Faraday, a partir de medições de transferência da mesma durante uma reação eletroquímica [25], [26]. Este método destaca-se por ser um método absoluto, o que

significa que a calibração não é geralmente necessária, uma vez que a carga elétrica pode ser medida com alta precisão [25].

2.4.4. Voltametria

Na voltametria, um potencial variável no tempo é aplicado a um eletrodo de trabalho, levando à ocorrência de reações de oxidação-redução de espécies eletroativas na solução e a corrente correspondente é medida [22], [28]. Numa célula voltamétrica utilizam-se, normalmente, três eletrodos, um eletrodo de trabalho (WE), um eletrodo de referência (RE) e um eletrodo auxiliar (CE), ligados a um potenciostato. A corrente medida permite obter informação acerca do analito. Esta corrente é, idealmente, devida à transferência de elétrons entre o eletrodo de trabalho e o analito. O potencial e a corrente são registados, simultaneamente, obtendo-se um voltamograma. A corrente observada é, portanto, diferente da corrente no estado estacionário. Este método é comumente usado para o estudo de processos que ocorrem no eletrodo de trabalho e a variação do potencial pode ser cíclica, pulsada e linear [22]. Neste trabalho foram utilizadas apenas a voltametria cíclica (CV) e a voltametria de impulso diferencial (DPV).

2.4.4.1. Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica (CV) tem um papel importante no campo da eletroquímica. Este método é baseado num varrimento rápido de potencial, na qual a direção desse varrimento é invertida, podendo ser positiva ou negativa. Já a velocidade de varrimento caracteriza-se por assumir qualquer valor arbitrário [22], [24].

As formas dos voltamogramas obtidos por CV e a posição dos picos podem mostrar se a reação eletroquímica é reversível ou irreversível. Outros parâmetros como transferência de massa também podem ser estudados. A CV é, portanto, a primeira análise realizada em sensores eletroquímicos para avaliar a possibilidade de deteção seletiva [29].

Quando um potencial é aplicado no eletrodo de trabalho nas direções direta e indireta, a corrente resultante pode ser registada como um único ciclo ou vários ciclos com a CV. Com o método podem-se obter potenciais e correntes de pico anódicos e catódicos e potenciais de meio pico [24].

A figura 2 demonstra o potencial aplicado em função do tempo na CV, onde E_i é o potencial inicial, E_f é o potencial final e E_{max} e E_{min} correspondem, respetivamente, ao potencial máximo e mínimo.

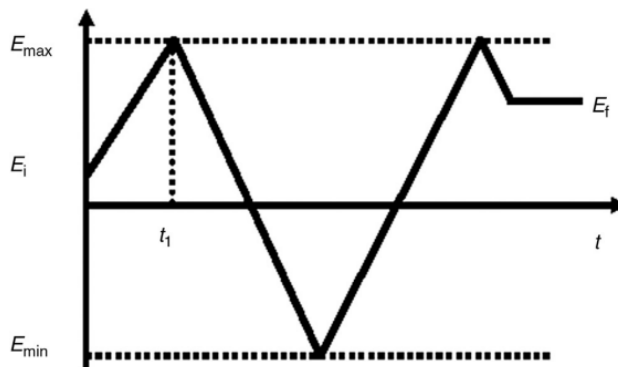


Figura 2 Potencial aplicado em função do tempo em voltametria cíclica (CV) [22].

2.4.4.2. Voltametria de Impulso Diferencial

A voltametria de impulso diferencial (DPV) é uma técnica que envolve a aplicação de impulsos de potencial de amplitude crescentes num potencial de rampa linear. O potencial é pulsado a partir de um potencial inicial. A corrente é medida imediatamente antes da aplicação do pulso e no final do mesmo, e a diferença entre eles é registada como sendo o voltamograma de impulso diferencial. Esta medição geralmente é feita em meio estacionário e sob condições não agitadas [22], [24].

A DPV tem algumas características vantajosas, como o baixo limite de deteção, a diminuição da corrente capacitiva e a supressão das correntes de fundo, por amostragem da corrente imediatamente antes da alteração do potencial [29].

O método de voltametria de impulso diferencial é semelhante à primeira derivada de um voltamograma linear em que a formação de um pico é observada para um determinado processo de oxidação-redução [22]. O gráfico obtido corresponde às diferenças entre as correntes medidas e os potenciais aplicados, exibindo a corrente amostrada no eixo vertical e o potencial no eixo horizontal [24].

Na figura 3 está representado num diagrama, potencial em função do tempo, a aplicação de pulsos na DPV.

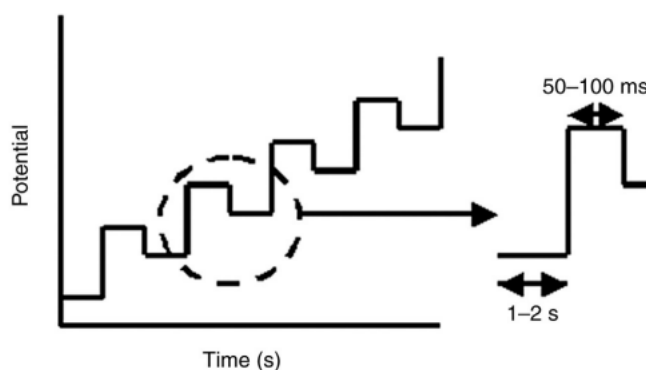


Figura 3 Diagrama da aplicação de pulsos na técnica de voltametria de impulso diferencial (DPV) [22]

Em geral, as técnicas de impulso, como a DPV, são mais sensíveis que os métodos de varrimento linear, pois há minimização da corrente capacitiva [22]. Por sua vez, a CV é mais usada para fins exploratórios, contudo não é tão apropriado para quantificação, uma vez que os limites de detecção e quantificação são superiores aos outros tipos de voltametria [22], [29]. Assim, é comum no desenvolvimento de sensores usar ambas as técnicas, uma vez que a voltametria cíclica fornece informações essenciais, como a reversibilidade do processo e os tipos de processos de oxidação-redução presentes na análise, enquanto a voltametria de impulso diferencial é utilizada para determinações quantitativas.

2.5. Elérodos serigrafados

Nos últimos anos o interesse na fabricação de biossensores com alta sensibilidade, seletividade e eficiência tem vindo a crescer exponencialmente.

Atualmente, de modo a desenvolver novas plataformas de detecção eletroquímica e melhorar o seu desempenho, têm sido utilizados eléctrodos serigrafados (SPEs). A serigrafia oferece versatilidade em termos de design do eléctrodo, compatibilidade do material e modificações, oferecendo sensores de produção em massa, acessíveis e altamente reproduzíveis, utilizando para isso tecnologia de filme espesso [30].

Os eléctrodos serigrafados, como se observa na figura 5, incluem uma configuração de três eléctrodos impressos com diferentes tintas, numa combinação de camadas, em substratos plásticos ou cerâmicos, usando impressoras industriais bem conhecidas. Essas

tintas podem conter, por exemplo, prata ou carbono, sendo a tinta que contém prata utilizada, frequentemente, para formar o elétrico de referência e as ligações elétricas para a conexão ao potenciostato e a que contém carbono para formar os eletrodos de trabalho e auxiliar. Essas tintas contêm, além das partículas de prata e de carbono, um ligante polimérico e outros aditivos que são utilizados para melhorar a dispersão, impressão e adesão. Também são utilizadas tintas a base de ouro e platina, mas utilizam-se menos devido ao seu custo excessivo [31], [32]. A composição das tintas utilizadas para a construção dos eletrodos determina a seletividade e a sensibilidade necessárias para cada análise. A superfície dos eletrodos, principalmente do WE, pode ser alterada pela sua modificação com uma variedade de substâncias diferentes como filmes metálicos, polímeros, enzimas, etc [32].

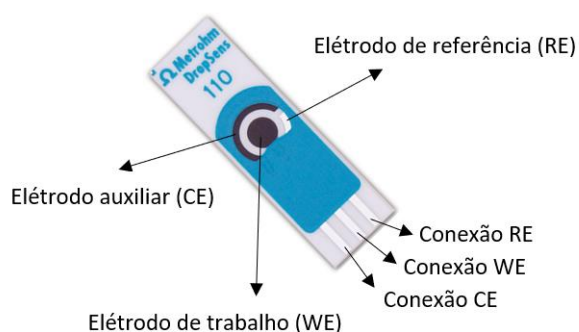


Figura 4 Eléctrodo serigrafado de carbono (Metrohm-DropSens) [33]

Seguindo a tendência da ciência para a miniaturização, também a eletroquímica se afastou de instrumentos e materiais volumosos, aproximando-se de plataformas simples e reduzidas [30]. As principais vantagens associadas são: a redução do volume de amostra necessário, facilitando a redução do tamanho do sistema de diagnóstico no qual o dispositivo será integrado; a rapidez da análise; a adequação para procedimentos de automação e a maior confiabilidade e repetibilidade. Além disso, em comparação com eletrodos convencionais, os eletrodos serigrafados podem apresentar características vantajosas, como melhor relação sinal/ruído, independência da convecção forçada, menor queda Ohmica e velocidade de transporte de massa mais rápida [34].

Apesar das vantagens atrativas, associadas a estes eletrodos serigrafados, também existem limitações, uma delas é o teor de solventes orgânicos nas soluções tampão. Estes podem ser responsáveis pelo aumento do limite de detecção e diminuição da sensibilidade,

devido à dissolução das tintas isolantes. Outra das limitações é a baixa sensibilidade a certos analitos devido à baixa velocidade de transferência de eletrões, fazendo com que as espécies eletroativas nas amostras interferiram facilmente nos sensores baseados em SPE [31].

