



# Desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico para a análise de um alergénio do amendoim (Ara h 1)

ANDRE FILIPE BASTOS CARVALHO

julho de 2021

# Desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico para a análise de um alergénio do amendoim (Ara h 1)

André Filipe Bastos Carvalho – 1150930

Dissertação

Mestrado em Engenharia Química

Ramo de Qualidade

## Orientação

Hendrikus Petrus Antonius Nouws

Maria Cristina Castro Freitas

## Centro de Investigação

GRAQ - Grupo de Reação e Análises Químicas



## Agradecimentos

Seria impossível realizar a presente dissertação com sucesso sem toda a ajuda e apoio recebido na sua duração, de tal modo que gostaria de deixar os seguintes agradecimentos:

Ao Doutor Hendrikus Nouws, por tanto me ter ajudado e orientado para que esta dissertação corresse da melhor forma possível em todos os aspetos e pela disponibilidade e dedicação que sempre me ofereceu.

À Doutora Maria Freitas, pela especial atenção diária que me deu e por dedicar tanto do seu tempo ao meu trabalho, sem a qual não conseguiria concretizar o meu objetivo nesta dissertação e por toda a experiência que obtive graças a ela, bem como na ajuda que me foi dada na adaptação e na integração no Centro de Investigação, GRAQ.

À Doutora Cristina Matos, pelo esforço para que fosse possível a realização deste trabalho.

A toda a minha família, que mesmo à distância, sempre proporcionou as condições necessárias para que fosse possível realizar esta etapa importante.

Finalmente, aos meus colegas do ISEP e amigos, por estarem presentes ao longo desta etapa.

*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) 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

As alergias alimentares afetam uma percentagem considerável da população mundial (cerca de 10%) e tendem a aumentar, constituindo um fator preocupante para a segurança alimentar e para a saúde pública. Não existem tratamentos para a alergia alimentar, sendo as únicas opções a prevenção ou a não ingestão do produto. Deste modo, os rótulos devem indicar obrigatoriamente informação sobre os alergénios. Por este motivo, a avaliação rigorosa da presença de alergénios em produtos alimentares e a deteção de quantidades vestigiais é de extrema relevância. O desenvolvimento de metodologias analíticas capazes de detetar e quantificar alergénios em amostras alimentares, de forma rápida e *in situ*, com elevada sensibilidade, precisão e exatidão, pode auxiliar a indústria alimentar na rotulagem e garantir a conformidade com a legislação. Neste sentido, a presente dissertação reporta o desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico para a análise do alergénio do amendoim, Ara h 1. Foram utilizados elétrodos serigrafados de carbono (SPCE) como plataformas transdutoras, nanoestruturados com nanodiamantes (NDs), e posteriormente biomodificados com um anticorpo de captura anti-Ara h 1. Na metodologia, efetuada em formato *sandwich*, após a ligação do alergénio ao anticorpo de captura, ocorre a interação entre um anticorpo de deteção biotinizado e o alergénio. Esta interação é reconhecida utilizando uma marca enzimática (fosfatase alcalina) conjugada com estreptavidina (S-AP). Após a adição do substrato enzimático juntamente com nitrato de prata, o sinal analítico é obtido através da oxidação de um dos produtos de reação (prata metálica) por voltametria de varrimento linear (LSV). Após a otimização das condições experimentais, o desempenho analítico do imunossensor foi avaliado, sendo estabelecida uma gama de linearidade entre 25 e 500 ng/mL de Ara h 1, com um limite de deteção de 0,78 ng/mL. Os resultados obtidos demonstram uma boa precisão (coeficiente de variação  $V_{x0}$  (%)  $\approx 10$ ), num tempo total de ensaio de 2 horas e 20 minutos. A análise do analito em amostras alimentares foi realizada com sucesso e o método foi validado utilizando a técnica *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). As análises efetuadas permitem inferir que o imunossensor desenvolvido possibilita a deteção de quantidades vestigiais de amendoim em amostras alimentares, tendo elevado potencial de aplicação no controlo de qualidade em empresas e/ou fornecedores da área alimentar e por entidades reguladoras.

**Palavras-chave:** imunossensor eletroquímico, elétrodo serigrafado de carbono (SPCE), nanodiamantes, alergia alimentar, amendoim, Ara h 1, alergénio, voltametria de varrimento linear, produtos alimentares.



## Abstract

Food allergies affect a significant percentage of the world population (about 10%) with a tendency to increase, representing a worrying condition for food safety and public health. There are no treatments for food allergy and the only options are prevention or avoidance of food intake. Therefore, product labels must declare and clearly indicate information about allergens. For this reason, the rigorous evaluation of the presence of allergens in food products and the detection of trace amounts is of utmost importance. The development of analytical methodologies that can detect and quantify allergens in food samples *in situ*, with high sensitivity, precision, and accuracy, can support the food industry to efficiently label and ensure compliance with legislation. Thus, the present dissertation reports the development of an electrochemical immunosensor for the analysis of a major peanut allergen, Ara h 1. Screen-printed carbon electrodes (SPCE) were used as transducers, nanostructured with nanodiamonds (NDs), and biomodified with the capture antibody anti-Ara h 1. In a sandwich format methodology, the interaction between a biotinylated detection antibody and the allergen occurs after the specific recognition of the allergen by the capture antibody. The antibody-antigen interaction is recognized using an enzyme (alkaline phosphatase) conjugated with streptavidin (S-AP). The analytical signal is obtained by adding the enzymatic substrate, previously mixed with silver nitrate, followed by the oxidation of one of the reaction products (metallic silver) using linear sweep voltammetry (LSV). With the optimized experimental conditions, the analytical performance of the immunosensor was evaluated and a linear range was established between 25 and 500 ng/mL of Ara h 1, with a detection limit of 0.78 ng/mL. The obtained results confirm a good precision (coefficient of variation  $V_{x0}$  (%)  $\approx 10$ ), in a total assay time of 2 hours and 20 minutes. The analysis of Ara h 1 in food samples was successfully performed and the method was validated using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). The obtained data demonstrate that the developed immunosensor enables the detection of trace amounts of peanuts in food samples, with a high potential for application in quality control in food companies and/or suppliers and by regulatory entities.

**Keywords:** electrochemical immunosensor, screen-printed carbon electrode (SPCE), nanodiamonds, food allergy, peanut, Ara h 1, allergen, linear sweep voltammetry, food products.



## Índice

Lista de Abreviaturas e Siglas .....	vii
1. Introdução .....	1
1.1. Enquadramento.....	1
1.2. Tema e Objetivos.....	1
1.3. Apresentação do Centro de Investigação .....	2
2. Fundamentos Teóricos.....	3
2.1. Alergia Alimentar.....	3
2.2. Controlo Alimentar.....	4
2.3. Amendoim e Ara h 1.....	5
2.4. Métodos de Análise para Ara h 1 .....	6
2.4.1. Ensaio Imunológico .....	7
2.4.2. Métodos baseados em ADN.....	8
2.4.3. Espectrometria de massa.....	8
2.4.4. Biossensores.....	9
2.4.4.1. Imunossensores eletroquímicos .....	9
2.4.4.2. Nanotecnologia e nanomateriais .....	11
2.4.5. Voltametria .....	12
2.5. Imunoensaios eletroquímicos para a análise de Ara h 1 .....	14
3. Material e Métodos.....	15
3.1. Material e Equipamento .....	15
3.2. Reagentes.....	15
3.3. Soluções .....	16
3.4. Procedimento experimental .....	16
3.4.1. Nanoestruturação do SPCE .....	16
3.4.2. Imobilização do anticorpo de captura.....	17

3.4.3.	Construção do imunossensor e deteção eletroquímica .....	17
3.4.4.	Preparação da amostra alimentar.....	18
3.5.	Validação do método .....	19
4.	Resultados e Discussão .....	21
4.1.	Técnicas eletroquímicas: CV vs LSV.....	21
4.2.	Nanoestruturação do SPCE e Seleção do Solvente .....	22
4.3.	Otimização da Concentração de ND .....	24
4.4.	Otimização da Concentração do Anticorpo de Captura (CAb) e da Diluição da solução do Anticorpo de Deteção (DAb) .....	25
4.5.	Otimização da Diluição da solução da Enzima Fosfatase Alcalina conjugada com estreptavidina (S-AP).....	27
4.6.	Otimização do Formato do Ensaio e do Tempo de Incubação.....	28
4.7.	Síntese da Otimização das Variáveis Experimentais .....	30
4.8.	Avaliação do Funcionamento do Sensor .....	31
4.9.	Caraterização do Método.....	32
4.10.	Precisão e Estabilidade do sensor .....	34
4.11.	Estudo da Seletividade e Interferentes .....	35
4.12.	Estudos de Recuperação .....	36
4.13.	Otimização da Diluição da Amostra Alimentar e Quantificação de Ara h 1 em Amendoim.....	37
4.14.	Fortificação de uma Amostra Alimentar com Diferentes Percentagens de Amendoim .....	38
4.15.	Análise de Amostras Alimentares: Imunossensor vs ELISA.....	39
4.16.	Comparação com Trabalhos Anteriores.....	44
5.	Conclusão .....	47
	Referências Bibliográficas .....	49
	Anexos .....	53
A.	Cálculo da massa de Ara h 1 em amostras alimentares.....	53

## Índice de Figuras

Figura 1 – Rótulos de produtos alimentares. (A) Bolacha que contém 8% de Amendoim; (B) Bolacha sem indicação da presença de Amendoim; (C) Bolacha que pode conter vestígios de Amendoim.....	5
Figura 2 - Representação esquemática de um ensaio ELISA com formato sandwich [20]. .....	7
Figura 3 - Representação de um sistema analítico de um imunossensor eletroquímico, com formato sandwich utilizando elérodos de carbono serigrafados (SPCE). Adaptado de [25, 29]. .....	10
Figura 4 – Representação esquemática de um SPCE. ....	10
Figura 5 - Fluxograma da construção do imunossensor (esquerda) e representação esquemática do desenvolvimento do imunossensor eletroquímico (direita).....	18
Figura 6 - Voltamogramas obtidos na deteção de Ara h 1 (0 e 250 ng/mL) utilizando: (A) voltametria cíclica (CV); (B) voltametria de varrimento linear (LSV). Parâmetros Experimentais: CA <sub>b</sub> 25 µg/mL; DA <sub>b</sub> 1:500; S-AP 1:150,000; 3-IP/Ag <sup>+</sup> 1 mM/0,4 mM.....	21
Figura 7 – Nanoestruturação do SPCE com nanomateriais de carbono de diferentes dimensões. Parâmetros Experimentais: Ara h 1 (0 e 250 ng/mL); CA <sub>b</sub> 25 µg/mL; DA <sub>b</sub> 1:500; S-AP 1:150,000; 3-IP/Ag <sup>+</sup> 1 mM/0,4 mM.....	22
Figura 8 – Diferentes solventes utilizados para a otimização da dispersão dos NDs. Parâmetros Experimentais: Ara h 1 (0 e 250 ng/mL); CA <sub>b</sub> 25 µg/mL; DA <sub>b</sub> 1:500; S-AP 1:150,000; 3-IP/Ag <sup>+</sup> 1 mM/0,4 mM.....	23
Figura 9 - Resultados do estudo da concentração de ND. Parâmetros Experimentais: Ara h 1 (0 e 250 ng/mL); CA <sub>b</sub> 25 µg/mL; DA <sub>b</sub> 1:500; S-AP 1:150,000; 3-IP/Ag <sup>+</sup> 1 mM/0,4 mM. ....	24
Figura 10 – Otimização da concentração do CA <sub>b</sub> . Parâmetros Experimentais: Ara h 1 (0 e 250 ng/mL); DA <sub>b</sub> 1:500; S-AP 1:150,000; 3-IP/Ag <sup>+</sup> 1 mM/0,4 mM. ....	25
Figura 11 - Otimização da concentração do DA <sub>b</sub> . Parâmetros Experimentais: Ara h 1 (0 e 250 ng/mL); CA <sub>b</sub> 10 µg/mL; S-AP 1:150,000; 3-IP/Ag <sup>+</sup> 1 mM/0,4 mM. ....	26
Figura 12 - Otimização da concentração do S-AP. Parâmetros Experimentais: Ara h 1 (0 e 250 ng/mL); CA <sub>b</sub> 10 µg/mL; DA <sub>b</sub> 1:250; 3-IP/Ag <sup>+</sup> 1 mM/0,4 mM.....	27
Figura 13 - Otimização do formato. Parâmetros Experimentais: Ara h 1 (0 e 250 ng/mL); CA <sub>b</sub> 10 µg/mL; DA <sub>b</sub> 1:250; S-AP 1:200,000; 3-IP/Ag <sup>+</sup> 1 mM/0,4 mM. ....	28
Figura 14 – Otimização do tempo total de ensaio utilizando o formato 1. (A) Ara h 1, 60 minutos; DA <sub>b</sub> , 60 minutos; S-AP, 30 minutos; (B) Ara h 1, 60 minutos; DA <sub>b</sub> , 30 minutos; S-AP, 30 minutos;	

(C) Ara h 1, 30 minutos; DAb, 60 minutos; S-AP, 30 minutos. Parâmetros Experimentais: Ara h 1 (0 e 250 ng/mL); CAb 10 µg/mL; DAb 1:250; S-AP 1:200,000; 3-IP/Ag <sup>+</sup> 1 mM/0,4 mM. ....	29
Figura 15 – Avaliação do funcionamento do imunossensor. Parâmetros Experimentais: Ara h 1 (0 e 250 ng/mL); CAb 10 µg/mL; DAb 1:250; S-AP 1:200,000; 3-IP/Ag <sup>+</sup> 1 mM/0,4 mM. ....	31
Figura 16 – A - Retas de calibração para análise de Ara h 1 ( <i>i<sub>p</sub></i> vs concentração de Ara h 1); B – Exemplos de voltamogramas LSV obtidos para a gama de concentrações linear (0, 25, 50, 100, 250 e 500 ng/mL). Parâmetros Experimentais: CAb 10 µg/mL; DAb 1:250; S-AP 1:200,000; 3-IP/Ag <sup>+</sup> 1 mM/0,4 mM. ....	32
Figura 17 - Estudo da estabilidade do sensor. Parâmetros Experimentais: Ara h 1 (0 e 250 ng/mL); CAb 10 µg/mL; DAb 1:250; S-AP 1:200,000; 3-IP/Ag <sup>+</sup> 1 mM/0,4 mM. ....	34
Figura 18 - Estudo da seletividade e interferentes utilizando proteínas alergénicas alvo (Ara h 1 - Controlo) e não-alvo (Ara h 2, Ara h 6 e Gal d 2). Parâmetros Experimentais: Ara h 1 (0 e 250 ng/mL); CAb 10 µg/mL; DAb 1:250; S-AP 1:200,000; 3-IP/Ag <sup>+</sup> 1 mM/0,4 mM. ....	35
Figura 19 - Extrato de bolacha fortificado com Ara h 1 (0, 50, 100, 250 e 500 ng/mL). Parâmetros Experimentais: CAb 10 µg/mL; DAb 1:250; S-AP 1:200,000; 3-IP/Ag <sup>+</sup> 1 mM/0,4 mM. ....	36
Figura 20 - Otimização da diluição da amostra alimentar (manteiga de amendoim em pó). Parâmetros Experimentais: CAb 10 µg/mL; DAb 1:250; S-AP 1:200,000; 3-IP/Ag <sup>+</sup> 1 mM/0,4 mM. ....	37
Figura 21 – Massa de Ara h 1 quantificada na amostra alimentar (mg/g) vs Amendoim adicionado (%). ....	38
Figura 22 - Quantificação em mg/g de Ara h 1 em amostras alimentares e resultados obtidos para a adição de amendoim em diferentes % (10 %; 5,0 %; 2,5 %; 1,0 %; 0,5 %; 0,1 %) numa amostra alimentar (bolacha sem amendoim). Legenda: 1 - Farinha; 2 - Barra Energética (sem amendoim); 3 - Barra Proteica (5% de amendoim); 4 - Barra Proteica (12% de amendoim); 5 - Tremço; 6 - Bolacha Belga; 7 - Bolacha Água e Sal; 8 - Bolacha Maria; 9 - Bolacha de Amendoim e Ananás (8% de amendoim); 10 - Cereal Integral; 11 - Granola; 12 - Muesli; 13 - Aveia; 14 - Ervilha; 15 - Soja; 16 - Amêndoa; 17 - Avelã. ....	40
Figura 23 – Correlação entre os resultados obtidos utilizando o imunossensor eletroquímico vs. ELISA. ....	43

## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Sinais de excitação e respetivos voltamogramas de CV e LSV [35].....	13
Tabela 2 – Resultado das otimizações das variáveis experimentais para o desenvolvimento do imunossensor.....	30
Tabela 3 – Figuras de mérito do imunossensor desenvolvido para análise do Ara h 1.....	33
Tabela 4 - Valores obtidos para o estudo da recuperação de Ara h 1.....	36
Tabela 5 – Resultados obtidos para a quantificação de Ara h 1 (mg/g) num conjunto de amostras alimentares.....	41
Tabela 6 – Características de imunossensores e imunoenaios eletroquímicos para análise de Ara h 1.....	44



## Lista de Abreviaturas e Siglas

3-IP – 3-Indoxil Fosfato

11-MUA – Ácido 11-Mercaptoundecanoico

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

AE – Eléctrodo Auxiliar, do inglês *Auxiliary Electrode*

AP – Fosfatase Alcalina

AuE – Eléctrodo convencional de Ouro

AuNPs – Nanopartículas de Ouro

B1 – Solução Tris-HNO<sub>3</sub> [0,1M], pH 7.2

B1-BSA – Solução Tris-HNO<sub>3</sub> [0,1M], pH 7.2 + BSA 1% (m/V)

B2 – Solução Tris-HNO<sub>3</sub> [0,1M], pH 9.8 + Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> [2×10<sup>-2</sup>M]

BSA – Albumina do Soro Bovino

CAb – Anticorpo de Captura, do inglês *Capture Antibody*

DAb – Anticorpo de Deteção, do inglês *Detection Antibody*

EIS – Espetroscopia de Impedância Electroquímica, do inglês *Electrochemical Impedance Spectroscopy*

ELISA – Ensaio de Imuno-Absorção Enzimática, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

GO – Grafeno oxidado

GRAQ – Grupo de Reação e Análises Químicas

HPLC-MS – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Espetrometria de Massa

HRP – Peroxidase de raiz-forte, do inglês *Horseradish Peroxidase*

IgE – Imunoglobulina E

IUIS – *International Union of Immunological Societies*

LSV – Voltametria de Varrimento Linear, do inglês *Linear Sweep Voltammetry*

MBs – Partículas Magnéticas

MWCNT – Nanotubos de Carbono de parede dupla, do inglês *Multi-Walled Carbon Nanotubes*

Nd – Não detetável

NDs – Nanodiamantes

PCR – Reação em cadeia da polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*

RE – Eléctrodo de Referência, do inglês *Reference Electrode*

rGO – Óxido de grafeno reduzido, do inglês *Reduced graphene oxide*

SPCE – Eléctrodo de carbono serigrafado, do inglês *Screen Printed Carbon Electrode*

SPE – Eléctrodo serigrafado, do inglês *Screen Printed Electrode*

SWCNT – Nanotubos de Carbono de parede simples, do inglês *Single Walled Carbon Nanotubes*

S-AP – Fosfatase Alcalina conjugada com estreptavidina

Tris – Tris(hidroximetil)aminometano

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

## 1. Introdução

### 1.1. Enquadramento

O presente trabalho foi realizado no âmbito da unidade curricular de Dissertação/Estágio do Mestrado em Engenharia Química, ramo de Qualidade, do Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP).

Os estudos conducentes à realização do trabalho proposto foram efetuados no Grupo de Reação e Análises Químicas (GRAQ), situado no ISEP.

### 1.2. Tema e Objetivos

A dissertação tem como tema “Desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico para a análise um alergénio do amendoim (Ara h 1)” com o objetivo de rastrear e/ou quantificar um alergénio constituinte da fração proteica do amendoim (*Arachis Hypogea*) em produtos alimentares.

Contextualizando, o amendoim é um dos alimentos que quando ingerido pode provocar reações alérgicas severas em consumidores com maior sensibilidade a esta alergia, sendo por isso importante a sua deteção, de forma rápida e precisa, em produtos alimentares para prevenir, controlar e quando necessário ou possível, tratar os sintomas que possam surgir.

### 1.3. Apresentação do Centro de Investigação

O GRAQ é um grupo de investigação do ISEP que integra a Rede de Química e Tecnologia (REQUIMTE), Laboratório Associado para a Química Verde (LAQV). REQUIMTE/LAQV é o centro português de investigação em Química Sustentável e uma das maiores redes de Química e Engenharia Química em Portugal. Atualmente, REQUIMTE/LAQV-GRAQ contribui para o desenvolvimento, aplicação e divulgação de conhecimento, assim como promove a inovação em áreas de investigação que envolvem a Química Analítica, o Ambiente e a Sustentabilidade [1].

## 2. Fundamentos Teóricos

Ao longo dos anos é cada vez mais perceptível o papel fundamental que a alimentação desempenha na saúde, sendo que a constante evolução industrial e científica no setor alimentar contribui para a mudança de hábitos, rotinas e exigências/requisitos na alimentação. O consumo alimentar torna-se cada vez mais complexo devido à diversidade proporcionada pela comercialização e promoção de produtos inovadores e/ou na inserção de alimentos como ingredientes em novas formulações alimentares, condicionando um risco de saúde imediato e potencialmente fatal a consumidores alérgicos. Assim, a avaliação rigorosa da presença de alergénios em alimentos utilizando metodologias capazes de prevenir esta condicionante é de extrema relevância para a saúde humana.

### 2.1. Alergia Alimentar

A alergia alimentar consiste numa hipersensibilidade imunológica a certas proteínas ou glicoproteínas alimentares, geralmente mediadas pela Imunoglobulina E (IgE). Os sintomas e/ou reações alérgicas afetam sobretudo o trato intestinal (p. ex. diarreia), a pele (p. ex. dermatite atópica) e o sistema respiratório (p. ex. asma e bronquite), tendo um impacto negativo significativo na qualidade de vida de pessoas alérgicas [2-4]. Uma das reações alérgicas mais preocupantes e severas que o consumo de alergénios pode causar, diz respeito à anafilaxia, que consiste numa reação alérgica sistémica, ou seja, que afeta todo o organismo e sistemas, produzindo sintomas graves como o sufoco (sistema respiratório) ou a queda da tensão arterial (choque anafilático; sistema cardiovascular) [5].

A alergia alimentar é um termo coletivo para várias respostas imunomediadas aos alimentos. O valor limite ou limiar (do inglês *threshold*) pode ser definido como a quantidade máxima de um alimento alergénico que pode ser tolerada sem produzir qualquer reação adversa. Por conseguinte, um limite individual consiste na quantidade máxima de um alimento que pode ser tolerada por um indivíduo alérgico a um alimento ou produto alimentar específico [6].

O intervalo de doses mínimas necessárias para provocar uma reação em pessoas alérgicas estende-se numa gama ampla, de microgramas a gramas. Trabalhos recentemente publicados na literatura caracterizam a distribuição destas doses na população alérgica, tornando possível avaliar os riscos de alérgenos quantitativamente. No caso específico do amendoim, as doses que desencadeiam respostas ao alimento alérgico (do inglês *Eliciting Doses*, ED<sub>05</sub>) correspondem a 1,5 mg de proteína de amendoim (6 mg de amendoim inteiro) [6].

As alergias alimentares afetam cerca de 10% da população mundial (com maior prevalência em crianças, 6%, do que em adultos, 4%), número que tende a aumentar nos países mais desenvolvidos, constituindo um problema de saúde pública e um fator preocupante para a segurança alimentar [7]. Dos 10%, cerca de 80% corresponde a alergia ao amendoim [8]. Para além do amendoim, os alimentos que mais provocam alergias alimentares são o leite de vaca, ovo, frutos de casca rija (conhecidos por “frutos secos”), peixe, marisco, trigo e soja [9].

## 2.2. Controlo Alimentar

A alergia alimentar é geralmente contornada pela prevenção no consumo de alérgenos (evitar ingestão de alimentos com alérgenos específicos na sua composição) e/ou no tratamento dos sintomas consequentes, aquando da ingestão não intencional. A rotulagem correta e assertiva de alimentos é particularmente relevante, uma vez que permitirá aos consumidores realizarem uma escolha ponderada e informada para a implementação de uma estratégia de prevenção bem-sucedida. No entanto, podem ocorrer contaminações cruzadas durante o processamento de alimentos ou ingredientes com outros produtos, ocultos ou adicionados acidentalmente, que contêm alérgenos, o que pode prejudicar a correta rotulagem. Por este motivo, os fabricantes de alimentos geralmente incluem um rótulo preventivo no produto (“Pode conter vestígios de...”), de forma a prevenir e a proteger os indivíduos com maior sensibilidade a alérgenos, o que reduz as opções disponíveis, especificamente para estes consumidores [10]. Nesta perspetiva, métodos precisos e altamente sensíveis devem avaliar se um determinado alérgeno se encontra ou não presente num certo alimento ou produto alimentício. Na figura 1, é possível observar exemplos de rótulos de produtos alimentares obtidos comercialmente (bolachas) que evidenciam: (A) presença de amendoim (em percentagem ou em quantidade vestigial), (B) ausência de amendoim, (C) possibilidade de conter vestígios de amendoim.

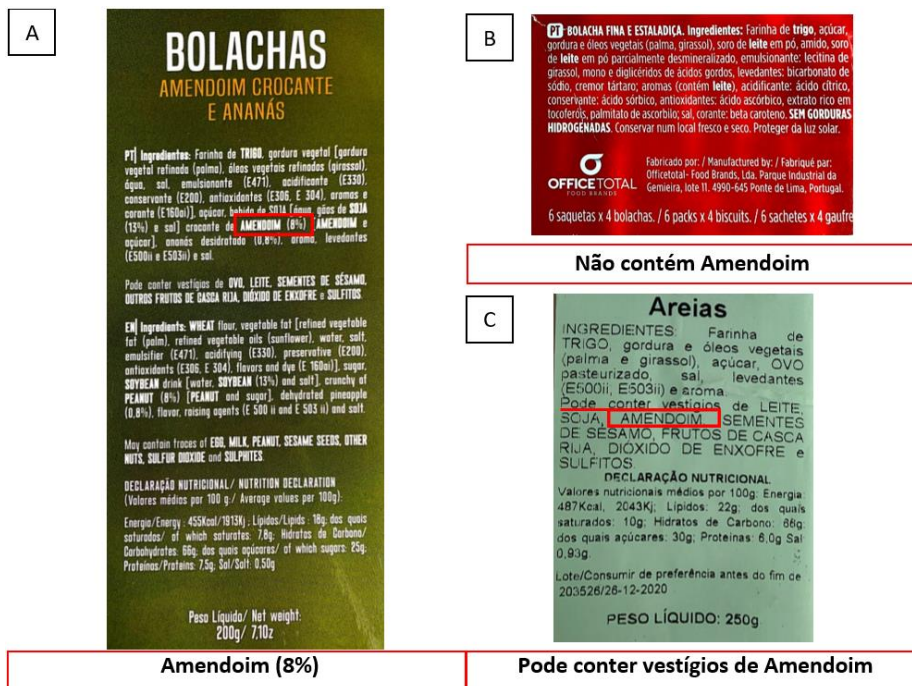


Figura 1 – Rótulos de produtos alimentares. (A) Bolacha que contém 8% de Amendoim; (B) Bolacha sem indicação da presença de Amendoim; (C) Bolacha que pode conter vestígios de Amendoim.

Tendo em conta as alergias alimentares, a rotulagem dos produtos consumíveis deve indicar claramente a presença e/ou ausência de alérgenos, a negrito, como observado na figura 1. Nas empresas alimentares, onde há possíveis contaminações cruzadas, o rótulo deve evidenciar que poderá conter vestígios de outros alérgenos [11].

### 2.3. Amendoim e Ara h 1

O amendoim (*Arachis hypogaea*) é um legume, rico em aminoácidos essenciais, gorduras insaturadas (mono e poli) e com elevado teor proteico na sua constituição, tornando-o uma fonte saudável de proteínas. Contudo, apresenta uma composição nutricional semelhante à dos produtos oleaginosos (p. ex. amêndoas, castanhas do brasil, cajú, avelãs, macadâmias, nozes, pinhões, pistachios e nozes), sendo por isso geralmente incluído no grupo dos frutos oleaginosos. São compostos por duas partes: uma casca dura externa não comestível e uma semente comestível. A alergia ou reação alérgica ao amendoim (ingestão da semente) pode variar de sintomas moderados a graves, sendo que, mesmo em pequenas quantidades, pode induzir reações severas em certos indivíduos alérgicos [12-13]. Por este motivo, a sua presença em produtos alimentícios deve ser declarada no rótulo do produto.

De acordo com o *Subcommittee* de nomenclatura da *International Union of Immunological Societies* (IUIS) [14], estão identificados, até ao momento, dezoito alergénios de amendoim. Ara h 1, 2 e 3 são considerados os alergénios de maior prevalência. Recentemente, Ara h 6 tem sido referido como um potencial alergénio a ser estudado para a deteção de vestígios de amendoim em alimentos comerciais por ser mais estável à digestão péptica do que Ara h 1 [15]. Em regiões mediterrâneas, Ara h 9 é descrita como tendo elevada prevalência [16].

Os alergénios do amendoim podem diferenciar-se pela capacidade em causar respostas no organismo alérgico e são diferenciados de acordo com o grupo/tipo ao qual estão associados, nomeadamente: Ara h 1 – Cupim (globulina 7S); Ara h 2 – Conglutina (albumina 2S); Ara h 3 – Cupim (globulina 11S); Ara h 6 – Conglutina (albumina 2S); Ara h 9 – Proteína de transferência de lipídios não específica, etc. [14].

Ara h 1 é uma proteína de armazenamento de sementes de *Arachis hypogaea* (amendoim) e um importante alergénio do amendoim. É termoestável e resistente à digestão no trato gastrointestinal humano e é reconhecido pela IgE em mais de 90% dos pacientes alérgicos ao amendoim [17]. Portanto, é considerado um analito específico adequado para identificar a presença do amendoim em produtos alimentares.

## 2.4. Métodos de Análise para Ara h 1

Numa perspetiva de saúde pública e segurança alimentar, é pretendido dar resposta às necessidades dos consumidores alérgicos e contribuir para uma rotulagem mais exata dos produtos alimentícios. Assim, há a necessidade de utilizar métodos eficientes, capazes de detetar quantidades muito baixas de alergénios do amendoim.

A deteção de alergénios em alimentos pode ser uma tarefa de difícil concretização devido à sua presença, geralmente, em pequenas quantidades, bem como à interferência natural da matriz do alimento e/ou produto alimentar. Os métodos de análise de alergénios podem ser divididos, principalmente, em ensaios imunológicos e em ensaios baseados na deteção do ácido desoxirribonucleico (ADN). A espetrometria de massa tem sido usada como ferramenta de confirmação [10].

### 2.4.1. Ensaios Imunológicos

A metodologia/técnica mais conhecida e usada recorrendo a ensaios imunológicos para quantificar antigénios e anticorpos é denominada ELISA (Ensaio de Imuno-Absorção Enzimática, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Nesta metodologia utiliza-se uma enzima que, após interação com o imunocomplexo formado, reage com o seu substrato, provocando uma alteração da cor da solução. É um método de elevada precisão, sensibilidade e de fácil manuseio que permite detetar uma substância específica (antigénio) numa amostra. O ELISA pode ser efetuado de formas distintas, classificando-se como competitivo, não-competitivo (*sandwich*) ou *label-free* [18].

Existe um número elevado de kits ELISA comerciais que são utilizados para detetar uma grande variedade de alérgenos em alimentos, sendo o formato *sandwich* mais vulgarmente usado [19]. Neste caso, promove-se a ligação entre um anticorpo de captura e um alérgeno contido numa amostra, adiciona-se um segundo anticorpo (de deteção) específico para o antigénio e posteriormente uma enzima, que em reação com o seu substrato, produzirá uma cor de intensidade variável, proporcional à quantidade de alérgeno em análise na amostra.

Na figura 2 é possível observar uma representação esquemática de um ensaio ELISA com formato *sandwich* [20].