Mesmo assim, as técnicas eletroquímicas em combinação com elétrodos serigrafados foram comprovadas como capazes de acelerar a mudança de sistemas convencionais técnicas/equipamentos de bancada a dispositivos pequenos de baixo custo, robustos e rápidos [30].

2.6. Polímeros Molecularmente Impressos

A impressão molecular é uma tecnologia que pode potencialmente resolver algumas questões-chave [35]. Os polímeros molecularmente impressos (MIPs) são polímeros reticulados que exibem sítios de ligação específicos para a molécula molde [36]. Estes são preparados com uma mistura de reação composta por um molde, um ou dois monómeros funcionais, um ou dois monómeros de reticulação e um iniciador de polimerização dissolvido num solvente [36], [37]. Neste procedimento, uma molécula molde (alvo) é introduzida numa mistura de monómero e agente reticulante dissolvido num solvente, resultando numa matriz polimérica tridimensional.

Após a remoção do molde do polímero preparado, as cavidades permanentes do molde original geradas na matriz polimérica correspondem à forma, tamanho e orientação das moléculas molde que são capazes de se voltar a ligar seletivamente, com alta especificidade, como se pode verificar na figura 5. O polímero obtido é referido como polímero molecularmente impresso (MIP) [36].

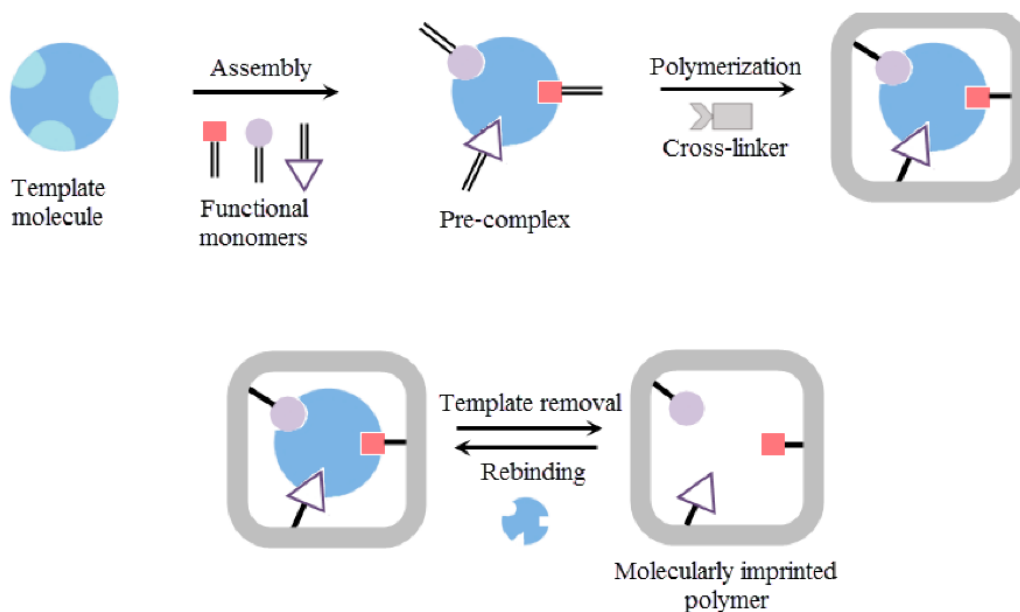


Figura 5 Esquema da impressão molecular [38]

Estes polímeros exibem algumas propriedades como a alta seletividade e estabilidade [36]; a resistência à pressão, a temperaturas elevadas e à inércia contra vários produtos químicos em comparação com elementos biológicos de reconhecimento [37] e a resistência a condições altamente ácidas e básicas [36]. Caracterizam-se, ainda, por serem robustos, reprodutíveis e modificáveis [35]. As principais vantagens que os mesmos oferecem são a grande afinidade para a molécula alvo, o baixo custo de produção e a sua vida útil que pode chegar a vários anos, quando estes são conservados à temperatura ambiente.

Perante as particularidades supracitadas, os MIPs, têm sido utilizados em algumas aplicações, como na separação cromatográfica, no reconhecimento molecular, na detecção de resíduos radioativos perigosos, na extração em fase sólida, em drug delivery, etc [36]. Até à data, estes polímeros têm sido bem-sucedidos na maioria das plataformas de transdução e uma variedade de métodos têm sido aproveitados para trazer uma integração próxima da plataforma com o polímero [35].

Para a realização da síntese destes polímeros molecularmente impressos a técnica utilizada foi a eletropolimerização.

A eletropolimerização é um método que se destina à síntese de polímeros condutores, caracterizando-se por um procedimento de deposição em que uma camada de polímero condutor é formada ou revestida sobre um elétrodo na presença de um *template* definido.

Esta reúne numerosas vantagens relativamente os métodos tradicionais, tais como a aderência à superfície do transdutor, a velocidade de preparação e a possibilidade da preparação em meio aquoso e o controlo da espessura e morfologia da camada polimérica. Obtém-se através de técnicas eletroquímicas, nomeadamente por voltametria e potenciometria, como já referido anteriormente [39], [40].

3. Materiais e Métodos

Neste capítulo serão indicados os materiais e os métodos utilizados para a realização do trabalho incluindo os reagentes, as soluções e os equipamentos utilizados para elaboração do mesmo.

3.1.Reagentes

Os reagentes utilizados na execução do trabalho experimental, foram usados tal como foram recebidos, sem qualquer purificação ou tratamento adicional.

Hexacianoferrato(II) de potássio trihidratado (Sigma-Aldrich, puriss.p.a.), hexacianoferrato(III) de potássio (Sigma-Aldrich, puriss.p.a.), hidrogenofosfato de potássio (Riedel-de Haën, puriss.p.a), dihidrogenofosfato de potássio (Merck, puriss.p.a), hidróxido de sódio (labkem, puriss.p.a), ácido oxálico (Sigma-Aldrich, puriss.p.a), ureia (Sigma-Aldrich, puriss.p.a), cloreto de potássio (VWR chemicals, 99,8%) e solução de tetracloroaurato(III) em 12,7% de HCl (Merck, puriss. p.a.).

A proteína Api g1 (500 µg/mL, Cusabio Technology LLC) naturalmente putrificada, foi fornecida em Tris/HCl, 10mM e EDTA 1mM, pH 8, contendo 50% de glicerol.

O monómero usado foi o o-fenilenodiamina (OFDA, Sigma-Aldrich, puriss.p.a.).

3.2.Soluções

Para as medições eletroquímicas prepararam-se soluções tampão fosfato de concentração 0,1M e pH 7,0, juntando as quantidades adequadas de K_2HPO_4 e KH_2PO_4 , o acerto do pH até ao valor desejado realizou-se com NaOH 1M. Foram também preparadas soluções diárias de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ nesta solução tampão com uma concentração de 1mM. Para a eletrodeposição de nanopartículas de ouro no WE foi utilizada uma solução de tetracloroaurato(III) 0,10mM em 0,1M HCl.

A solução stock de Api g1 foi mantida no congelador e a partir desta solução foram preparadas diluições diárias de diferentes concentrações no tampão fosfato.

As soluções da o-Fenilenodiamina foram preparadas diariamente no tampão e às mesmas foram adicionadas diferentes quantidades de Api g1 para a formação dos polímeros molecularmente impressos.

Para a extração da proteína do MIP após a polimerização foi usada uma solução de hidróxido de sódio 0,2M em 60:40 (% V/V) de etanol:água.

Todas as soluções foram preparadas utilizando água ultrapura (resistividade = 18.2 MΩ.cm) obtidas a partir de um sistema de purificação de água Milipore (Simplicity 185).

3.3.Equipamento

Todas as medições voltamétricas foram efetuadas com um potencióstato/galvanóstato da marca Metrohm Autolab (PGSTAT204), controlado pelo *software* NOVA da Metrohm Autolab, versão 1.11.

Utilizaram-se elétrodos serigrafados de carbono (SPCE, marca Metrohm DropSens, modelo DRP-110), modificados com nanopartículas de ouro.

Para a medição de líquidos e preparação de soluções utilizou-se material volumétrico de vidro e micropipetas Eppendorf Research plus de 10 µL, 20 µL, 200 µL e 1000 µL.

Todas as pesagens foram realizadas numa balança analítica (Mettler Toledo), com precisão de 0,00001 g.

O trabalho experimental foi realizado na sua totalidade à temperatura ambiente.

3.4.Preparação do Polímero Molecularmente Impresso

Inicialmente, nos SPCE foi realizada a eletrodeposição de nanopartículas de ouro. Assim, foram colocados nos elétrodos 25µL da solução de ouro e, seguidamente, aplicada uma diferença de potencial de -0,2V durante 60s.

A síntese do MIP foi efetuada por eletropolimerização diretamente na superfície dos SPCE modificados com ouro.

Para isso, foram colocados no eletrodo 50µL de uma solução de OFDA e 1µL de uma solução de Api g1, efetuando-se o processo de formação de um filme polimérico usando

CV numa gama de potencial entre -0,4 e +1,0V, durante 5 ciclos com uma velocidade de varrimento de 50 mV/s.

Após a polimerização, os elétrodos foram lavados com água ultrapura, secos e submetidos à extração da proteína com o auxílio do solvente de extração (hidróxido de sódio). Neste processo foram adicionadas alíquotas de 50µL no eletrodo durante 1h e 30min, renovando frequentemente o solvente de extração.