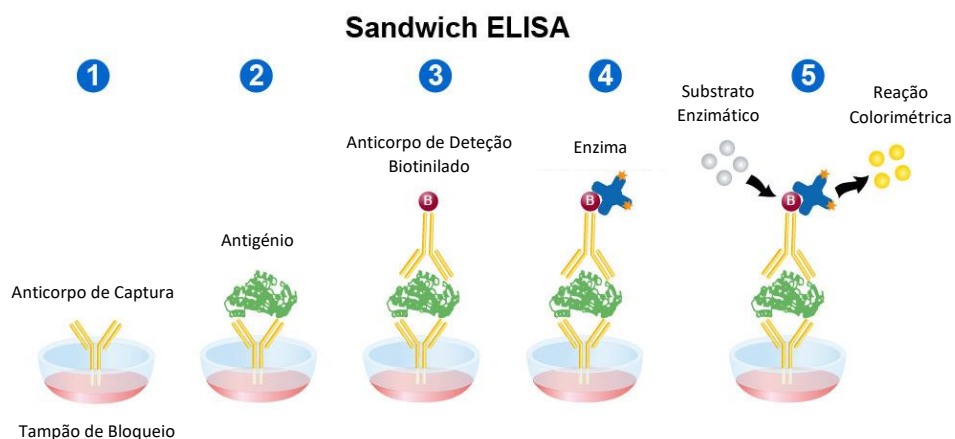


Figura 2 - Representação esquemática de um ensaio ELISA com formato *sandwich* [20].

Contudo, esta metodologia apresenta limitações uma vez que a análise é morosa e o kit é dispendioso mesmo para um número reduzido de amostras [21].

### 2.4.2. Métodos baseados em ADN

Os métodos baseados na deteção de ADN envolvem a extração de um fragmento específico de ADN codificador de um alergénio (ou proteína marcadora) seguido de uma amplificação por reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction* - PCR) [10], permitindo detetar o gene de um alergénio do amendoim.

Embora muito específicos e sensíveis, estes métodos podem ser controversos, uma vez que o processamento pode afetar de forma diferente os ácidos nucleicos e proteínas da amostra, sendo por isso considerados menos apropriados para a deteção de alergénios de alimentos ricos em proteínas. Nestas metodologias é necessário recorrer a um número elevado de réplicas de ensaios para obter resultados credíveis. Para além deste facto, os níveis de alergénio do ADN codificador podem não indicar corretamente a presença do alergénio em estudo (falso positivo ou falso negativo), visto que os alimentos apresentam uma matriz complexa rica em proteínas, o que dificulta essa deteção [21]. Ainda assim, os métodos baseados em ADN com deteção por PCR podem ser ferramentas importantes e complementares para ensaios imunológicos.

### 2.4.3. Espectrometria de massa

O processamento de alimentos pode dar origem a mudanças na estrutura da proteína ou do ADN referentes ao alergénio em estudo, afetando a sua deteção final. Deste modo, a espectrometria de massa é descrita como uma ferramenta de confirmação para a identificação ou caracterização de alergénios alimentares em diferentes investigações [10].

A espectrometria de massa surge muitas vezes acoplada à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-MS), com representação dos dados através de um espectro de massa, o qual possibilita a identificação do analito-alvo [10].

Embora seja notável a constante evolução destas técnicas, é ainda escassa a sua utilidade para a deteção de alergénios alimentares no que diz respeito à simplicidade, rapidez, custo e portabilidade [22].

#### 2.4.4. Biossensores

Os biossensores surgem como alternativas aos métodos referidos anteriormente, demonstrando vantagens como a redução significativa do consumo de reagentes, o fácil manuseio e a sua portabilidade. No entanto, a sua aplicação para análise de alergénios alimentares ainda é reduzida [23]. O desenvolvimento de métodos rápidos e baratos, capazes de detetar vestígios de alergénios em matrizes alimentares complexas, consiste ainda num importante desafio para a inovação referente aos métodos de análise.

Um biossensor é um dispositivo constituído por uma componente de reconhecimento biológico (recetor) e um elemento de transdução (transdutor) de sinal, conectado a um sistema de aquisição e processamento de dados. Este dispositivo é capaz de fornecer informação analítica quantitativa ou semi-quantitativa específica, convertendo a interação biológica num sinal analítico quantificável. A classificação do biossensor pode ser efetuada com base no biorrecetor, nomeadamente como imunossensor, citossensor, genossensor, biossensor enzimático, etc., e/ou com base no transdutor, podendo classificar-se como eletroquímico, ótico e/ou piezoelétrico [24].

##### 2.4.4.1. Imunossensores eletroquímicos

Os imunossensores eletroquímicos são uma importante classe dos biossensores. Usualmente, os anticorpos são imobilizados na superfície de um elétrodo para o reconhecimento seletivo do analito contido na amostra em estudo. A deteção da biomolécula alvo pode ser efetuada por técnicas como a amperometria, voltametria, potenciometria, espetroscopia de impedância eletroquímica, condutimetria, etc. [25].

No contexto de deteção de alergénios em produtos alimentares como o amendoim, os imunossensores eletroquímicos têm demonstrado ser adequados para o objetivo. São uma alternativa particularmente atraente no sentido de atender aos requisitos atualmente exigidos pela área da segurança alimentar, permitindo análises rápidas, sendo acessíveis em ambiente laboratorial mesmo para investigadores não qualificados [26].

Na figura 3, encontra-se representado um imunossensor eletroquímico utilizando como transdutor um elétrico serigrafado de carbono (do inglês *Screen Printed Carbon Electrode - SPCE*), sendo o ensaio do tipo *sandwich*.

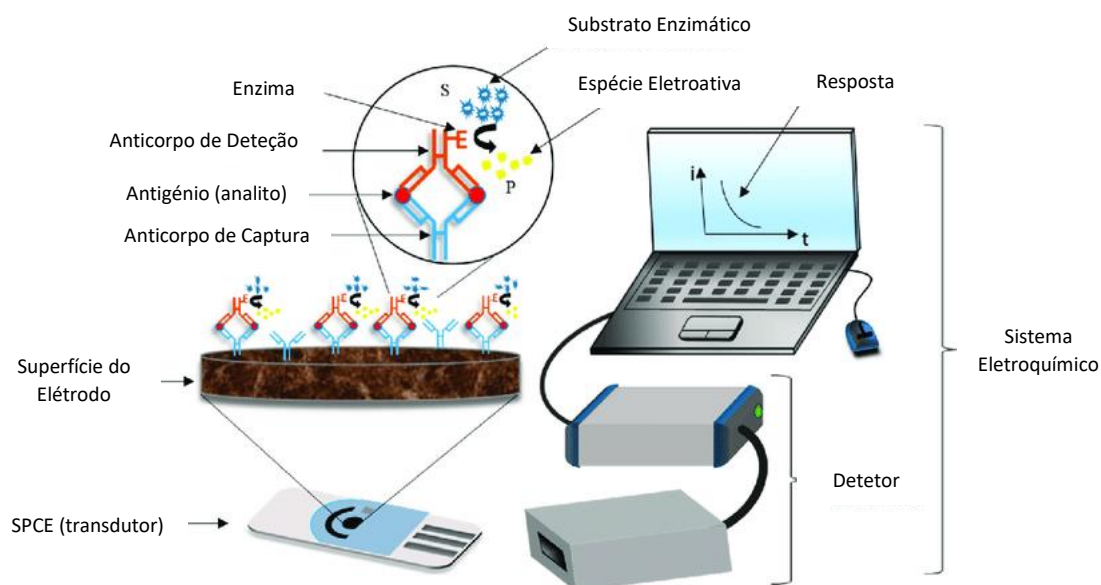


Figura 3 - Representação de um sistema analítico de um imunossensor eletroquímico, com formato *sandwich* utilizando eletrodos de carbono serigrafados (SPCE). Adaptado de [25, 29].

Tal como representado na figura 3, hoje em dia, a larga maioria de transdutores utilizados em imunossensores eletroquímicos são eletrodos serigrafados (do inglês *Screen Printed Electrode - SPE*) descartáveis, que são constituídos por: eletrodos de trabalho (WE), auxiliar (AE) e de referência (RE), como se verifica no esquema da figura 4 (SPCE).

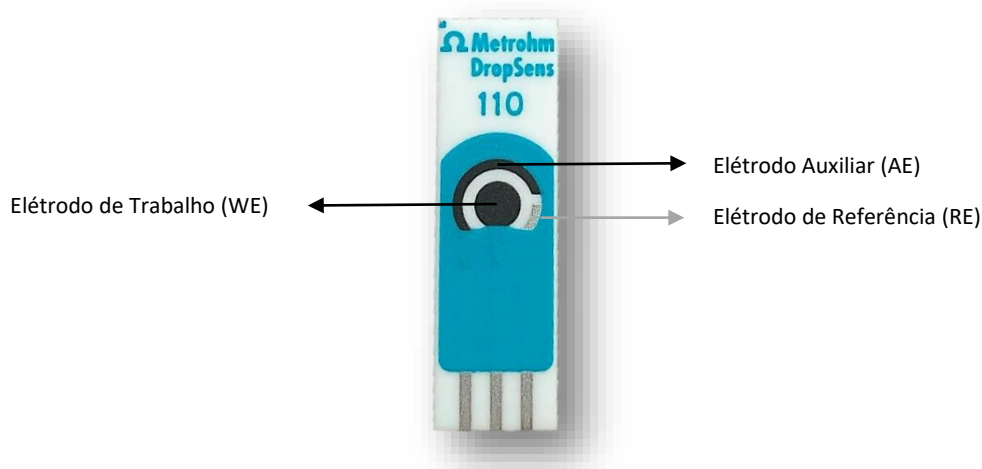


Figura 4 – Representação esquemática de um SPCE.

No WE ocorre a reação em estudo. A constituição deste eletrodo difere de acordo com o propósito da análise, sendo os eletrodos de carbono geralmente mais utilizados devido ao seu baixo custo. Porém, podem também ser utilizados eletrodos de ouro, platina, prata, entre outros. Nesta dissertação, foram utilizados SPCEs, constituídos por um eletrodo de pseudorreferência de prata (RE), que tem como função controlar o potencial aplicado no WE. Para minimizar a queda óhmica que se forma devido à resistência do eletrólito entre os eletrodos, introduz-se um terceiro eletrodo na célula eletroquímica, o AE, que auxilia a passagem da corrente elétrica, evitando interferências no RE.

Os SPEs têm vindo a apresentar múltiplas vantagens em relação aos eletrodos convencionais, no que diz respeito ao desenvolvimento de biossensores e/ou imunossensores. O reduzido tamanho da célula eletroquímica, que evita o recurso a elevados volumes de reagentes nos ensaios e facilita o seu manuseamento, o reduzido custo, a versatilidade e a miniaturização, que permite uma análise portátil, são características que levam à seleção dos SPEs em detrimento dos eletrodos convencionais, que apresentam células eletroquímicas de grandes dimensões, sendo necessário um elevado gasto de reagentes [27-29].

Os eletrodos de trabalho podem ser modificados/nanoestruturados com distintos nanomateriais, melhorando a imobilização do elemento de biorreconhecimento e/ou amplificação do sinal analítico.

#### 2.4.4.2. Nanotecnologia e nanomateriais

O recurso à nanotecnologia e aos nanomateriais tem proporcionado uma melhoria notável no desempenho analítico de biossensores eletroquímicos. Têm sido projetados e explorados novos biorreceptores e configurações de bioensaio, implementados em formatos integrados ou envolvendo nanomateriais. Além disso, são reportados avanços importantes na inovação do elemento transdutor utilizando nanomateriais com propriedades aprimoradas, bem como na síntese e funcionalização, utilizando nanomateriais (vastamente utilizados na modificação/funcionalização da superfície da plataforma transdutora), na integração de nanomateriais em estratégias de deteção, aquisição rápida de sinal/resultado, melhoria da sensibilidade e seletividade, permitindo assim que os biossensores eletroquímicos atendam a requisitos como simplicidade no desenvolvimento do imunossensor para que ocorra uma eficiente deteção de alergénios alimentares.

A versatilidade exibida pelo imunossensor eletroquímico na análise múltipla e/ou simultânea de analitos com gamas de concentração diferentes e a sua aplicação em matrizes alimentares complexas são características particularmente atraentes que podem ser conseguidas com o auxílio de nanomateriais e com os avanços da nanotecnologia [30].

O uso de elétrodos nanoestruturados, usualmente com nanomateriais de carbono ou nanopartículas metálicas, tem contribuído significativamente para o melhor desempenho dos biossensores eletroquímicos na análise de alimentos. A aplicação de nanomateriais na modificação/funcionalização de elétrodos tem como principal objetivo melhorar a resposta/sinal eletroquímico. Entre as suas vantagens, destaca-se o reduzido tamanho (nanoescala) dos materiais, a sua condução elétrica, e a criação de condições adequadas para a imobilização de biorreagentes [31].

Os nanomateriais à base de carbono podem diferenciar-se por exemplo pela dimensão, sendo os seguintes materiais mais vulgarmente descritos na literatura: 0D – fulerenos, 1D - nanotubos de carbono de parede simples (do inglês *Single Walled Carbon Nanotubes* – SWCNT), nanotubos de carbono de parede dupla (do inglês *Multi-Walled Carbon Nanotubes* – MWCNT), 2D - óxido de grafeno reduzido (do inglês *Reduced graphene oxide* - rGO), grafeno oxidado (GO), 3D – grafite, nanodiamantes (do inglês *Nanodiamond* - ND) [32].

#### 2.4.5. Voltametria

A voltametria engloba um conjunto de técnicas eletroquímicas em que a espécie eletroativa em solução (eletrólito) é analisada qualitativamente e/ou quantitativamente através do potencial (E) de oxidação/redução e da intensidade de corrente ( $i_p$ ) formada na célula eletroquímica. Os resultados obtidos são representados num voltamograma, que corresponde a uma representação gráfica da intensidade de corrente em função do potencial aplicado no elétrodo [33].

Em voltametria, a reação de oxidação e/ou redução ocorre na interface entre a superfície do WE e a camada de solução adjacente a essa superfície, sendo que se obtém corrente resultante da transferência de eletrões do elétrodo para a solução ou vice-versa. No caso de a corrente de eletrões fluir do elétrodo para a solução, ocorre a redução do analito. Se a transferência de eletrões se der da solução para o elétrodo, o analito é oxidado. Desta forma, é possível relacionar a intensidade da corrente obtida pela transferência de eletrões num processo de oxidação/redução com a concentração de analito [34].

Dois técnicas voltamétricas amplamente utilizadas no desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos são a voltametria cíclica (CV) e a voltametria de varrimento linear (LSV). Estas técnicas diferenciam-se na maneira da variação do potencial e consequentemente no voltamograma obtido, uma vez que o potencial no WE pode variar no sentido anódico e catódico em CV, porém em LSV varia apenas num dos sentidos (anódico ou catódico) e por este motivo esta técnica é mais simples e com obtenção de sinal analítico de forma mais rápida. No entanto, os princípios do método voltamétrico aplicam-se igualmente para as duas técnicas eletroquímicas [35]. Na Tabela 1 evidenciam-se a representação gráfica dos sinais de excitação em CV e LSV e exemplos dos respectivos voltamogramas.

Tabela 1 - Sinais de excitação e respectivos voltamogramas de CV e LSV [35].

	<b>Voltametria Cíclica (CV)</b>	<b>Voltametria de Varrimento Linear (LSV)</b>
<b>Sinal de Excitação</b>		
<b>Voltamograma</b>		

## 2.5. Imunoensaios eletroquímicos para a análise de Ara h 1

Foi realizada uma pesquisa bibliográfica utilizando a base de dados da plataforma “Clarivate Analytics Web of Science”, com as palavras-chave: Ara h 1, *allergy*, *food*, *immunosensor*, *eletrochem*\*. Até à data da redação da presente dissertação, encontram-se descritos na literatura alguns artigos/trabalhos referentes ao desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos para a deteção de Ara h 1, tendo por base distintos nanomateriais, micromateriais e/ou monocamadas auto-organizadas.

Huang et al. [36] reportou o desenvolvimento de um imunossensor, em formato *label-free*, no qual utilizou elétrodos convencionais de ouro como plataforma transdutora, posteriormente funcionalizados com ácido 11-mercaptoundecanoico (11-MUA), para a eficiente imobilização do anticorpo de captura. Foi utilizada como técnica de deteção a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS).