O mesmo procedimento foi aplicado na preparação de polímeros não impressos (NIP), porém não foi adicionada a proteína Api g1 à solução de polimerização.

3.5. Medições eletroquímicas

As interações entre a Api g1, o NIP e o MIP foram avaliadas indiretamente utilizando o sinal eletroquímico de uma solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 1mM em solução tampão 0,1M e pH 7. Com o uso desta solução realizou-se a medição do sinal (de oxidação) por CV e DPV entre -0.2 e +0.5 V.

Após a medição, os elétrodos foram lavados com água ultrapura, secos e incubados com a colocação de 3 a 5µL de soluções de Api g1 com várias concentrações durante 5min. Ao fim de cada 5min utilizou-se água ultrapura para limpar o NIP e o MIP e, após secagem, foram medidos novamente os sinais por CV e DPV nas condições supracitadas. O sinal analítico utilizado para fins quantitativos (Δi_p) foi a diferença entre a intensidade de corrente de pico após a extração inicial da proteína e a intensidade de corrente de pico após incubação com a mesma.

Para caracterizar o NIP e o MIP utilizaram-se as técnicas de CV e DPV, recorrendo sempre a uma solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 1mM em solução tampão 0,1M e pH 7,0, durante a construção dos sensores e de todo o processo de otimização das condições experimentais.

4. Resultados e Discussão

Neste capítulo serão expostos todos os resultados obtidos na realização do trabalho experimental e a discussão relativa aos mesmos.

O elemento de reconhecimento é um componente essencial de qualquer tipo de sensor, que permite que haja uma identificação do analito em estudo, de forma que este possa vir a ser analisado. Neste estudo, aplicou-se a tecnologia de impressão molecular, de modo a preparar-se um sensor seletivo ao Api g1.

A técnica “*surface imprinting*” é utilizada para a síntese do MIP e distingue-se por ser possível obter bons resultados na impressão de proteínas. São características desta técnica o controlo da espessura do filme polimérico e da sua morfologia através de ajustes nas condições experimentais. Também o facto da impressão e da comunicação direta entre o polímero e a superfície do transdutor permitir ser realizada apenas num passo, constitui uma vantagem para a técnica, concedendo uma maior repetibilidade ao processo.

O controlo da espessura do polímero, quando uma proteína é impressa, é um dos aspetos importantes a ter em conta para garantir que esta não fica impressa irreversivelmente, causando dificuldades na sua extração.

Após a realização dos estudos de impressão molecular com monómeros condutores, concluiu-se que não era possível analisar diretamente a Api g1 por não ser eletroativa após a formação do MIP. Estes resultados indicam que a proteína pode ter um comportamento diferente na presença destes monómeros ou nenhum deles é capaz de imprimir esta molécula. Desta forma, priorizou-se o estudo da impressão em monómeros não condutores e medições indiretas da Api g1, usando um par redox. Com esta finalidade, usaram-se SPCEs devido ao facto de se caracterizarem como os mais adequados para a formação de camadas poliméricas não condutoras. Depois de testados vários polímeros, o o-fenilendiamina foi escolhido como o monómero mais eficaz para a elaboração de um sensor MIP para a proteína.

A construção e o funcionamento do sensor estão representados no esquema da figura 6.

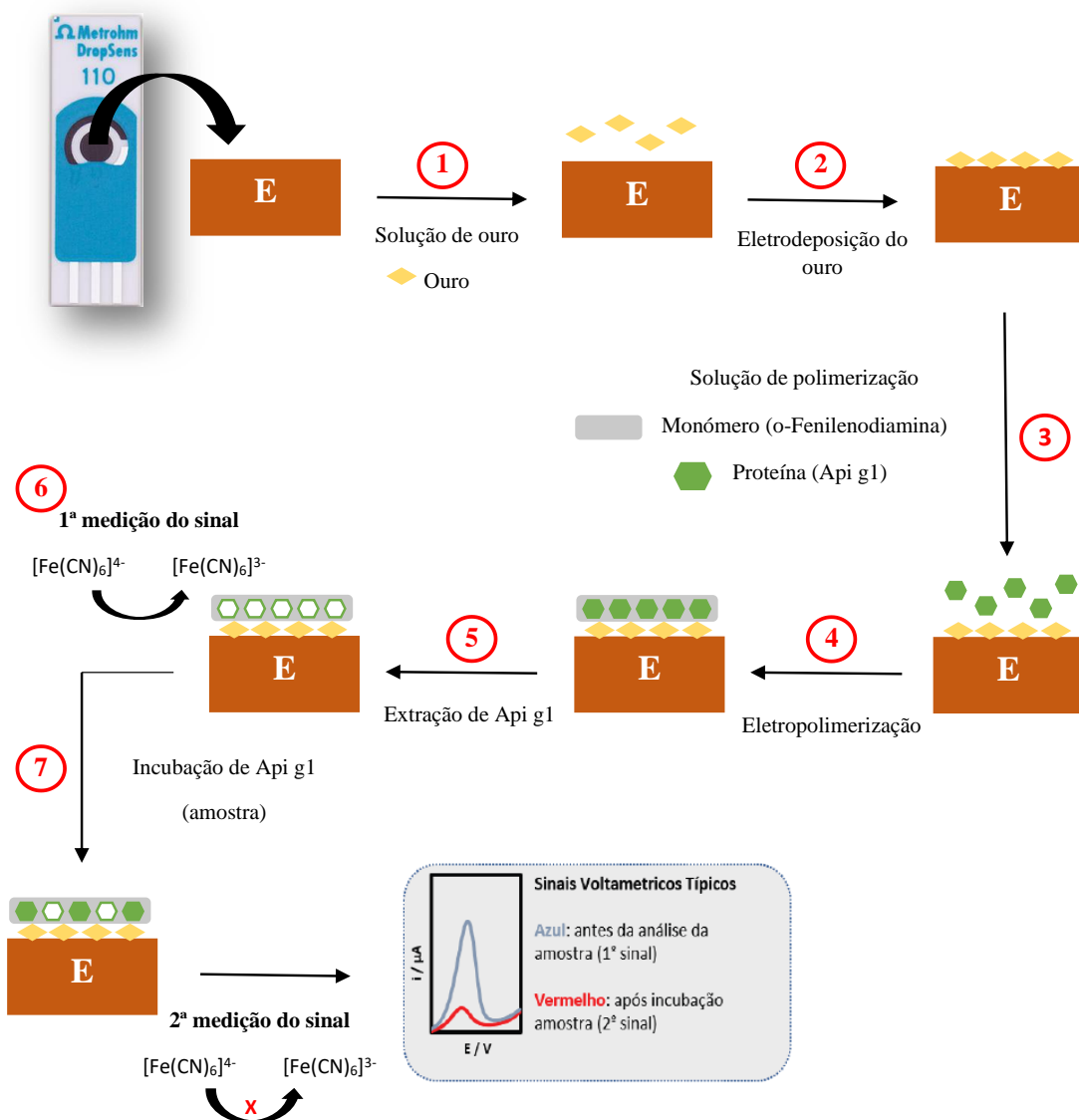


Figura 6 Esquema de construção e funcionamento de um sensor MIP e o seu funcionamento. Adaptado de Pacheco, J. 2017

A partir do esquema da figura 6 é possível visualizar as várias etapas no processo de desenvolvimento do sensor MIP. Estas compreendem:

- Eletrodeposição de nanopartículas de ouro na superfície do SPCE;
- Deposição da solução do monómero e a solução da proteína no SPCE;
- Eletropolimerização de um polímero envolvendo a proteína e
- Extração da proteína, formando-se um filme polimérico com “cavidades” específicas;

Uma vez utilizada a medição indireta, foi realizada uma análise voltamétrica usando uma solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Deste modo, utilizaram-se as diferenças entre os sinais antes e após a ligação da proteína (Δi_p). Assim, o funcionamento de um sensor envolve:

- Medição do sinal eletroquímico após a extração da proteína com “cavidades livres” usando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$;
- Incubação da Api g1 por tempo determinado;
- Medição do sinal eletroquímico com as “cavidades parcialmente ocupadas”, usando novamente a solução $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.

4.1. Síntese do MIP

A impressão molecular da proteína Api g1 na superfície do SPCE foi realizada por eletropolimerização de uma solução com 5mM de o-fenilenodiamina e 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Api g1 em tampão fosfato 0,1 M e pH 7,0. A eletropolimerização por CV foi efetuada durante 5 ciclos numa gama de potencial entre -0,4 e +1,0V. Desta forma, criou-se uma camada de poli-o-fenilenodiamina com moléculas de Api g1 impressas na superfície do elétrodo, originando o polímero molecularmente impresso.

Desenvolveu-se, também, um polímero não impresso que funcionou como controlo, onde se utilizou apenas o-fenilenodiamina em tampão fosfato, nas condições supracitadas.

A figura 7 representa os voltamogramas referentes à polimerização de um MIP, de um NIP e do primeiro ciclo de polimerização de um NIP e de um MIP.