Sobhan et al. [37] reportou um imunossensor eletroquímico, em formato *label-free*. A superfície do elemento transdutor (“*Silicon Wafer*”) foi modificada com nanotubos de carbono, para assim imobilizar covalentemente o anticorpo de captura. A deteção do analito em estudo foi efetuada através de voltametria de varrimento linear.

Montiel et al. [38] descreveu um imunoensaio eletroquímico utilizando partículas magnéticas para o desenvolvimento de um ensaio em formato *sandwich*. Como transdutor utilizaram elétrodos SPCE. Foi aplicada a enzima HRP como marcador enzimático para obter o sinal analítico, utilizando a amperometria.

Alves et al. [23] desenvolveu um imunossensor eletroquímico do tipo *sandwich*. O anticorpo de captura foi imobilizado, por adsorção, em SPCEs nanoestruturados com nanopartículas de ouro, permitindo uma eficiente imobilização do elemento de bioreconhecimento. Após adição da enzima fosfatase alcalina (AP) como marcador enzimático e 3-indoxil fosfato como substrato enzimático (previamente misturado com nitrato de prata), foi obtido o sinal analítico utilizando a voltametria de varrimento linear.

Apesar dos estudos de Huang et al. [36] e Sobhan et al. [37] não reportarem a aplicação dos seus imunossensores a amostras alimentares, Montiel et al. [38] utilizou o imunossensor desenvolvido para a deteção de Ara h 1 em amostras de saliva e de alimentos derivados do amendoim e Alves et al. [23] desenvolveu com sucesso um imunossensor que permite rastrear a presença do alergénio Ara h 1 do amendoim em bolachas e chocolates.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Material e Equipamento

Os estudos eletroquímicos (voltametria cíclica (CV) e a voltametria de varrimento linear (LSV)) foram realizados utilizando um potenciostato/galvanostato (PGSTAT101, Metrohm Autolab), controlado pelo *software* NOVA versão 1.10. Eléctrodos serigrafados de carbono (SPCE, DRP-110, Metrohm DropSens) foram utilizados como transdutores, sendo constituídos por três eléctrodos WE, AE (fabricados com tinta de carbono) e RE (fabricado com tinta de prata) e respectivas conexões (fabricadas com uma tinta de prata), serigrafados sobre um substrato cerâmico (dimensões: 3,4 × 1,0 × 0,05 cm). A interface de ligação dos eléctrodos ao equipamento foi adquirida ao DropSens.

Outros materiais/equipamentos utilizados foram: micropipetas Research Plus (10 µL, 200 µL, 1000 µL e multicanal), agitador basculante (Selecta, Movil-Tub), sistema de ultra purificação de água (Simplicity 185, Millipore), banho de ultrassons (Digital 10P, Sonorex), balança analítica com precisão 0,00001 g (Mettler Toledo, NewClassic MS), medidor de pH (Crison, micro pH 2002), agitador Analog Vortex Mixer (VWR, VV3), termostato de bloco (Selecta, Tembloc), centrífugas refrigeradas (Heraeus Megafuge 16R e Heraeus-Fresco 21, ThermoScientific), trituradora (Moulinex), agitador orbital (Orbital Shaker AO-400, Bunsen) e leitor de placas multi-modo (Biotek, Synergy HT).

#### 3.2. Reagentes

O anticorpo de captura (CAb; mAb 2C12, anti Ara h 1), Ara h 1 padrão (ST-AH1) e o anticorpo de deteção (DAb; biotin 2F7, anti Ara h 1) foram adquiridos ao Indoor Biotechnologies. A enzima fosfatase alcalina conjugada com estreptavidina (S-AP) foi obtida da Thermo Fisher Scientific. Os seguintes reagentes foram adquiridos à Sigma-Aldrich: substrato enzimático 3-indoxil fosfato (3-IP), nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ), albumina do soro bovino (BSA), diamantes (nanodimensão, tamanho das partículas < 10 nm), tris(hidroximetil)aminometano (Tris), nitrato de magnésio hexahidratado ( $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ), dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO).

### 3.3. Soluções

As seguintes soluções tampão foram preparadas semanalmente, utilizando água ultrapura (resistividade 18,2 MΩ.cm): **B1** – Tris-HNO<sub>3</sub> [0,1 M], pH 7.2; **B1-BSA** – Tris-HNO<sub>3</sub> [0,1 M], pH 7.2 + BSA 1% (m/v); **B2** – Tris-HNO<sub>3</sub> [0,1 M], pH 9.8 + Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> [2×10<sup>-2</sup> M].

As soluções das biomoléculas foram preparadas diariamente. A solução do CAb foi preparada em B1; as soluções de Ara h 1, DAb e S-AP em B1-BSA; 3-IP e AgNO<sub>3</sub> foram dissolvidos em B2. Após preparação, todas as soluções foram armazenadas em tubos eppendorf opacos, em ambiente refrigerado (4 °C).

A preparação da solução dos nanodiamantes (NDs) consistiu na pesagem de 1 mg de NDs e posterior adição de 1 mL de água ultrapura, para obter uma concentração de 1 mg/mL. Esta solução foi colocada no banho de ultrassons durante 2 horas e armazenada à temperatura ambiente para posterior utilização. No protocolo otimizado utiliza-se uma concentração de NDs de 0,1 mg/mL. Esta solução foi preparada através da diluição, com água ultrapura, da solução de 1 mg/mL. Antes de cada aplicação no eléctrodo, a solução foi colocada no banho de ultrassons durante 5 minutos.

### 3.4. Procedimento experimental

#### 3.4.1. Nanoestruturação do SPCE

Foram depositados 15 µL de NDs (0,1 mg/mL, dispersos em H<sub>2</sub>O) no WE do SPCE. O SPCE permaneceu à temperatura ambiente até à secagem total, e em seguida procedeu-se à incubação do anticorpo de captura (CAb).

### 3.4.2. Imobilização do anticorpo de captura

Após a nanoestruturação do SPCE, colocaram-se 10  $\mu\text{L}$  da solução do CAb (concentração otimizada: 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) no WE. O SPCE permaneceu durante a noite em ambiente refrigerado (4  $^{\circ}\text{C}$ ), num recipiente humidificado.

### 3.4.3. Construção do imunossensor e deteção eletroquímica

O desenvolvimento do imunossensor consistiu nas seguintes etapas:

Após a lavagem do SPCE com B1, procedeu-se à (I) adição do/a antigénio/amostra (40  $\mu\text{L}$ , em B1-BSA) e incubação durante 30 minutos. De seguida, lavou-se o SPCE com B1 para remoção de biomoléculas que não tenham efetuado a ligação específica anticorpo-antigénio. (II) Adicionou-se DAb (40  $\mu\text{L}$ , diluição otimizada: 1:250 em B1-BSA), permanecendo este durante 60 minutos na superfície do elétrodo. Foi efetuada uma posterior lavagem com B1, seguindo-se a (III) adição de S-AP (40  $\mu\text{L}$ , diluição otimizada: 1:200,000 em B1-BSA), com incubação durante 30 minutos. Por fim, realizou-se uma lavagem com B2 e (IV) adicionou-se uma alíquota de 40  $\mu\text{L}$  de uma solução que contém o substrato enzimático 3-IP ( $1 \times 10^{-3}$  M) e o nitrato de prata ( $4 \times 10^{-4}$  M), deixando reagir durante 20 minutos.

Para a obtenção do sinal analítico, a AP hidrolisa o substrato enzimático (3-IP) a um indoxil que é posteriormente oxidado ao azul de índigo (insolúvel). Durante este processo, os iões prata são reduzidos à prata metálica ( $\text{Ag}^0$ ), sendo que a  $\text{Ag}^0$  formada no WE é diretamente proporcional à quantidade de alergénio em estudo (Ara h 1). A prata formada (co-depositada com azul de índigo) é reoxidada ao aplicar a técnica voltamétrica [38].

A deteção metaloenzimática efetua-se utilizando como técnica eletroquímica a voltametria de varrimento linear (LSV) com os seguintes parâmetros: intervalo de potencial de -0,030 V a 0,400 V; velocidade de varrimento de 0,05 V/s.

Na figura 5 encontram-se o fluxograma da construção do imunossensor e a representação esquemática do desenvolvimento do imunossensor eletroquímico.

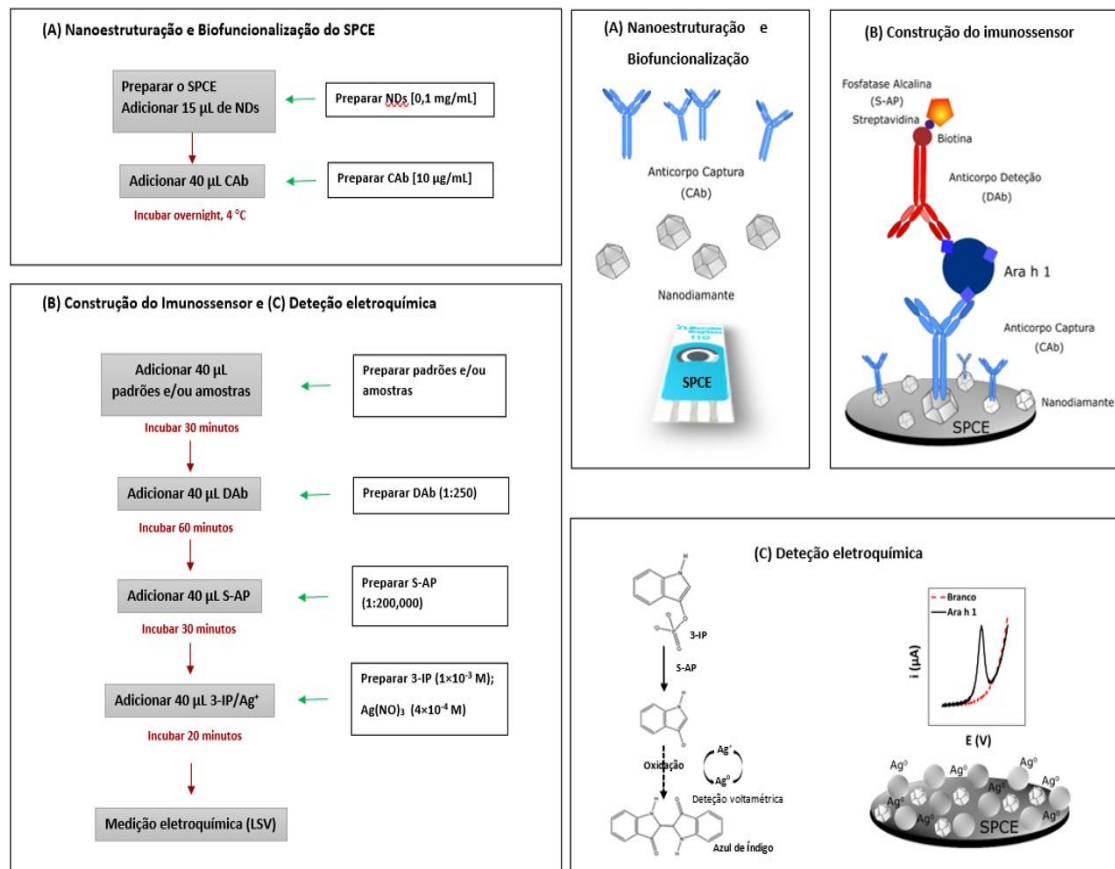


Figura 5 - Fluxograma da construção do imunossensor (esquerda) e representação esquemática do desenvolvimento do imunossensor eletroquímico (direita).

### 3.4.4. Preparação da amostra alimentar

A preparação das amostras alimentares para análise do Ara h 1 foi efetuada de acordo com um procedimento descrito na literatura [23]. Resumidamente, a amostra foi triturada e homogeneizada durante 10 segundos (3 vezes) a 10,000 rpm, utilizando uma trituradora. O produto obtido foi armazenado para posterior análise.

Para a extração do alergénio da amostra, o procedimento foi efetuado de acordo com as recomendações descritas pela empresa *Indoor Biotechnologies* (à qual foram comprados os reagentes utilizados para a construção do imunossensor), utilizando um protocolo referenciado nas indicações do produto *MARIA® for Foods (Multiplex Array for Allergens)*, seguindo-o com ligeiras alterações.

Sucintamente, o protocolo consiste nas seguintes etapas: (1) pesar 1 g da amostra triturada para um tubo falcon de 15 mL e adicionar 10 mL da solução tampão de extração (Tris-HNO<sub>3</sub> [0,1 M], pH 8.2); (2) Levar a suspensão resultante ao vortex durante 10 segundos; (3) incubar durante 15 minutos a 60 °C, utilizando um termostato de bloco (Tembloc), efetuando-se agitação manual de 5 em 5 minutos (vortex); (4) centrifugar (Heraeus Megafuge 16R, ThermoScientific) durante 20 minutos a 2500 rpm; (5) armazenar o sobrenadante em tubos Eppendorf e guardar a -20 °C até posterior análise.

Para a análise da amostra armazenada, (6) deve proceder-se ao descongelamento e execução de nova centrifugação (centrífuga refrigerada Heraeus-Fresco 21, ThermoScientific) durante 5 minutos a 5000 rpm, antes de efetuar a diluição apropriada (diluição otimizada: 1:1000 para produtos com concentrações de amendoim conhecidas; 1:100 para produtos sem amendoim ou cujo rótulo indicava “pode conter vestígios”).

### 3.5. Validação do método

A validação do método eletroquímico desenvolvido para a análise do Ara h 1 efetuou-se utilizando um kit comercial ELISA, obtido pela *Indoor Biotechnologies*. O procedimento experimental foi realizado de acordo com o protocolo fornecido pela empresa na compra do kit, com duração de ensaio de aproximadamente 2 h 30 minutos.

Sucintamente, o protocolo consiste nos seguintes passos: (i) imobilização de CAb (100 µL, 1:1000 em tampão carbonato/bicarbonato [0,050 M], pH 9.6) numa microplaca (NUNC Maxisorp Cert. Nunc), durante a noite, a 4 °C.

Após o passo de lavagem, (ii) adicionar o/a antigénio/amostra, preparado/a em tampão de ensaio e incubar durante 60 minutos ± 10 minutos, seguindo-se (iii) a adição de DAb + enzima peroxidase conjugada com estreptavidina (100 µL, 1:1000 em tampão de ensaio), durante 60 minutos ± 10 minutos e (iv) a adição do substrato enzimático (TMB, 100 µL). Após adição de TMB, a monitorização da reação é efetuada pela mudança de cor na presença do analito-alvo, de transparente para azul. Após a revelação da cor, adiciona-se 50 µL de uma solução de paragem a cada poço de modo a parar a reação (a cor altera para amarelo) e efetua-se a medição da absorbância a 450 nm. Foi utilizado um leitor de placas multi-modo (Biotek), sendo que os dados foram tratados utilizando o software de análise de dados Gen5 Versão 2.0 (Biotek).

Nota: <sup>1</sup>Após incubação, entre cada etapa do ensaio lava-se os poços 2 vezes utilizando tampão de lavagem (fornecido no kit). <sup>2</sup>A preparação das soluções é efetuada em tampão de ensaio (fornecido no kit). <sup>3</sup>Em cada incubação a placa é colocada num agitador orbital (Orbital Shaker AO-400, Bunsen) visto que uma ligeira agitação da placa pode reduzir a variabilidade.



## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Técnicas eletroquímicas: CV vs LSV

O imunossensor eletroquímico descrito nesta dissertação foi desenvolvido utilizando SPCEs nanoestruturados, sendo a deteção do analito alvo (alergénio do amendoim – Ara h 1) efetuada utilizando uma reação metaloenzimática, a qual consiste na redução de iões prata a prata metálica e subsequente oxidação de  $\text{Ag}^0$  utilizando uma técnica voltamétrica. A construção do imunossensor é efetuada em formato *sandwich*, que consiste na imobilização prévia de anticorpos de captura (CAb), sendo o analito (Ara h 1) reconhecido posteriormente pelo anticorpo de deteção (DAb) biotinizado. É adicionada a enzima fosfatase alcalina conjugada com estreptavidina (S-AP) que, por afinidade, se liga ao esquema *sandwich* já estruturado na superfície do SPCE. Numa última etapa, é adicionada uma solução que contém o substrato enzimático 3-indoxil fosfato (3-IP) e nitrato de prata, possibilitando desta forma a obtenção do referido sinal analítico. Na Figura 6 estão representados os voltamogramas CV e LSV do sinal eletroquímico da prata para o imunossensor proposto.