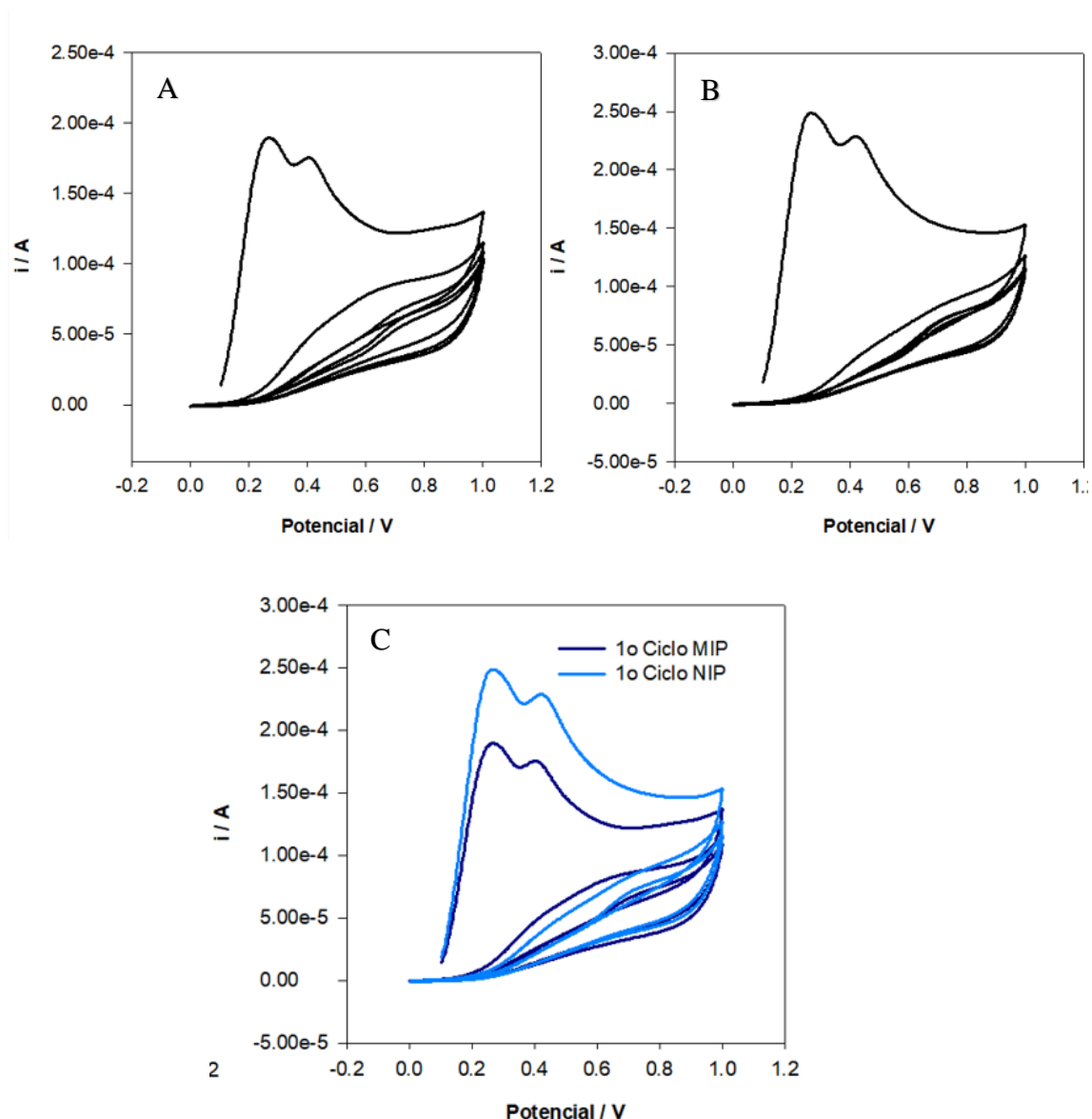


Figura 7 Voltamogramas registados durante a polimerização por CV. A) Voltamogramas da polimerização de um MIP; B) Voltamogramas da polimerização de um NIP; C) Primeiro ciclo de polimerização de um MIP e de um NIP

Em ambos os voltamogramas (A e B) da figura 7 é possível observar-se o típico processo de oxidação-redução irreversível do monómero o-fenilendiamina. Verifica-se ainda que conforme o número de varrimentos aumenta, há uma diminuição da intensidade de corrente de oxidação que demonstra a existência da formação de camadas de monómero na superfície do eletrodo, tornando-o não condutor.

Relativamente ao gráfico C, este evidencia a diferença entre o primeiro ciclo de polimerização de um NIP e de um MIP, sendo que na síntese do NIP observou-se uma

intensidade de corrente superior ao MIP. Tal pode ser explicado pela presença da proteína Api g1 quando em contacto com o monómero, bloqueando parcialmente a oxidação do o-fenilenodiamina.

Desta forma, há a indicação, através dos dados, da boa capacidade de interação entre a Api g1 e o o-fenilenodiamina, sendo um aspeto favorável para a preparação do polímero molecularmente impresso, assegurando a boa seletividade.

4.1.1. Otimização das condições de polimerização

Para uma melhor performance dos MIPs é essencial que estes sejam otimizados de modo a assegurar uma melhor resposta, existindo vários fatores a melhorar na sua preparação por eletropolimerização.

Assim, foram estudados parâmetros como: a concentração do monómero, a concentração da proteína, o número de ciclos (CV), os solventes e o tempo de extração e o tempo de incubação.

Para a apresentação dos resultados definiu-se, Δi_p , como sendo a diferença entre a intensidade de corrente do pico após a extração da proteína Api g1 e a intensidade de corrente do pico após a incubação com a mesma. As intensidades de corrente do pico foram obtidas por DPV, utilizando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 1mM em solução tampão 0,1M e pH 7,0.

4.1.2. Concentração de o-fenilenodiamina

Diferentes concentrações de o-fenilenodiamina foram utilizadas para testar qual a melhor a ser utilizada na solução de polimerização: 1,25; 2,50; 5,00 e 10,0mM (figura 8).

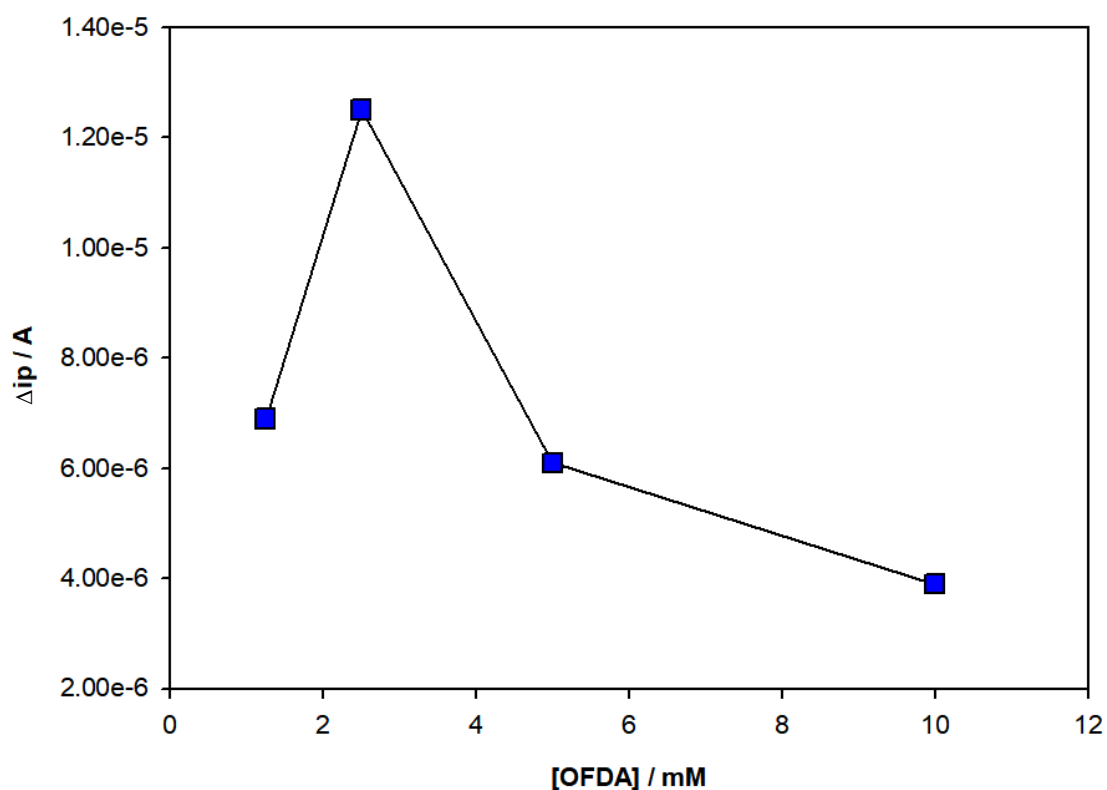


Figura 8 Resultados obtidos na otimização da concentração de o-fenilenodiamina na síntese do MIP

Na figura 8 é possível observar uma subida do Δi_p , entre 1,25 e 2,50mM, após a qual este desce. Assim, a concentração do o-fenilenodiamina que permite uma maior variação da intensidade de corrente é a de 2,50mM.

Deste modo, foi utilizada esta concentração do monómero nas etapas seguintes.

4.1.3. Concentração de Api g 1

Relativamente à concentração de proteína utilizada para polimerizar, também foram testadas várias concentrações: 0,50; 5,0; 50,0 e 500,0 μ g/mL.

Os resultados obtidos nesta otimização estão representados na figura 9.

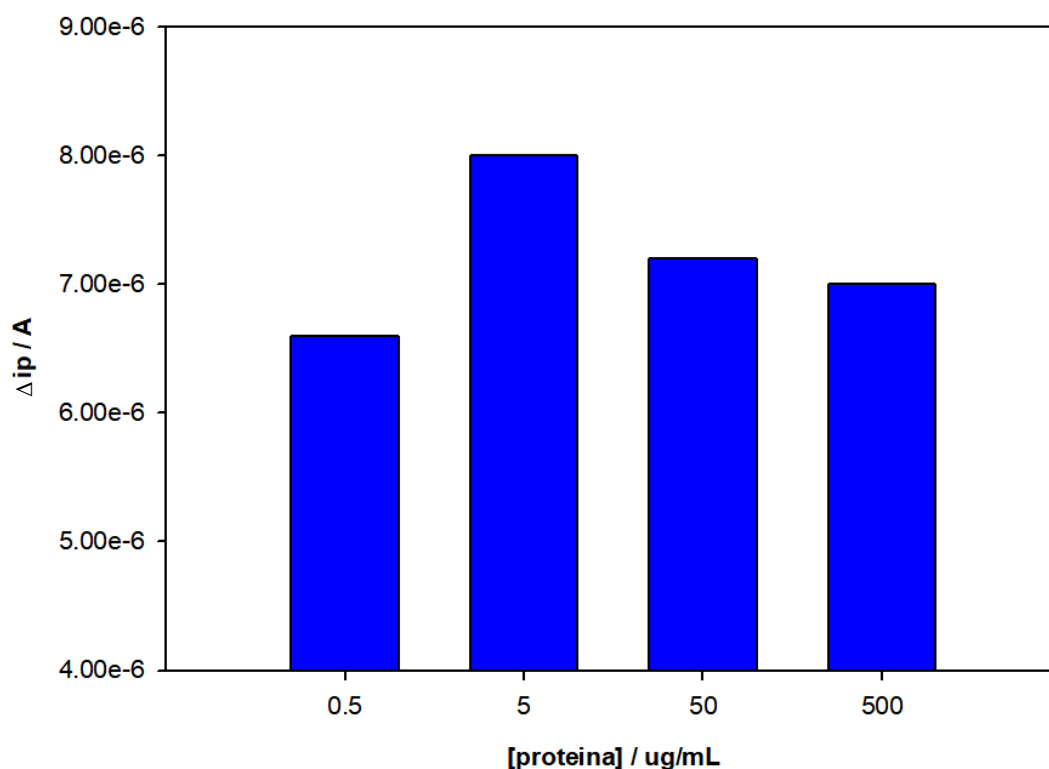


Figura 9 Resultados obtidos na otimização de concentração de Api g1 na síntese do MIP

Na figura 9 observa-se uma subida acentuada da Δi_p entre 0,50 e 5,0 $\mu\text{g/mL}$ e uma descida gradual após esta concentração. Assim, a concentração ótima de Api g1 a utilizar na polimerização é de 5 $\mu\text{g/mL}$.

Desta forma, é possível concluir que para concentrações mais baixas de proteína, há menores quantidades da mesma impressas no polímero, o que significa a formação de um menor número de “cavidades” na matriz polimérica e, por sua vez, os valores da Δi_p são inferiores. Por outro lado, para as concentrações mais elevadas, os valores da Δi_p diminuem, devido ao facto de ser difícil de extrair a proteína da matriz polimérica. Em consequência, também são geradas menos “cavidades” na matriz polimérica e os valores da Δi_p são mais baixos.

4.1.4. Número de ciclos

Na eletropolimerização, o número de ciclos de varrimento de potencial utilizados na voltametria cíclica está relacionado com a espessura do filme polimérico, controlando-a. Deste modo, foram testadas polimerizações com 5, 10, 15, 20 e 30 ciclos. Os resultados encontram-se expostos na figura 10.

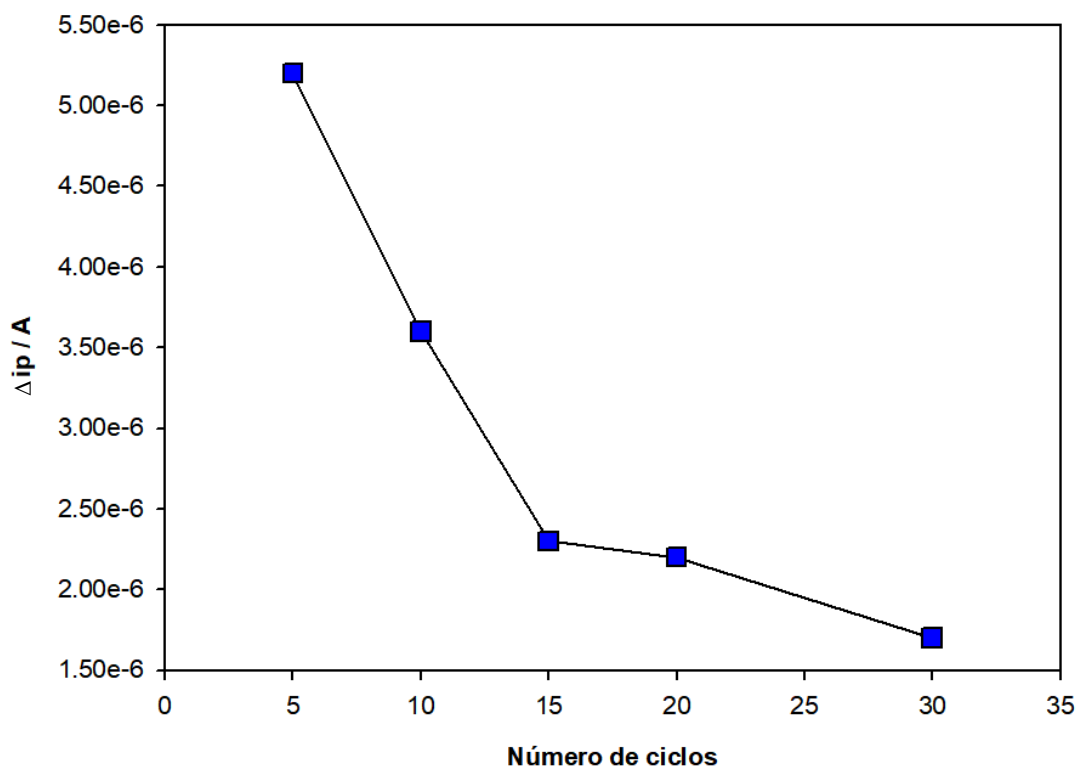


Figura 10 Resultados obtidos na otimização do número de ciclos na síntese do MIP

A partir deste gráfico é notório que houve uma descida da Δi_p dos 5 até aos 30 ciclos, sendo a Δi_p mais elevada para 5 ciclos.

Assim, foram realizadas sempre polimerizações com 5 ciclos nas etapas que se sucedem.

4.1.5. Solvente de extração

No que se refere aos solventes de extração, foram testados vários, como soluções aquosas de 0,1M hidróxido de sódio, 0,5M ácido oxálico, 0,1M ureia, 0,1M cloreto de potássio e água, para avaliar qual é o mais eficaz.

Como se pode verificar na figura 11, de todas as soluções utilizados, o NaOH foi o que melhor satisfaz as necessidades, sendo o que apresenta uma maior intensidade de corrente e uma maior variação da mesma.

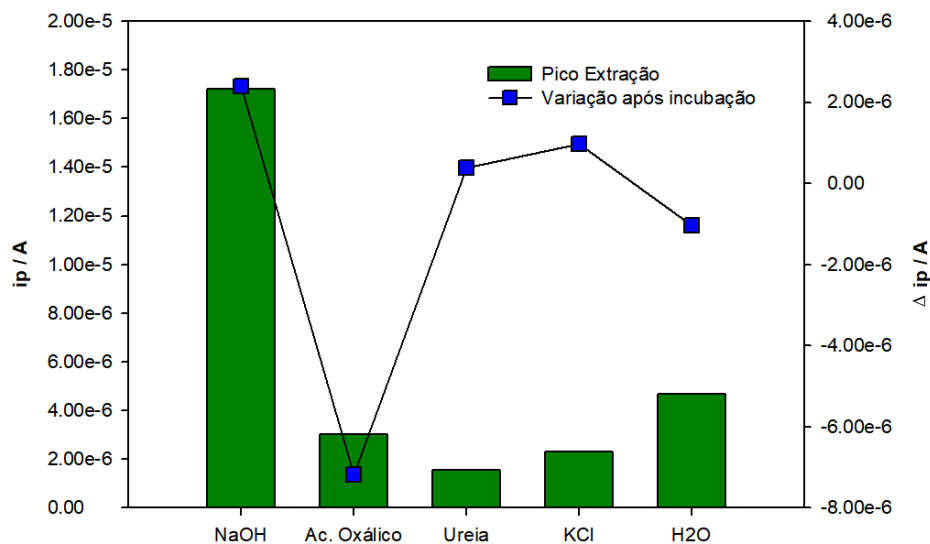


Figura 11 Resultados obtidos na otimização dos solventes de extração na síntese do MIP

4.1.6. Tempo de extração

Para além dos solventes de extração, também o tempo de extração é importante para que seja possível remover a Api g1 da matriz polimérica. Assim, foram estudados diferentes tempos de extração: 30, 60, 90, 120 e 180min. Concluiu-se que o melhor resultado foi obtido com um tempo de extração de 90min, sendo este utilizado para as seguintes extrações. O gráfico da figura 12 pode evidenciar o que foi citado anteriormente.