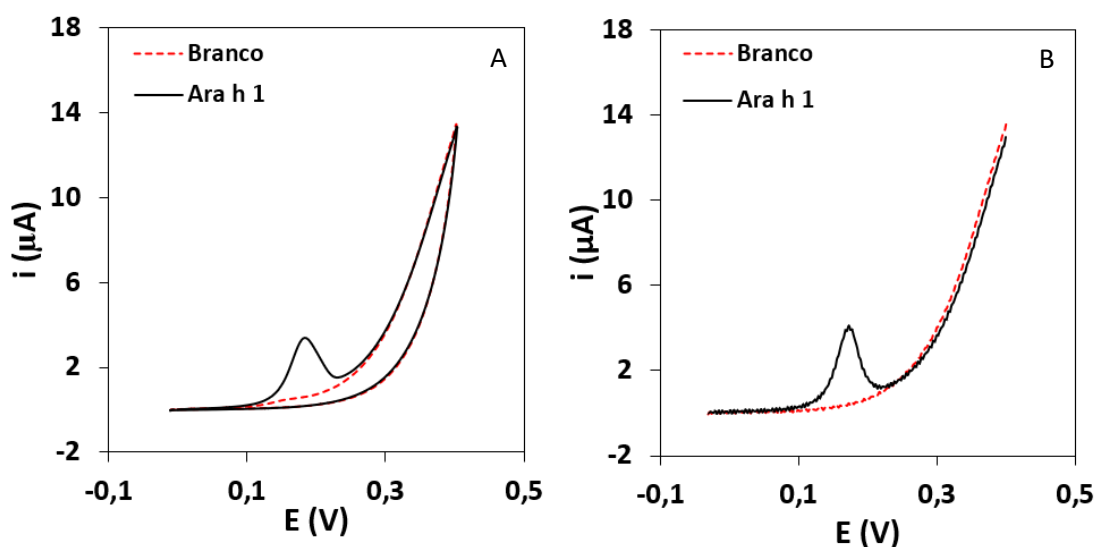


Figura 6 - Voltamogramas obtidos na deteção de Ara h 1 (0 e 250 ng/mL) utilizando: (A) voltametria cíclica (CV); (B) voltametria de varrimento linear (LSV). Parâmetros Experimentais: CAb 25  $\mu\text{g/mL}$ ; DAb 1:500; S-AP 1:150,000; 3-IP/ $\text{Ag}^+$  1 mM/0,4 mM.

Analisando os voltamogramas da figura 6.A., observa-se o sinal de oxidação da espécie eletroativa. Uma vez que não se verifica sinal de redução, a técnica LSV (figura 6.B.) foi a preterida para o estudo, por permitir a leitura do sinal eletroquímico em apenas um dos sentidos e por a sua obtenção ser mais simples e mais rápida.

## 4.2. Nanoestruturação do SPCE e Seleção do Solvente

O WE do SPCE foi inicialmente modificado com nanomateriais de carbono de diferentes dimensões (1D, 2D, 3D) de modo a estudar e correlacionar a intensidade de corrente ( $i_p$ ) obtida na análise do alergénio Ara h 1 com o nanomaterial em análise. Foram efetuadas as seguintes nanoestruturas: 1D - nanotubos de carbono de parede simples (SWCNT), e nanotubos de carbono de parede dupla (MWCNT), 2D - óxido de grafeno reduzido (rGO), 3D - nanodiamantes (ND) e comparadas com um SPCE não modificado (elétrodo de controlo/referência do estudo). Os nanomateriais em estudo foram dispersos em dimetilformamida (DMF) na concentração de 1 mg/mL. Este solvente foi selecionado por ser frequentemente utilizado na dispersão de nanomateriais de carbono. Os resultados obtidos encontram-se representados na figura 7. A presença de Ara h 1 (250 ng/mL) é indicada pela barra sem preenchimento (legendado como “Ara h 1”) e a ausência de Ara h 1 (0 ng/mL) é indicada pela barra com preenchimento preto (legendado como “Branco”). A razão sinal-branco (S/B), na presença e ausência do analito, foi utilizada para selecionar os valores ótimos.

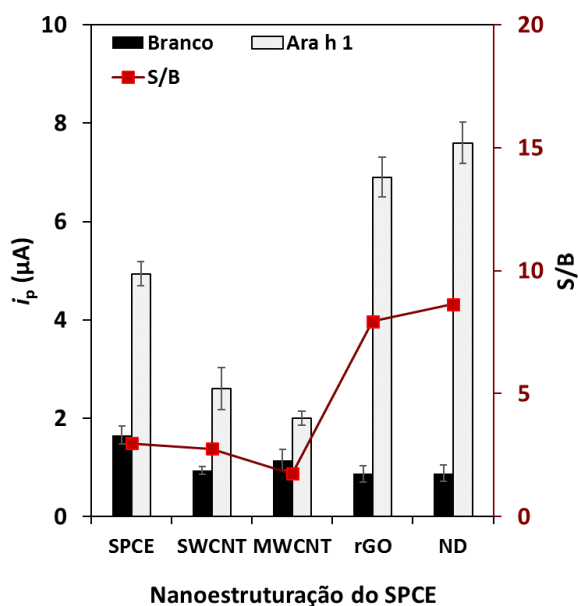


Figura 7 – Nanoestruturação do SPCE com nanomateriais de carbono de diferentes dimensões. Parâmetros Experimentais: Ara h 1 (0 e 250 ng/mL); CAb 25 µg/mL; DAB 1:500; S-AP 1:150,000; 3-IP/Ag<sup>+</sup> 1 mM/0,4 mM.

Como se pode verificar na figura 7, rGO e ND apresentam as maiores intensidades de corrente de pico ( $i_p$ ). Contudo, verifica-se que o resultado que evidencia a melhor opção para prosseguir a construção do imunossensor consiste na nanoestruturação do SPCE com ND.

Após a seleção dos NDs para a nanoestruturação dos SPCE, testou-se a sua dispersão com outros solventes para além de DMF, nomeadamente em dimetilsulfóxido (DMSO), comumente utilizado como solvente em alguns processos biológicos, e em água (H<sub>2</sub>O), por demonstrar vantagens como a biocompatibilidade. Os resultados obtidos encontram-se na figura 8.

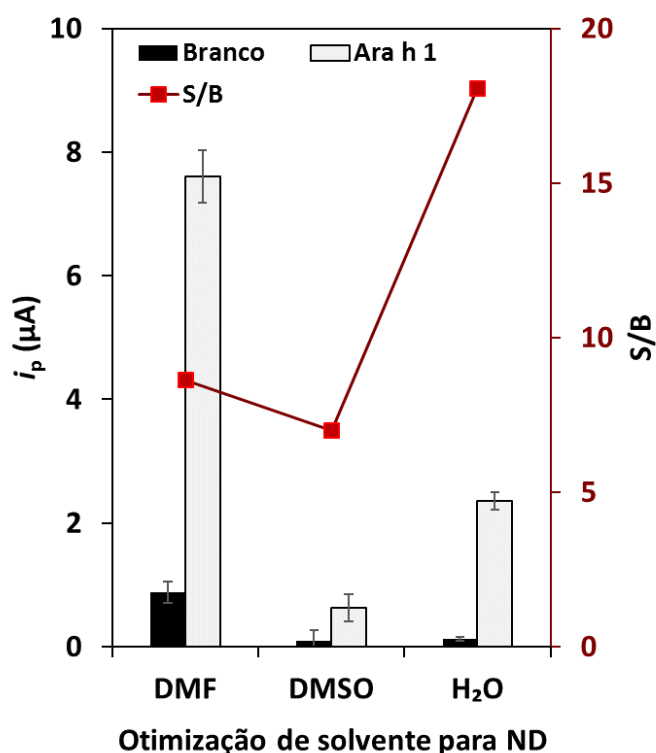


Figura 8 – Diferentes solventes utilizados para a otimização da dispersão dos NDs. Parâmetros Experimentais: Ara h 1 (0 e 250 ng/mL); CAB 25  $\mu\text{g/mL}$ ; DAb 1:500; S-AP 1:150,000; 3-IP/Ag<sup>+</sup> 1 mM/0,4 mM.

Apesar de se observar um  $i_p$  elevado quando os ND são dispersos em DMF, a razão S/B é consideravelmente superior quando os NDs se encontram dispersos em H<sub>2</sub>O. Na dispersão com DMF verifica-se valores de  $i_p$  elevados para o branco, contudo, tal não se verifica quando é utilizado DMSO ou H<sub>2</sub>O. No entanto, é importante referir que a utilização de H<sub>2</sub>O para a dispersão dos NDs é considerada mais vantajosa, nomeadamente em termos de toxicidade, comparando com os restantes solventes em estudo.

### 4.3. Otimização da Concentração de ND

Após a escolha do nanomaterial e correspondente solvente, procedeu-se à seleção da concentração ótima de NDs para a nanoestruturação do SPCE.

Deste modo, foram testadas as seguintes concentrações de ND: 1,0; 0,50; 0,25; 0,10; 0,05; 0,025 mg/mL.

Como se pode verificar nos resultados obtidos, representados na figura 9, a concentração ótima corresponde a 0,10 mg/mL uma vez que o valor de  $i_p$  e a razão S/B associada a esta concentração são superiores.

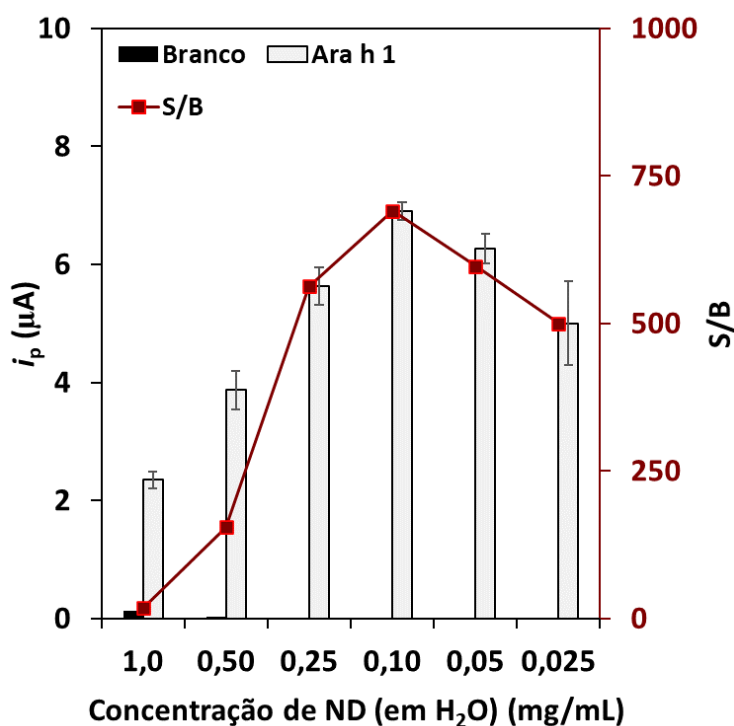


Figura 9 - Resultados do estudo da concentração de ND. Parâmetros Experimentais: Ara h 1 (0 e 250 ng/mL); CAB 25 µg/mL; DAb 1:500; S-AP 1:150,000; 3-IP/Ag<sup>+</sup> 1 mM/0,4 mM.

É possível observar que para a gama de concentrações de 1,0 a 0,10 mg/mL, a intensidade de corrente aumenta com a diminuição da concentração de NDs. Porém, de 0,10 a 0,025 mg/mL, esta tendência inverte-se, observando-se deste modo a concentração ótima é de 0,10 mg/mL para prosseguir a construção do imunossensor.

#### 4.4. Otimização da Concentração do Anticorpo de Captura (CAb) e da Diluição da solução do Anticorpo de Detecção (DAb)

A otimização da concentração dos anticorpos a utilizar para a construção do imunossensor é uma etapa de relevante importância no seu desenvolvimento uma vez que estas concentrações são essenciais para um funcionamento adequado.

Para a otimização da concentração do CAb foram testadas as seguintes concentrações: 5; 10 e 25  $\mu\text{g/mL}$ , utilizando uma diluição fixa de Anticorpo de Detecção (DAb) de 1:500. A ligação entre o CAb e o SPCE/ND ocorre por adsorção física.

Como se pode observar nos resultados obtidos, representados na figura 10, verifica-se que o melhor  $i_p$  e a melhor razão S/B correspondem à concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  de CAb. Por essa razão, esta concentração foi utilizada nos estudos seguintes.

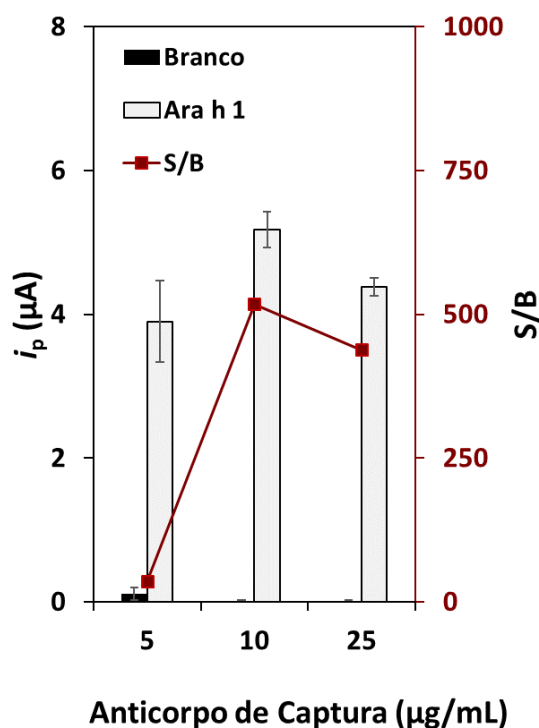


Figura 10 – Otimização da concentração do CAb. Parâmetros Experimentais: Ara h 1 (0 e 250 ng/mL); DAb 1:500; S-AP 1:150,000; 3-IP/Ag<sup>+</sup> 1 mM/0,4 mM.

No estudo de otimização do anticorpo de deteção foram testadas as seguintes diluições: 1:1000; 1:500 e 1:250. Utilizou-se uma concentração fixa de CAb de 10 µg/mL. Os resultados obtidos encontram-se representados na figura 11.

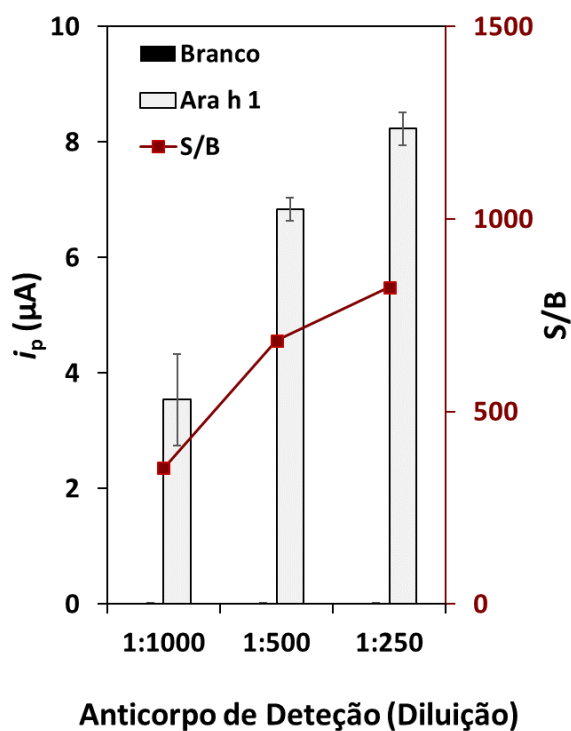


Figura 11 - Otimização da concentração do DAb. Parâmetros Experimentais: Ara h 1 (0 e 250 ng/mL); CAb 10 µg/mL; S-AP 1:150,000; 3-IP/Ag<sup>+</sup> 1 mM/0,4 mM.

Como se pode observar, para a solução mais diluída (1:1000), o  $i_p$  obtido é bastante inferior comparando com soluções mais concentradas (1:500; 1:250). Contudo, verifica-se que o melhor resultado é obtido quando é utilizada a diluição 1:250, sendo também confirmado pela razão S/B, a qual tem o seu valor mais elevado utilizando esta diluição.