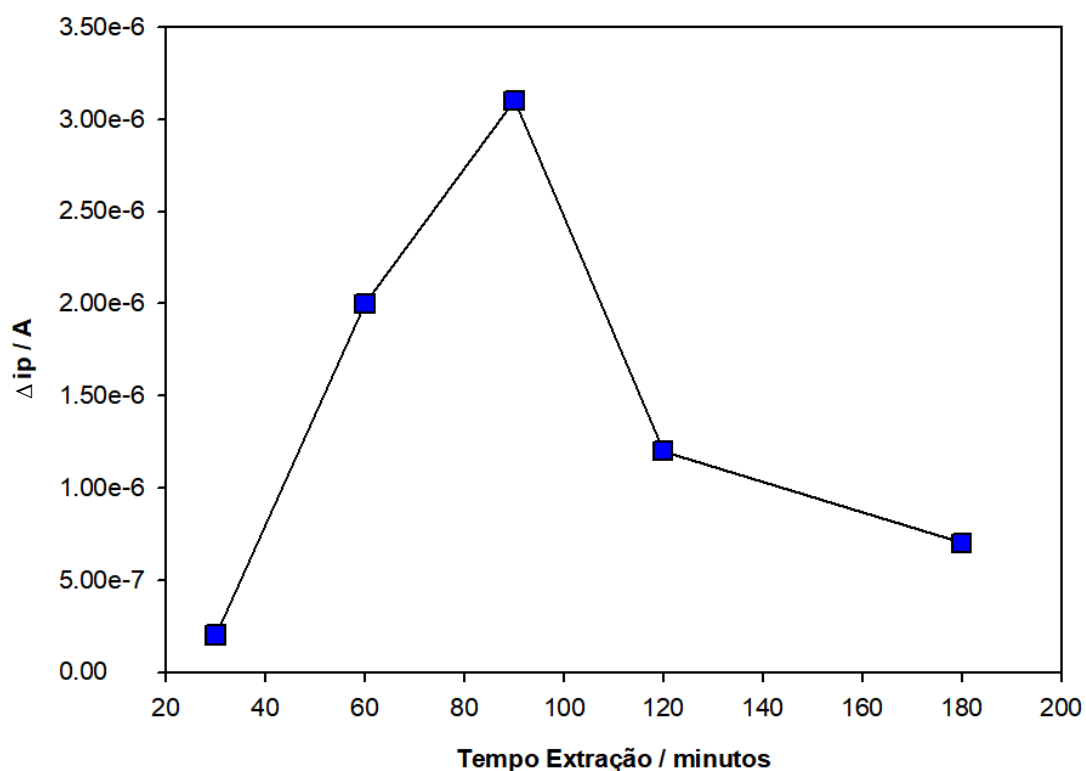


Figura 12 Resultados obtidos na otimização do tempo de extração

4.1.7. Tempo de incubação

Por fim, o tempo de incubação da proteína foi estudado, utilizando tempos de 5, 10, 15, 20 e 30min. Verificou-se que a resposta era melhor quando a incubação era de apenas 5min, como é possível comprovar no gráfico da figura 13.

Deste modo, começaram a ser utilizados 5 minutos para as incubações seguintes.

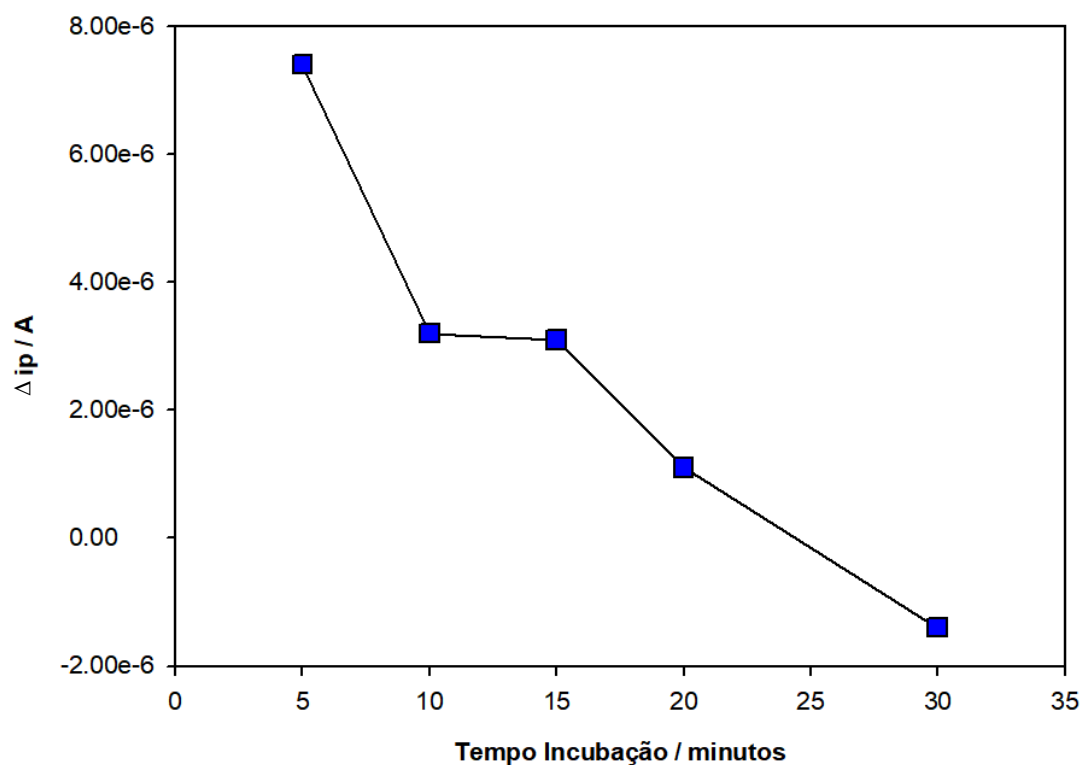


Figura 13 Resultados obtidos na otimização do tempo de incubação

4.2. Caracterização do sensor

A caracterização da construção e utilização do SPCE foi realizada passo a passo, através de medições CV, utilizando uma solução de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 1mM em solução tampão 0,1M e pH 7,0. Estas medições foram executadas após cada etapa de construção e funcionamento do sensor. Os resultados obtidos encontram-se na figura 14.

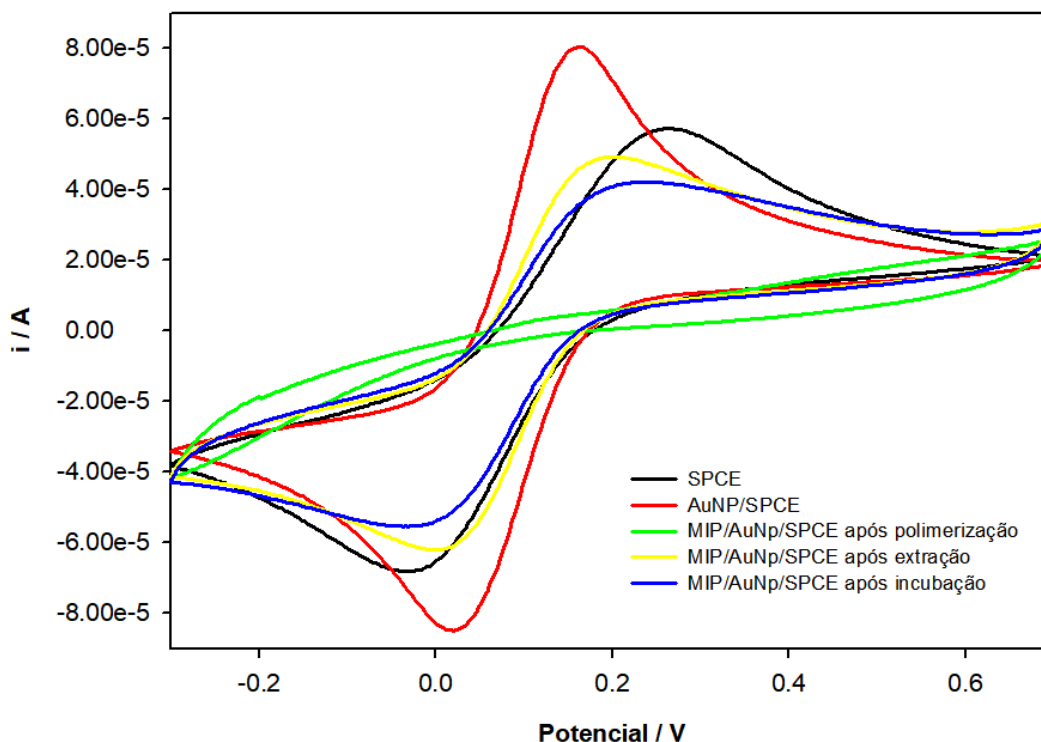


Figura 14 Caracterização de cada etapa da construção e funcionamento do sensor MIP

Através dos dados da figura 14 é possível verificar que existem dois picos característicos do par redox quando se utiliza o SPCE sem nenhuma modificação (voltamograma de cor preta). Após a eletrodeposição de nanopartículas de ouro na sua superfície é visível o aumento da intensidade de corrente desses picos e uma aproximação dos potenciais destes picos (voltamograma de cor vermelha), comprovando o aumento da área do eletrodo e o efeito eletrocatalítico das nanopartículas.

Após a polimerização, deixaram-se de observar estes picos (voltamograma de cor verde), o que é explicável pelo bloqueio que o polímero impresso exerce na superfície do sensor, não sendo possível de se realizar a transferência de eletrões.

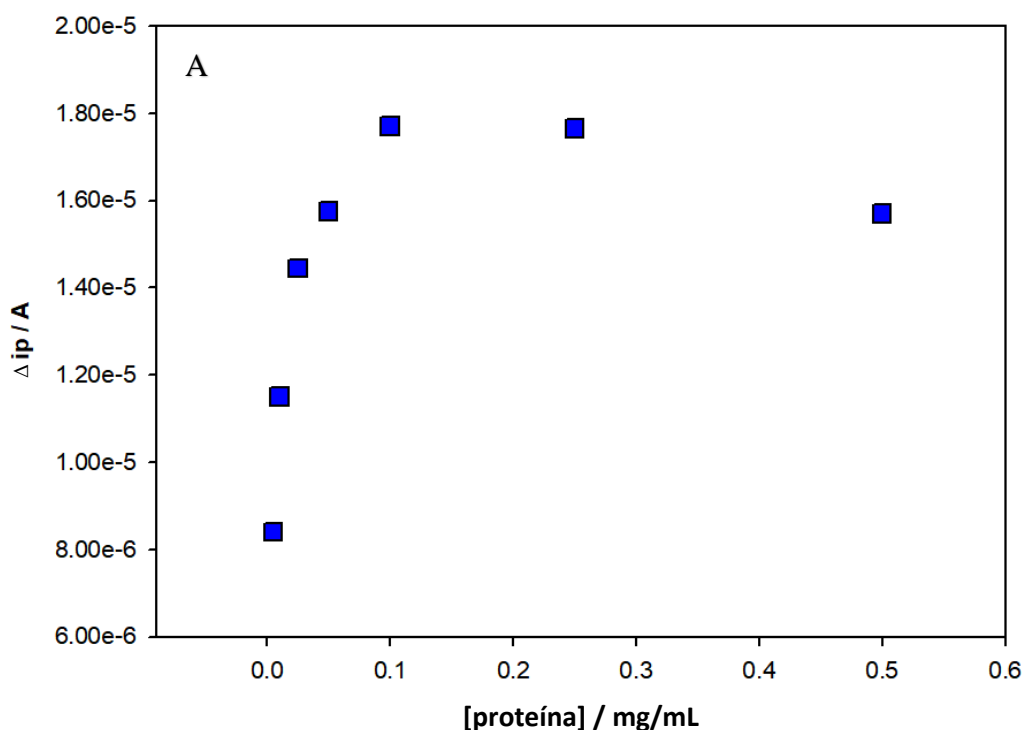
Após a extração é notória a remoção da proteína observando-se um aumento considerável da intensidade de corrente dos picos (voltamograma de cor amarela). Isto deve-se à formação de “cavidades livres”, o que facilita a difusão do ferro até a superfície do SPCE, possibilitando a oxidação-redução. É importante de notar que os picos de oxidação e de redução não se assemelham aos picos registados com o eletrodo modificado

com as nanopartículas de ouro, o que permite confirmar que não há a remoção do MIP após a extração.

Após a incubação com a proteína, observa-se novamente uma diminuição dos picos de oxidação e de redução devido ao facto da proteína preencher (parcialmente) as “cavidades livres”, mostrando a capacidade de ligação da Api g1 ao MIP. Neste caso a proteína impede a difusão do ferro até a superfície do SPCE, reduzindo as intensidades de corrente dos picos.

4.3. Avaliação da performance analítica do sensor

De modo a obter a reta de calibração para análise da Api g1, procedeu-se à avaliação da resposta analítica do sensor utilizando diferentes soluções de proteína com concentrações entre 0 e 500 $\mu\text{g/mL}$. Assim, foram realizadas incubações com cada uma das soluções e, posteriormente, usando DPV e as condições ótimas anteriormente estabelecidas, foi medido o sinal (figura 15).



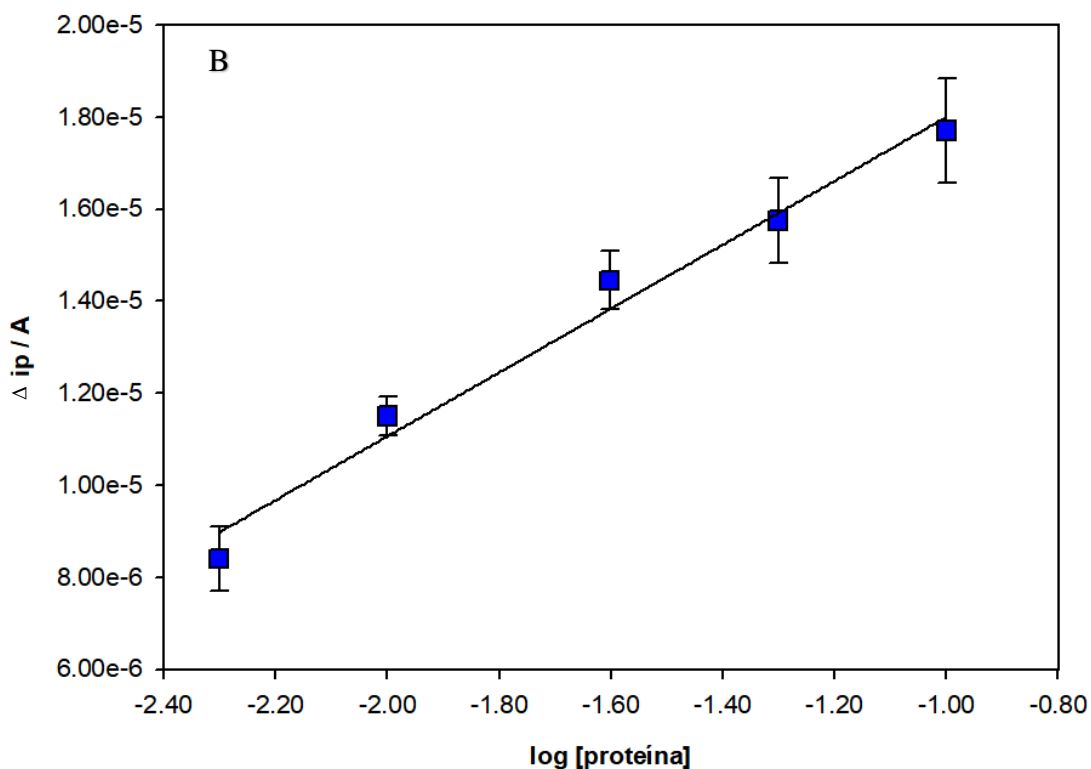


Figura 15 (A) Valores de Δi_p obtidas para concentrações entre 0 e 500 μ g/mL; (B) Reta de calibração do sensor MIP

Pela análise dos gráficos da figura 15 conclui-se que existe um aumento da Δi_p com a concentração da proteína Api g1 até 100 μ g/mL.

A reta de calibração foi construída utilizando o logaritmo da concentração da proteína, entre 5,00 e 100 μ g/mL, para um melhor ajuste: $y = 6,94 \times 10^{-6}x + 2,49 \times 10^{-5}$ ($R = 0,990$).

Para avaliar a precisão em termos de repetibilidade dos resultados foi analisada, em quintuplicado, uma solução de Api g1 de 100 μ g/mL. Obteve-se um coeficiente de variação de 15%, o que não é satisfatório.

5. Conclusões e Sugestões para trabalhos futuros

Factualmente, as alergias alimentares são uma temática em constante evolução e que cada vez mais afeta a população, o que transmite uma grande preocupação a todos os indivíduos. O aumento significativo de casos é motivo para a investigação mais aprofundada deste tema e das suas terapias de diagnóstico. A Api g1 é uma das proteínas do aipo que causa reações alérgicas e que tem sido objeto de estudo atualmente.

Da mesma forma, os sensores MIP têm sido alvo de um crescimento exponencial ao nível da investigação. Estes oferecem vantagens como a grande afinidade pela molécula alvo, o baixo custo associado e exibem algumas propriedades como a alta seletividade e estabilidade e o facto de serem modificáveis. Todos estes fatores contribuem para um aprimoramento na análise de alérgenos em tempo real.

Neste trabalho, um SPCE foi modificado, primeiramente, com nanopartículas de ouro e, de seguida, com um MIP (poli-o-fenilenodiamina) para deteção e quantificação da Api g1.

O MIP foi sintetizado por eletropolimerização e após os estudos de impressão molecular com monómeros condutores, os resultados obtidos não foram positivos. Por isso, priorizou-se o estudo da impressão com monómeros não condutores e medições indiretas da Api g1, usando o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.

Obtiveram-se resultados satisfatórios no que diz respeito à afinidade da proteína com o o-fenilenodiamina, levando a concluir que a interação entre ambos era legível para a preparação de um MIP com boa seletividade.

Seguidamente, procedeu-se às otimizações das condições de polimerização e à caracterização do sensor.

No final, avaliou-se a resposta analítica para as várias concentrações da proteína Api g1, onde se concluiu que há uma relação linear entre a variação da intensidade de corrente (Δi_p) e a concentração de proteína entre 0 e $100\mu\text{g/mL}$.

Durante a execução deste trabalho, surgiram alguns entraves relacionados com a dificuldade em obter uma boa interação entre o monómero e a proteína, sendo muito tempo dispensado à procura do monómero mais indicado a nível da afinidade com Api g1.

Desta forma, os estudos de seletividade e a aplicação de amostras alimentares não foi possível de se realizar devido à limitação do tempo.