Assim, após otimização das concentrações/diluições dos anticorpos, verifica-se que CAb 10 µg/mL e DAb 1:250 permitem obter uma boa performance do imunossensor.

#### 4.5. Otimização da Diluição da solução da Enzima Fosfatase Alcalina conjugada com estreptavidina (S-AP)

A enzima fosfatase alcalina conjugada com estreptavidina (S-AP) liga-se por afinidade ao anticorpo biotilado de deteção. De modo a otimizar a diluição a utilizar foram estudadas as seguintes diluições de S-AP: 1:100,000; 1:150,000; 1:200,000 e 1:250,000. Os resultados obtidos estão expostos na figura 12.

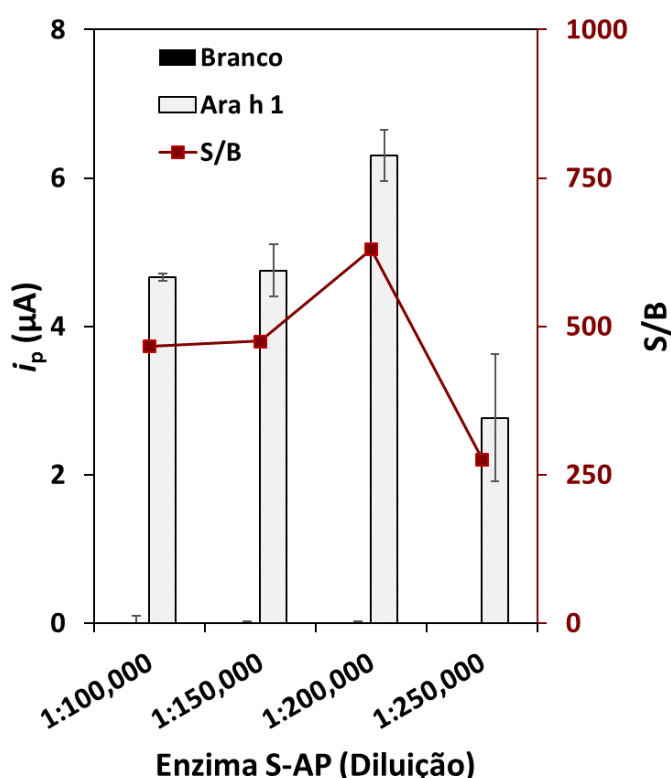


Figura 12 - Otimização da concentração do S-AP. Parâmetros Experimentais: Ara h 1 (0 e 250 ng/mL); CAh 10  $\mu\text{g/mL}$ ; DAb 1:250; 3-IP/Ag<sup>+</sup> 1 mM/0,4 mM.

É possível observar que para uma diluição mais elevada (1:250,000) obteve-se o menor sinal, que pode dever-se ao facto de existir pouca quantidade de S-AP e assim não ser suficiente para uma deteção adequada. Por outro lado, utilizando uma diluição de 1:200,000 é possível verificar um  $i_p$  superior em comparação com as restantes diluições em estudo, bem como uma melhor razão S/B.

Deste modo, elegeu-se a diluição 1:200,000 para prosseguir o estudo.

#### 4.6. Otimização do Formato do Ensaio e do Tempo de Incubação

Para a otimização do imunoenensaio, diferentes formatos relativos às etapas de ensaio foram avaliados, nomeadamente: Formato 1 – passo a passo (Ara h 1, 60 minutos; DAb, 60 minutos; S-AP, 30 minutos); Formato 2 – pré-incubação de Ara h 1 + DAb (Ara h 1 + DAb, 60 minutos; S-AP, 30 minutos); Formato 3 – pré-incubação de DAb + S-AP (Ara h 1, 60 minutos; DAb + S-AP, 60 minutos); Formato 4 – pré-incubação de Ara h 1 + DAb + S-AP (Ara h 1 + DAb + S-AP, 60 minutos).

O propósito desta otimização foi avaliar a possível interação entre as diferentes biomoléculas e melhoria do sinal analítico. Os dados obtidos encontram-se na figura 13.

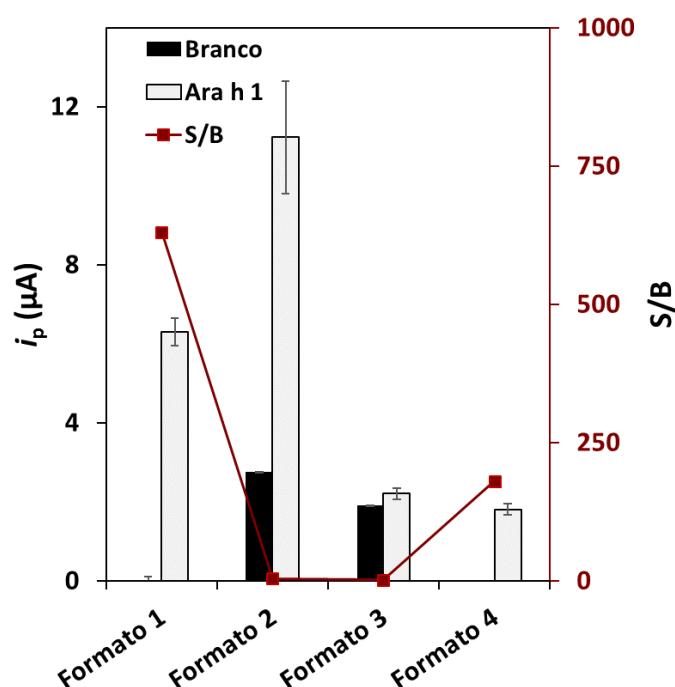


Figura 13 - Otimização do formato. Parâmetros Experimentais: Ara h 1 (0 e 250 ng/mL); CAB 10 µg/mL; DAb 1:250; S-AP 1:200,000; 3-IP/Ag<sup>+</sup> 1 mM/0,4 mM.

Apesar de se verificar que o Formato 2 possibilita a obtenção de uma intensidade de corrente superior, o mesmo acontece para o sinal de branco, o que pode significar interação cruzada entre as biomoléculas, observando assim um efeito de interferência considerável quando comparando com o Formato 1. Relativamente ao Formato 3, verifica-se que o  $i_p$  é semelhante ao do branco, demonstrando assim que este formato não é eficiente, não ocorrendo deteção do analito-alvo. O Formato 4 reduz consideravelmente o tempo de ensaio (60 minutos), contudo, o  $i_p$  obtido é significativamente inferior ao Formato 1. Desta forma, verifica-se que o Formato 1 é o mais indicado para prosseguir a otimização do imunossensor.

Após seleção do formato 1, que consiste num tempo de ensaio de 2 h e 30 minutos, com posterior adição de 20 minutos para incubação da solução 3-IP/Ag<sup>+</sup> (tempo total de ensaio de 2 horas e 50 minutos), procedeu-se à otimização dos tempos de incubação de cada etapa de modo a reduzir o tempo total de ensaio. Desta forma, foram testados os seguintes modelos: (A) Ara h 1, 60 minutos; DAb, 60 minutos; S-AP, 30 minutos; (B) Ara h 1, 60 minutos; DAb, 30 minutos; S-AP, 30 minutos; (C) Ara h 1, 30 minutos; DAb, 60 minutos; S-AP, 30 minutos. Os resultados obtidos estão representados na figura 14.

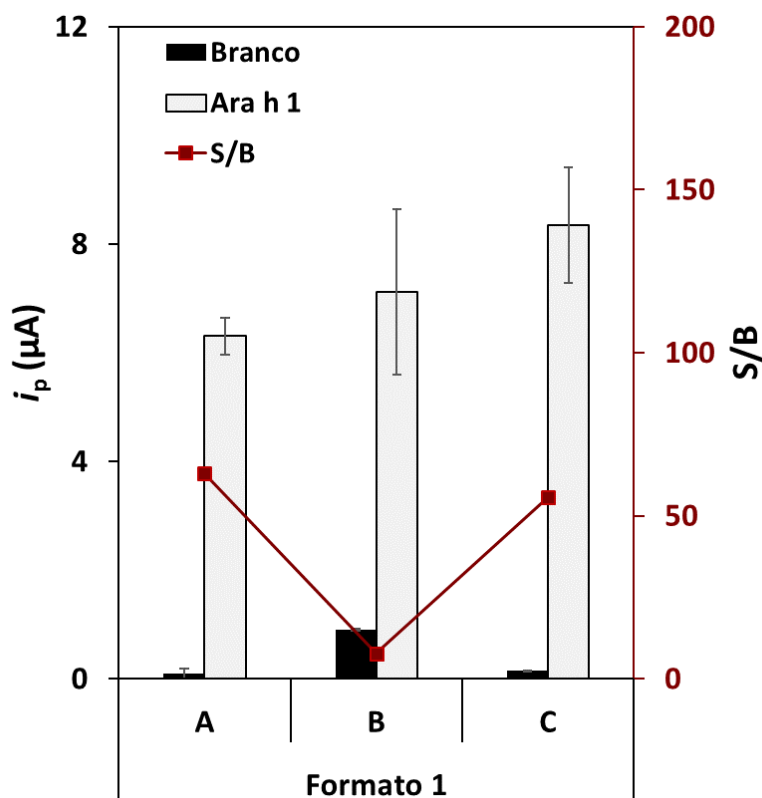


Figura 14 – Otimização do tempo total de ensaio utilizando o formato 1. (A) Ara h 1, 60 minutos; DAb, 60 minutos; S-AP, 30 minutos; (B) Ara h 1, 60 minutos; DAb, 30 minutos; S-AP, 30 minutos; (C) Ara h 1, 30 minutos; DAb, 60 minutos; S-AP, 30 minutos. Parâmetros Experimentais: Ara h 1 (0 e 250 ng/mL); CAh 10 µg/mL; DAb 1:250; S-AP 1:200,000; 3-IP/Ag<sup>+</sup> 1 mM/0,4 mM.

Na figura 14 observa-se que a razão S/B é similar entre os resultados para os modelos A e C. Contudo, o valor de  $i_p$  é superior em C, sendo que este modelo tem ainda uma redução no tempo de ensaio correspondente a menos 30 minutos comparativamente ao A. Assim, utilizando o modelo C, o ensaio é realizado num tempo total de 2 horas e 20 minutos. O tempo de manuseio/manipulação (*hands-on time*) foi determinado em aproximadamente 10 minutos ( $\pm 2$  minutos).

#### 4.7. Síntese da Otimização das Variáveis Experimentais

Relativamente às otimizações efetuadas, apresentam-se resumidamente na Tabela 2 as variáveis experimentais estudadas, bem como os parâmetros e intervalos analisados e o valor selecionado para prosseguir com o estudo.

Tabela 2 – Resultado das otimizações das variáveis experimentais para o desenvolvimento do imunossensor.

<b>Variável Experimental</b>	<b>Parâmetro/Intervalo Analisado</b>	<b>Parâmetro/Valor Selecionado</b>
<i>Nanomaterial de Carbono</i>	SWCNT, MWCNT, rGO e ND	ND
<i>Solvente para dispersar os NDs</i>	DMF, DMSO e H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
<i>Concentração de ND (mg/mL)</i>	1; 0,50; 0,25; 0,10; 0,05 e 0,025	0,10
<i>Concentração do Anticorpo de Captura (µg/mL)</i>	5, 10 e 25	10
<i>Anticorpo de Detecção (Diluição)</i>	1000, 500 e 250	250
<i>Enzima conjugada S-AP (Diluição)</i>	100,000; 150,000; 200,000 e 250,000	200,000

Em síntese, após otimização dos parâmetros apresentados, os melhores resultados obtidos utilizando as condições experimentais ótimas foram os seguintes: Nanodiamante (ND) 0,10 mg/mL disperso em H<sub>2</sub>O; CAb 10 µg/mL; DAb 1:250; S-AP 1:200,000; Formato 1 (passo a passo) com os tempos de ensaio de Ara h 1 - 30 minutos, DAb - 60 minutos, S-AP - 30 minutos. Outras condições: 3-IP/Ag<sup>+</sup> 1 mM/0,4 mM – 20 minutos (tempo total de ensaio de 2 horas e 20 minutos).

#### 4.8. Avaliação do Funcionamento do Sensor

Para avaliar o correto funcionamento do ensaio, foram avaliadas as interações entre os diferentes reagentes envolvidos (anticorpos, enzima, substrato enzimático e prata). Assim, procedeu-se à avaliação do ensaio na ausência de: a) CA**b**; b) DA**b**; c) S-AP; d) 3-IP; e) Ag<sup>+</sup>. Como referência, foi feita a análise na ausência (Branco, 0 ng/mL Ara h 1) e na presença (250 ng/mL Ara h 1) do analito em estudo. Os resultados obtidos encontram-se presentes na figura 15.

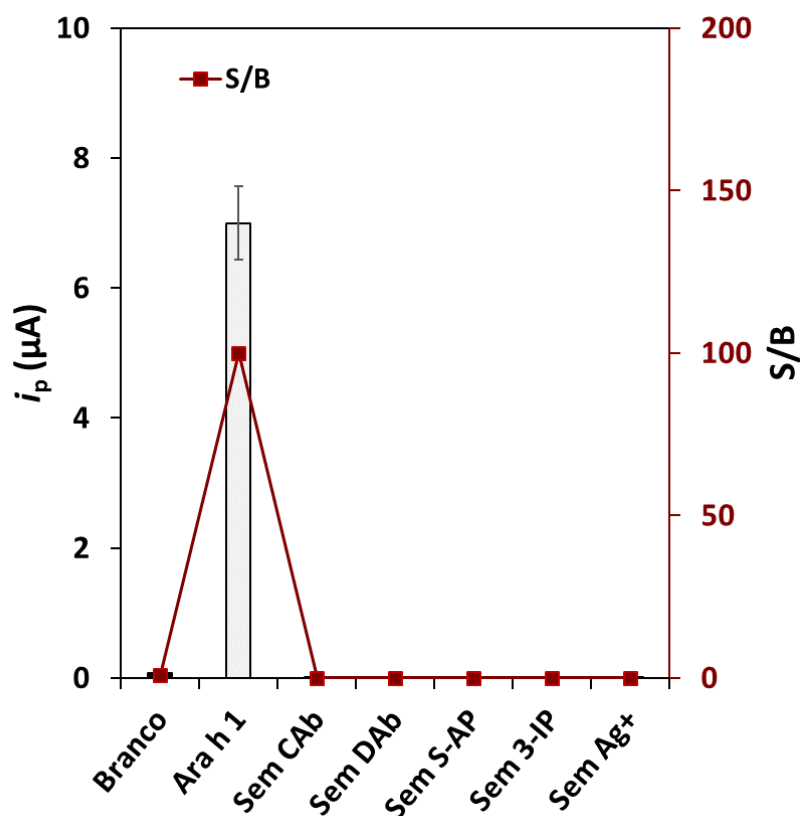


Figura 15 – Avaliação do funcionamento do imunossensor. Parâmetros Experimentais: Ara h 1 (0 e 250 ng/mL); CA**b** 10  $\mu\text{g/mL}$ ; DA**b** 1:250; S-AP 1:200,000; 3-IP/Ag<sup>+</sup> 1 mM/0,4 mM.

Através da análise da figura 15, corrobora-se o correto funcionamento do sensor, sendo explícito que este permite a obtenção de sinal eletroquímico na presença do alérgeno em estudo (Ara h 1) e que os diferentes reagentes envolvidos não interferem no sinal.

#### 4.9. Caracterização do Método

O desempenho analítico do imunossensor eletroquímico desenvolvido foi testado utilizando os parâmetros previamente otimizados. Foram testadas as seguintes concentrações de Ara h 1: 0 ng/mL; 25 ng/mL; 50 ng/mL; 100 ng/mL; 250 ng/mL; 500 ng/mL e 1000 ng/mL. A reta de calibração encontra-se presente na figura 16.A e os respetivos voltamogramas LSV na figura 16.B.