Futuramente, propõe-se a aplicação do sensor à análise de amostras reais, averiguando o potencial que este tem para poder vir a ser comercializado.

Referências

- [1] C. Lozoya-Ibáñez *et al.*, “Prevalence and clinical features of adverse food reactions in Portuguese adolescents,” *World Allergy Organ. J.*, vol. 13, no. 8, p. 100453, 2020, doi: 10.1016/j.waojou.2020.100453.
- [2] J. Sánchez and A. Sánchez, “Epidemiologic studies about food allergy and food sensitization in tropical countries. Results and limitations,” *Allergol. Immunopathol. (Madr.)*, vol. 47, no. 4, pp. 401–408, 2019, doi: 10.1016/j.aller.2018.11.001.
- [3] S. Opinion, E. Panel, and D. Products, “Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes,” *EFSA J.*, vol. 12, no. 11, pp. 1–286, 2014, doi: 10.2903/j.efsa.2014.3894.
- [4] *Allergen Nomenclature*. Junho 2022. Obtido de <http://www.allergen.org/search.php?Species=Apium%20graveolens>
- [5] J. J. Belbruno, “Molecularly Imprinted Polymers,” *Chem. Rev.*, vol. 119, no. 1, pp. 94–119, 2019, doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00171.
- [6] *GRAQ (Grupo de Reação e Análises Químicas)*. Junho 2022. Obtido de <http://www.grap.isep.ipp.pt>
- [7] *REQUIMTE (Rede de química e tecnologia)*. Junho 2022. Obtido de <https://www.requimte.pt/>
- [8] W. A. Zukiewicz-Sobczak, P. Wróblewska, P. Adamczuk, and P. Kopczynski, “Causes, symptoms and prevention of food allergy,” *Postep. Dermatologii i Alergol.*, vol. 30, no. 2, pp. 113–116, 2013, doi: 10.5114/pdia.2013.34162.
- [9] M. De Martinis, M. M. Sirufo, M. Suppa, and L. Ginaldi, “New perspectives in food allergy,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 4, pp. 1–21, 2020, doi: 10.3390/ijms21041474.
- [10] Fu L, Cherayil B. L., S. H., W. Y., and Z. Y., “Food Allergy FOOD ALLERGY,” vol. 20, no. 4, p. 216, 2019.
- [11] S. Benedé, A. B. Blázquez, D. Chiang, L. Tordesillas, and M. C. Berin, “The rise of food allergy: Environmental factors and emerging treatments,” *EBioMedicine*, vol. 7, pp. 27–34, 2016, doi: 10.1016/j.ebiom.2016.04.012.

- [12] S. H. Sicherer and H. A. Sampson, “Food allergy,” *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 125, no. 2 SUPPL. 2, pp. S116–S125, 2010, doi: 10.1016/j.jaci.2009.08.028.
- [13] K. Bauermeister *et al.*, “Assessment of component-resolved in vitro diagnosis of celeriac allergy,” *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 124, no. 6, pp. 1273-1281.e2, 2009, doi: 10.1016/j.jaci.2009.07.033.
- [14] B. K. Ballmer-Weber, S. Vieths, D. Lüttkopf, P. Heuschmann, and B. Wüthrich, “Celery allergy confirmed by double-blind, placebo-controlled food challenge: A clinical study in 32 subjects with a history of adverse reactions to celery root,” *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 106, no. 2, pp. 373–378, 2000, doi: 10.1067/mai.2000.107196.
- [15] J. A. Lieberman and S. H. Sicherer, “The diagnosis of food allergy,” *Am. J. Rhinol. Allergy*, vol. 24, no. 6, pp. 439–443, 2010, doi: 10.2500/ajra.2010.24.3515.
- [16] H. Breiteneder *et al.*, “Molecular Characterization of Api g 1, the Major Allergen of Celery (*Apium graveolens*), and Its Immunological and Structural Relationships to a Group of 17-kDa Tree Pollen Allergens,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 233, no. 2, pp. 484–489, 1995, doi: 10.1111/j.1432-1033.1995.484_2.x.
- [17] B. K. Ballmer-Weber, “Food allergy in adolescence and adulthood,” *Chem. Immunol. Allergy*, vol. 101, pp. 51–58, 2015, doi: 10.1159/000371669.
- [18] (*Cellery Allergy | Anaphylaxis UK*). Junho 2022. Obtido de <https://www.anaphylaxis.org.uk/fact-sheet/celery-allergy/>
- [19] Parlamento Europeu; Conselho da União Europeia, “Regulamento (UE) N.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de Outubro de 2011 relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, que altera os Regulamentos (CE) n.º 1924/2006 e (CE) n.º 1925/2006 do Parlamento,” *J. Of. da União Eur.*, vol. L 304, pp. 18–63, 2011.
- [20] J. Shen, F. Dai, M. Cai, and H. Zhu, “Introduction to Electrochemical,” pp. 1–6, 2016.
- [21] M. N. Islam and R. B. Channon, “Electrochemical sensors,” *Bioeng. Innov. Solut. Cancer*, pp. 47–71, 2019, doi: 10.1016/B978-0-12-813886-1.00004-8.
- [22] F. R. Simões and M. G. Xavier, *Electrochemical Sensors*. Elsevier Inc., 2017.

- [23] Y. Wang, H. Xu, J. Zhang, and G. Li, "Electrochemical sensors for clinic analysis," *Sensors*, vol. 8, no. 4, pp. 2043–2081, 2008, doi: 10.3390/s8042043.
- [24] N. K. Bakirhan, B. Uslu, and S. A. Ozkan, *Sensitive and Selective Assay of Antimicrobials on Nanostructured Materials by Electrochemical Techniques*. Elsevier Inc., 2017.
- [25] A. Amine and H. Mohammadi, "Amperometry," *Encycl. Anal. Sci.*, no. September, pp. 85–98, 2019, doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.14204-0.
- [26] J. Of, E. Cuemistry, and R. June, "257 Review Coulometry," vol. 4, pp. 257–286, 1962.
- [27] P. C. Hauser, "The total charge passed between two electrodes in the redox reaction of an analyte is given by the Faraday equation:," *Sensors And Actuators*, pp. 234–240, 2005.
- [28] N. Shah, M. B. Arain, and M. Soylak, *Historical background: Milestones in the field of development of analytical instrumentation*. INC, 2020.
- [29] P. Batista Deroco, J. de F. Giarola, D. Wachholz Júnior, G. Arantes Lorga, and L. Tatsuo Kubota, *Paper-based electrochemical sensing devices*, 1st ed., vol. 89. Elsevier B.V., 2020.
- [30] A. García-Miranda Ferrari, S. J. Rowley-Neale, and C. E. Banks, "Screen-printed electrodes: Transitioning the laboratory in-to-the field," *Talanta Open*, vol. 3, no. December 2020, 2021, doi: 10.1016/j.talo.2021.100032.
- [31] Z. Taleat, A. Khoshroo, and M. Mazloum-Ardakani, "Screen-printed electrodes for biosensing: A review (2008-2013)," *Microchim. Acta*, vol. 181, no. 9–10, pp. 865–891, 2014, doi: 10.1007/s00604-014-1181-1.
- [32] O. D. Renedo, M. A. Alonso-Lomillo, and M. J. A. Martínez, "Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications," *Talanta*, vol. 73, no. 2, pp. 202–219, 2007, doi: 10.1016/j.talanta.2007.03.050.
- [33] *Methrom*. Junho 2022. Obtido de https://www.metrohm.com/pt_br/products/110/110.html
- [34] R. A. S. Couto, J. L. F. C. Lima, and M. B. Quinaz, "Recent developments,

- characteristics and potential applications of screen-printed electrodes in pharmaceutical and biological analysis,” *Talanta*, vol. 146, no. 228, pp. 801–814, 2016, doi: 10.1016/j.talanta.2015.06.011.
- [35] S. A. Zaidi, “Molecular imprinted polymers as drug delivery vehicles,” *Drug Deliv.*, vol. 23, no. 7, pp. 2262–2271, 2016, doi: 10.3109/10717544.2014.970297.
- [36] A. L. Hillberg, K. R. Brain, and C. J. Allender, “Molecular imprinted polymer sensors: Implications for therapeutics,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 57, no. 12, pp. 1875–1889, 2005, doi: 10.1016/j.addr.2005.07.016.
- [37] W. J. Cheong, S. H. Yang, and F. Ali, “Molecular imprinted polymers for separation science: A review of reviews,” *J. Sep. Sci.*, vol. 36, no. 3, pp. 609–628, 2013, doi: 10.1002/jssc.201200784.
- [37] Y. Saylan, S. Akgönüllü, H. Yavuz, S. Ünal, and A. Denizli, “Molecularly imprinted polymer based sensors for medical applications,” *Sensors (Switzerland)*, vol. 19, no. 6, 2019, doi: 10.3390/s19061279.
- [39] M. Bouabdallaoui, Z. Aouzal, S. Ben Jadi, M. Bazzaoui, R. Wang, and E. A. Bazzaoui, “Low potential electropolymerization and copolymerization of diphenylamine on aluminium,” *Electrochim. Acta*, vol. 430, no. July, p. 141016, 2022, doi: 10.1016/j.electacta.2022.141016.
- [40] R. D. Crapnell *et al.*, “Recent advances in electrosynthesized molecularly imprinted polymer sensing platforms for bioanalyte detection,” *Sensors (Switzerland)*, vol. 19, no. 5, 2019, doi: 10.3390/s19051204.