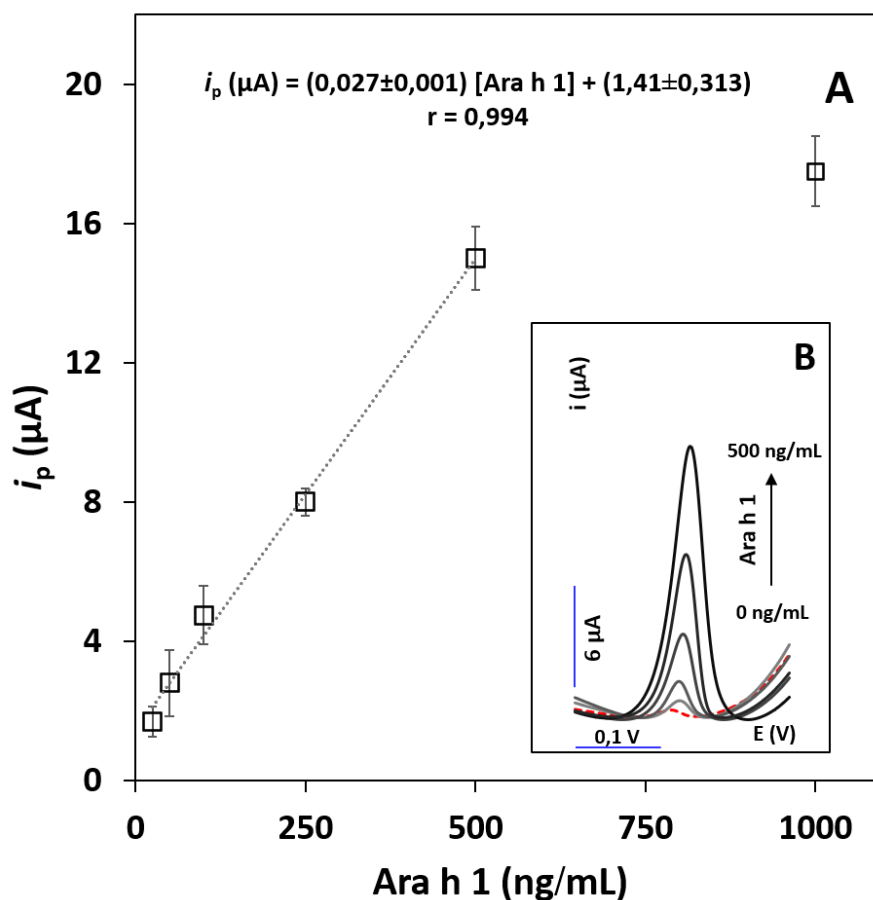


Figura 16 – A - Reta de calibração para análise de Ara h 1 ( $i_p$  vs concentração de Ara h 1); B – Exemplos de voltamogramas LSV obtidos para a gama de concentrações linear (0, 25, 50, 100, 250 e 500 ng/mL). Parâmetros Experimentais: CAb 10  $\mu\text{g/mL}$ ; DAb 1:250; S-AP 1:200,000; 3-IP/Ag<sup>+</sup> 1 mM/0,4 mM.

A relação linear entre o  $i_p$  e a concentração de Ara h 1 verificou-se entre 25 e 500 ng/mL ( $i_p (\mu\text{A}) = (0,027 \pm 0,001) [\text{Ara h 1}] + (1,41 \pm 0,31)$ ;  $r = 0,994$ ;  $n = 5$ ), com uma sensibilidade de  $0,342 \mu\text{A.mL.ng}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ .

Os limites de deteção ( $LOD = 3 \times s/m$ ) e de quantificação ( $LOQ = 10 \times s/m$ ) foram calculados a partir da reta de calibração, sendo o  $s$  correspondente ao desvio-padrão do sinal branco e o  $m$  ao declive da reta de calibração. Os valores obtidos foram:  $LOD = 0,78$  ng/mL e  $LOQ = 2,6$  ng/mL. O coeficiente de variação do método obtido,  $V_{x_0} (\%) \approx 10$ , demonstra assim uma precisão de método adequada. Para a obtenção deste valor, foi efetuado o seguinte cálculo:  $V_{x_0} (\%) = S_{x_0}/\bar{x}$ , sendo que  $S_{x_0} = S_{y/x}/m$  e  $\bar{x}$  corresponde à média das concentrações em estudo. A tabela 3 indica as figuras de méritos do método.

Tabela 3 – Figuras de mérito do imunossensor desenvolvido para análise do Ara h 1.

<b>Figuras de Mérito</b>	
Intervalo de concentração (ng/mL)	25 - 500
Coefficiente de correlação (r)	0,994
Declive (m) (ng/mL)	0,027
Desvio padrão do declive ( $S_m$ ) (ng/mL)	0,001
Intercepção (b) ( $\mu A$ )	1,41
Desvio padrão da intercepção ( $S_a$ ) ( $\mu A$ )	0,313
Desvio padrão da regressão linear ( $S_{y/x}$ )	0,482
Desvio padrão do método ( $S_{x_0}$ )	17,8
Coefficiente de variação do método ( $V_{x_0}$ ) (%)	9,6
Limite de deteção (ng/mL)	0,78
Limite de quantificação (LOQ) (ng/mL)	2,6

#### 4.10. Precisão e Estabilidade do sensor

Para estimar a repetibilidade da análise, uma solução de Ara h 1 de concentração 250 ng/mL foi analisada sucessivamente utilizando 3 elétrodos diferentes, no mesmo dia. O desvio padrão relativo (RSD) obtido foi de 4,9%, indicando que a repetibilidade é adequada.

A reprodutibilidade da análise foi avaliada utilizando diferentes sensores e uma solução de Ara h 1 de concentração 250 ng/mL, analisados durante 3 dias consecutivos, obtendo-se um RSD de 7,3%. Assim, pode-se concluir que a reprodutibilidade é aceitável.

A avaliação da estabilidade do sensor foi efetuada durante 4 semanas. Os elétrodos foram preparados simultaneamente e armazenados a 4 °C e o sinal foi monitorizado durante as semanas referidas, utilizando soluções de 0 e 250 ng/mL de Ara h 1. Os resultados obtidos encontram-se na figura 17.

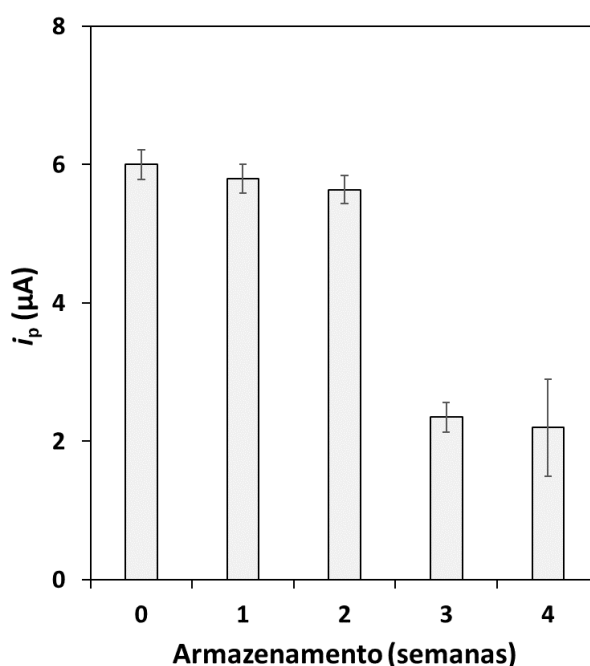


Figura 17 - Estudo da estabilidade do sensor. Parâmetros Experimentais: Ara h 1 (0 e 250 ng/mL); CA<sub>b</sub> 10  $\mu\text{g/mL}$ ; DA<sub>b</sub> 1:250; S-AP 1:200,000; 3-IP/Ag<sup>+</sup> 1 mM/0,4 mM.

Não se observaram diferenças significativas nos sinais analíticos durante as duas primeiras semanas, sendo que o sinal obtido em relação ao sinal inicial foi de 96,7 % para a primeira semana e de 94,0 % para a segunda semana. Contudo, verifica-se que a partir da terceira semana há uma redução significativa do sinal. Deste modo, é possível concluir que o imunossensor desenvolvido apresenta estabilidade de duas semanas.

#### 4.11. Estudo da Seletividade e Interferentes

A seletividade do imunossensor foi avaliada utilizando outras proteínas alergénicas do amendoim (*Arachis hypogaea*), nomeadamente Ara h 2 (5 ng/mL) e Ara h 6 (2,5 ng/mL), e outra proteína alergénica não-alvo, a Gal d 2 (Ovalbumina do ovo de galinha, *Gallus domesticus*; 180 mg/mL). Estas soluções foram analisadas na ausência de Ara h 1.

O estudo dos interferentes foi efetuado adicionando Ara h 1 (250 ng/mL) a cada uma das soluções das proteínas alergénicas em estudo, sendo que os resultados obtidos se encontram na figura 18.

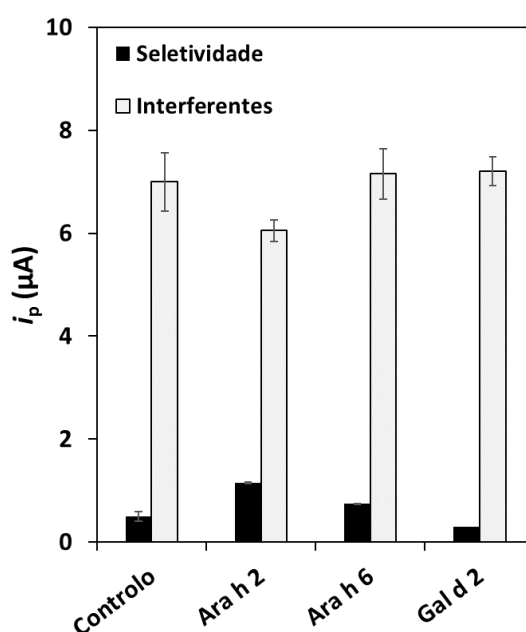


Figura 18 - Estudo da seletividade e interferentes utilizando proteínas alergénicas alvo (Ara h 1 - Controlo) e não-alvo (Ara h 2, Ara h 6 e Gal d 2). Parâmetros Experimentais: Ara h 1 (0 e 250 ng/mL); CA<sub>10</sub> 10 µg/mL; DAb 1:250; S-AP 1:200,000; 3-IP/Ag<sup>+</sup> 1 mM/0,4 mM.

Como se pode observar, relativamente às proteínas alergénicas da família do amendoim (Ara h 2 e Ara h 6), verifica-se um aumento ligeiro do  $i_p$  no estudo da seletividade, sendo este valor expectável tendo em conta as similaridades da constituição proteica. No estudo de interferentes, verifica-se um ligeiro decréscimo do  $i_p$  na presença de Ara h 2 uma vez que tanto a proteína alvo (Ara h 1) como a não-alvo (Ara h 2) competem pelo local de ligação aos anticorpos de captura e de deteção. Os testes efetuados utilizando a proteína não-alvo Gal d 2 demonstraram que não há ligação não-específica desta proteína aos anticorpos e que este também não interfere na análise.

## 4.12. Estudos de Recuperação

Para o estudo de recuperação, um extrato de bolacha (cujo rótulo indica que não contém amendoim ou frutos de casca rija) foi fortificada com quatro concentrações de Ara h 1 (50; 100; 250; 500 ng/mL), sendo que a Tabela 4 e a figura 19 demonstram os resultados obtidos.

Tabela 4 - Valores obtidos para o estudo da recuperação de Ara h 1.

Concentração Adicionada (ng/mL)	Concentração Detetada (ng/mL)	Recuperação (%)	RSD (%)
250	188,5	75,4	4,4
500	351,9	70,4	2,5

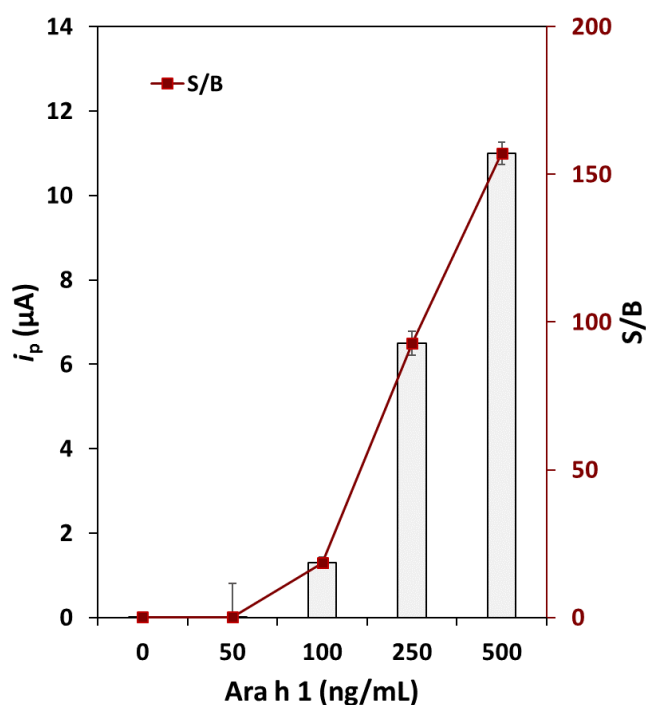


Figura 19 - Extrato de bolacha fortificado com Ara h 1 (0, 50, 100, 250 e 500 ng/mL). Parâmetros Experimentais: CAB 10  $\mu g/mL$ ; DAb 1:250; S-AP 1:200,000; 3-IP/Ag<sup>+</sup> 1 mM/0,4 mM.

Observando a Tabela 4 e a figura 19, é possível verificar que para as concentrações de 50 ng/mL e 100 ng/mL não foi possível calcular a percentagem de recuperação (apesar de ser possível a deteção de 100 ng/mL) uma vez que o valor obtido é inferior à ordenada na origem da reta de calibração, resultando num valor não quantificável. Para as concentrações de 250 ng/mL e 500 ng/mL, foram obtidas recuperações de 75,4 % e 70,4%, respetivamente.

#### 4.13. Otimização da Diluição da Amostra Alimentar e Quantificação de Ara h 1 em Amendoim

Na ausência de uma amostra certificada para proceder à validação dos resultados do biossensor, foi utilizada manteiga de amendoim em pó (amendoins (100%) de agricultura biológica; Certified Organic by Ecocert, Canadá).

De acordo com as recomendações sugeridas pela empresa à qual se comprou o Ara h 1 padrão (Indoor Biotechnologies), após efetuar o procedimento de extração recomendado (Material e Métodos, secção 3.4.4.), foi efetuada uma série de diluições da amostra devido à elevada variabilidade da concentração dos alergénios. Deste modo, foram testadas as seguintes diluições: 1:100; 1:500; 1:1000; 1:2500. Os resultados obtidos encontram-se na figura 20.

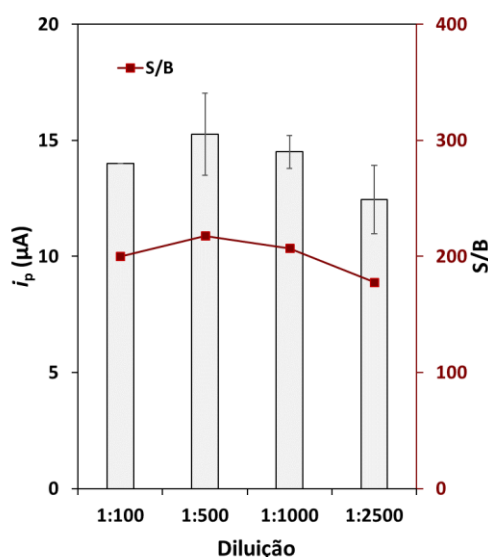


Figura 20 - Otimização da diluição da amostra alimentar (manteiga de amendoim em pó). Parâmetros Experimentais: CA<sub>b</sub> 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; DA<sub>b</sub> 1:250; S-AP 1:200,000; 3-IP/Ag<sup>+</sup> 1 mM/0,4 mM.

Apesar de se verificar que o  $i_p$  mais elevado corresponde à diluição 1:500, observa-se que os resultados demonstram menor precisão (RSD = 13,7%), ao contrário da diluição 1:1000 (RSD = 4,9%), sendo esta última a que indica o resultado mais fidedigno para o presente estudo. Verifica-se que para a diluição de 1:2500 há uma diminuição do  $i_p$ , bem como uma menor precisão (RSD = 17,0 %). Para a diluição de 1:100 observa-se saturação de sinal com boa precisão (RSD = 0,1 %), sendo esta uma diluição menos indicada para a análise da amostra. Deste modo, a diluição selecionada para prosseguir o estudo foi de 1:1000. Utilizando a diluição 1:1000 procedeu-se à quantificação de Ara h 1 na amostra e obteve-se uma concentração de  $4,8 \pm 0,3$  mg/g, estando de acordo com a literatura [23].

#### 4.14. Fortificação de uma Amostra Alimentar com Diferentes Percentagens de Amendoim

De modo a determinar a quantidade de amendoim em amostras alimentares, procedeu-se à adição de amendoim em diferentes percentagens (0,1 %; 0,5 %; 1 %; 2,5 %; 5 %; 10 %) numa amostra alimentar (bolacha) cujo rótulo indicava a ausência de amendoim e/ou frutos de casca rija, garantindo desta forma a presença de amendoim em quantidades conhecidas.

Com este estudo pretendeu-se avaliar a presença/ausência de amendoim e quantificar Ara h 1 na amostra alimentar relativamente à sua percentagem adicionada. Os resultados obtidos encontram-se presentes na figura 21.

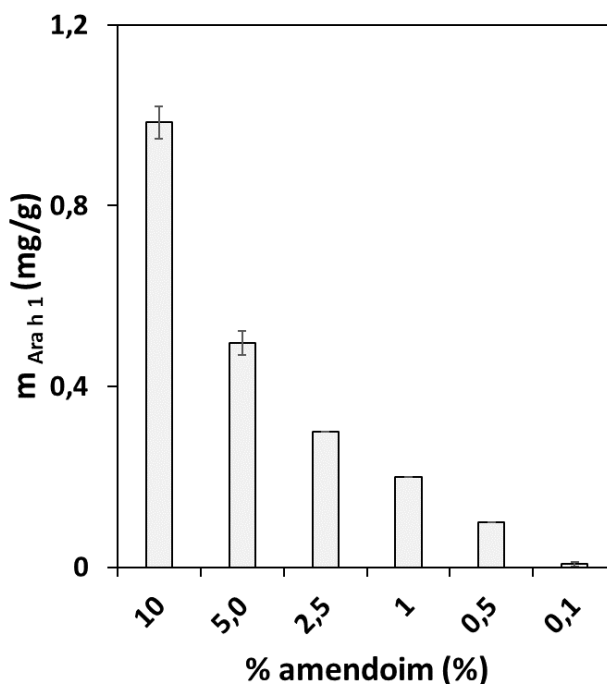


Figura 21 – Massa de Ara h 1 quantificada na amostra alimentar (mg/g) vs Amendoim adicionado (%).

#### 4.15. Análise de Amostras Alimentares: Imunossensor vs ELISA

Para a análise de amostras alimentares e quantificação de Ara h 1 utilizando o imunossensor eletroquímico desenvolvido, procedeu-se à obtenção de produtos alimentares num supermercado local. A seleção foi efetuada tendo por base alimentos mais vulgarmente consumidos ao pequeno-almoço uma vez que a ingestão de produtos que contenham amendoim e outros alergénios, após um período prolongado de não ingestão de alimentos, pode levar a reações alérgicas severas devido à maior capacidade de absorção dos alimentos no período do dia mencionado. Deste modo, os produtos alimentares em estudo foram: 1 - Farinha; 2 - Barra Energética (sem amendoim); 3 - Barra Proteica (5% de amendoim); 4 - Barra Proteica (12% de amendoim); 5 - Tremoço; 6 - Bolacha Belga; 7 - Bolacha Água e Sal; 8 - Bolacha Maria; 9 - Bolacha de Amendoim e Ananás (8% de amendoim); 10 - Cereal Integral; 11 - Granola; 12 - Muesli; 13 - Aveia; 14 - Ervilha; 15 - Soja; 16 - Amêndoa; 17 - Avelã. Para a extração do alergénio efetuou-se o procedimento experimental descrito em “Material e Métodos, secção 3.4.4”.

Entre os produtos analisados constam, para além do amendoim e da manteiga de amendoim, outros legumes (tremoço), produtos que não contém amendoim (farinha e barra energética), produtos que podem conter vestígios de amendoim (bolacha água e sal, bolacha maria, cereal integral, granola e muesli) e produtos que contém amendoim em percentagens conhecidas (barras proteicas e bolacha de amendoim e ananás).

Foram testadas as amostras alimentares referidas, bem como alguns ingredientes representativos. Os resultados obtidos encontram-se graficamente apresentados na figura 22. Para além dos resultados obtidos para a quantificação de Ara h 1 em mg/g em amostras alimentares, representam-se na figura 22 os resultados obtidos para amostras cuja percentagem de amendoim é conhecida (10 %; 5,0 %; 2,5 %; 1,0 %; 0,5 %; 0,1 %), permitindo uma análise gráfica entre as amostras alimentares e as amostras de percentagem de amendoim conhecidas.

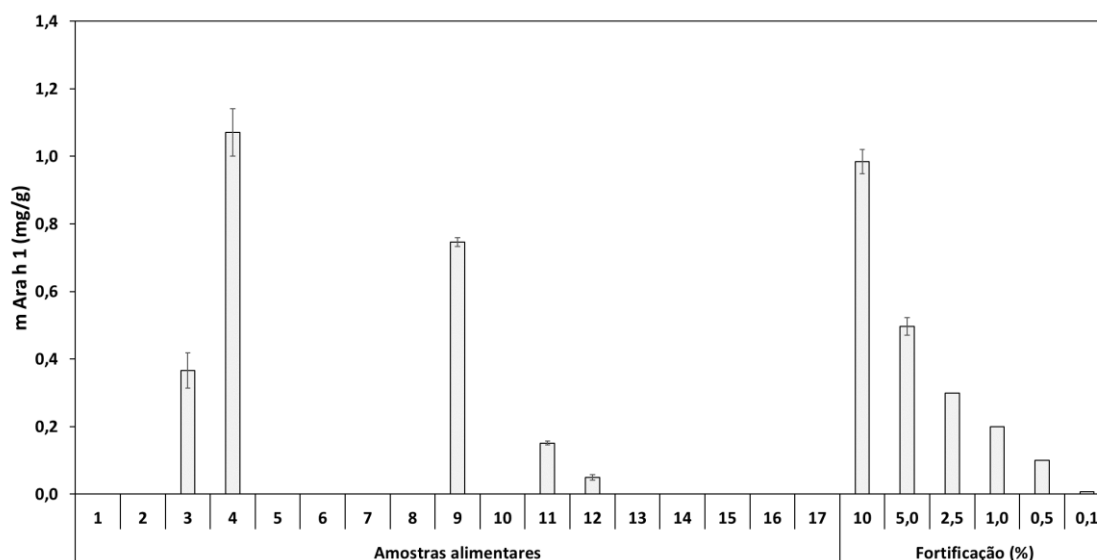


Figura 22 - Quantificação em mg/g de Ara h 1 em amostras alimentares e resultados obtidos para a adição de amendoim em diferentes % (10 %; 5,0 %; 2,5 %; 1,0 %; 0,5 %; 0,1 %) numa amostra alimentar (bolacha sem amendoim). Legenda: 1 - Farinha; 2 - Barra Energética (sem amendoim); 3 - Barra Proteica (5% de amendoim); 4 - Barra Proteica (12% de amendoim); 5 - Tremoço; 6 - Bolacha Belga; 7 - Bolacha Água e Sal; 8 - Bolacha Maria; 9 - Bolacha de Amendoim e Ananás (8% de amendoim); 10 - Cereal Integral; 11 - Granola; 12 - Muesli; 13 - Aveja; 14 - Ervilha; 15 - Soja; 16 - Amêndoa; 17 - Avelã.

Comparando os resultados da fortificação com as amostras em estudo, é possível concluir que as percentagens de amendoim apresentadas no rótulo dos produtos 3, 4 e 9 estão em conformidade com o rotulado. A análise efetuada permite ainda concluir que o produto 11 apresenta valores entre 0,5% a 1,0% de amendoim e o produto 12 apresenta valores entre 0,1% a 0,5% de amendoim, cujas percentagens eram desconhecidas no rótulo de cada um destes.

Após análise de todas as amostras alimentares, as mesmas foram analisadas utilizando o kit ELISA realizado de acordo com o procedimento descrito em “Material e Métodos, secção 3.5. Validação do método”. Os dados foram obtidos segundo os cálculos expostos no Anexo A (massa de Ara h 1 presente nas amostras alimentares). Os resultados encontram-se na Tabela 5, onde constam a média das massas de Ara h 1 calculadas, obtidas utilizando o imunossensor desenvolvido e o kit ELISA e o respetivo desvio relativo.

Tabela 5 – Resultados obtidos para a quantificação de Ara h 1 (mg/g) num conjunto de amostras alimentares.

<b>Alimento/ Ingrediente</b>	<b>Ara h 1 (mg/g)</b>		<b>Desvio Relativo (%)</b>
	<b>Imunossensor</b>	<b>ELISA</b>	
<b>Amendoim</b>	4,29 ± 0,16	4,33 ± 0,31	-0,92
<b>Manteiga de Amendoim</b>	4,85 ± 0,26	4,70 ± 0,41	3,19
<b>Farinha</b>	Nd	Nd	Nd
<b>Barra Energética (Sem amendoim)</b>	Nd	Nd	Nd
<b>Barra Proteica (5% amendoim)</b>	0,37 ± 0,05	0,40 ± 0,04	-7,50
<b>Barra Proteica (12% amendoim)</b>	1,07 ± 0,07	0,95 ± 0,05	12,6
<b>Bolacha Belga (Sem amendoim)</b>	Nd	Nd	Nd
<b>Bolacha Água e Sal (Pode conter vestígios)</b>	Nd	Nd	Nd
<b>Bolacha Maria (Pode conter vestígios)</b>	Nd	Nd	Nd
<b>Bolacha de Amendoim e Ananás (8% amendoim)</b>	0,75 ± 0,01	0,77 ± 0,03	-2,60
<b>Cereal Integral (Pode conter vestígios)</b>	Nd	Nd	Nd
<b>Granola (Pode conter vestígios)</b>	0,15 ± 0,01	0,20 ± 0,01	-25,0
<b>Muesli (Pode conter vestígios)</b>	0,05 ± 0,01	0,09 ± 0,01	-44,4
<b>Aveia</b>	Nd	Nd	Nd
<b>Amêndoa</b>	Nd	Nd	Nd
<b>Avelã</b>	Nd	Nd	Nd
<b>Ervilha</b>	Nd	Nd	Nd
<b>Tremoço</b>	Nd	Nd	Nd
<b>Soja</b>	Nd	Nd	Nd

\*Nd – Não detetável

Após análise dos resultados, apresentados na Tabela 5, verifica-se que é eficientemente determinada a ausência (Nd– Não detetável) de Ara h 1 para Farinha, Barra energética, Bolacha Belga, Bolacha Água e Sal, Bolacha Maria, Cereal Integral, Aveia, Amêndoa, Avelã, Ervilha, Tremoço e Soja, permitindo constatar que o imunossensor desenvolvido é seletivo ao alergénio em estudo, visto que para os alimentos que contém amendoim (Amendoim, Manteiga de Amendoim, Barras Proteicas (5% e 12%), Bolacha de Amendoim e Ananás (8%), Granola e Muesli (podem conter vestígios)) é possível detetar e quantificar Ara h 1.

Pode verificar-se através dos resultados obtidos que a quantificação das amostras alimentares cujos rótulos indicavam a percentagem de amendoim presente foi efetuada com precisão. Das amostras que continham no rótulo a indicação “Pode conter vestígios de amendoim” (Bolacha Belga, Bolacha Água e Sal, Bolacha Maria, Cereal Integral, Granola e Muesli), apenas foi possível quantificar o Ara h 1 na Granola e no Muesli, indicando estes resultados que dos produtos alimentares analisados apenas estes efetivamente continham vestígios de amendoim.

Dos ingredientes em estudo (Farinha, Aveia, Amêndoa, Avelã, Ervilha, Tremoço e Soja), verificou-se que não interferiam na análise e que a quantidade de Ara h 1 foi inferior ao limite de deteção do método.

Os resultados dos desvios relativos para amostras que contém a indicação da percentagem de amendoim são inferiores a 15%, o que confirma que os resultados do sensor são exatos. Verificam-se, contudo, valores superiores para as amostras de granola e muesli, sendo ambos superiores na técnica ELISA. Estes resultados podem dever-se ao efeito de matriz da amostra que se observa nos valores relativos à técnica ELISA, contrariamente ao imunossensor desenvolvido (no qual o efeito matriz da amostra não é representativo devido à excelente seletividade do biossensor).

Na figura 23, encontra-se representada a correlação entre os resultados obtidos ( $m = 1,02$  e  $r=0,999$ ), do imunossensor eletroquímico vs. ELISA. Assim, mais uma vez, pode-se concluir que os resultados do sensor são exatos.

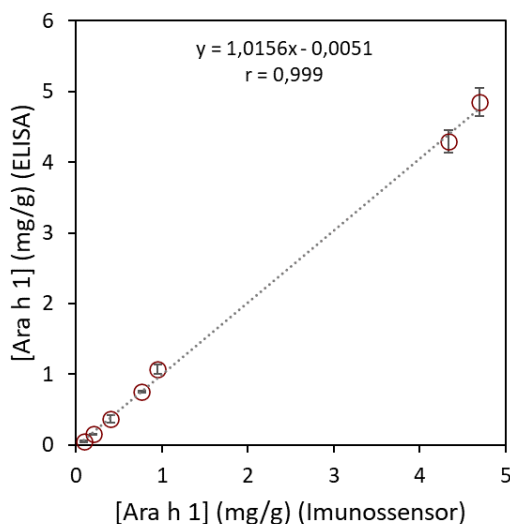


Figura 23 – Correlação entre os resultados obtidos utilizando o imunossensor eletroquímico vs. ELISA.

É importante referir que as metodologias utilizadas (imunossensor e kit ELISA) apresentam características distintas, nomeadamente:

- O tempo de ensaio utilizando o imunossensor é de 2 horas e 20 minutos, englobando todas as etapas de análise. O kit ELISA efetua-se em 2 horas, contudo este método requer ainda etapas de lavagem exaustivas (3 vezes por etapa), com tempo estimado de 10 minutos entre cada etapa, adicionando-se ainda o tempo para a leitura das absorvâncias. Para além disso, o tempo de manuseio/trabalho (*hands-on time*), é consideravelmente inferior no imunossensor, comparando com o kit ELISA (10 minutos vs. 30 minutos, respetivamente);

- Para o imunossensor, são utilizados elétrodos de uso único (um por cada amostra), sendo apenas necessário utilizar em número proporcional de amostras em estudo. Com o kit ELISA, é utilizada uma placa de 96 poços, independentemente do número de amostras, a qual poderá ficar inutilizada caso a amostragem seja reduzida;

- Relativamente à sustentabilidade dos métodos, o kit ELISA requer um maior volume de reagentes e soluções (ELISA requer 100 µL por poço vs. Imunossensor requer 40 µL por elétrodo) comparativamente ao imunossensor desenvolvido;

- Adicionalmente, o imunossensor eletroquímico apresenta características como portabilidade, baixo custo e permite que as análises sejam realizadas no local da amostragem. De outro modo, para efetuar a técnica ELISA são necessários equipamentos de grande porte para realizar a leitura das absorvâncias e pessoal técnico especializado para executar a análise.

Assim, é consideravelmente mais vantajoso utilizar o imunossensor eletroquímico desenvolvido em detrimento do kit ELISA para análises de rotina.

#### 4.16. Comparação com Trabalhos Anteriores

Na Tabela 6 apresentam-se algumas características referentes ao desenvolvimento de imunossensores e imunoenaios eletroquímicos reportados para análise de Ara h 1.

Tabela 6 – Características de imunossensores e imunoenaios eletroquímicos para análise de Ara h 1.

Transdutor	Tipo de ensaio	Tempo de ensaio	LOD	Amostras	Referência
SPCE/NDs	<i>Sandwich</i>	2h 20 min	0,78 ng/mL	Bolachas, cereais, barras energéticas e proteicas	Este trabalho
SPCE/AuNPs	<i>Sandwich</i>	3h 50 min	3,8 ng/mL	Bolachas e chocolates	[23]
AuE/11-MUA	<i>Label-free</i>	5 min	0,3 nM	SD	[36]
"Silicon Wafer"/SWCNT	<i>Label-free</i>	30 min	1,0 ng/mL	SD	[37]
SPCE/MBs	<i>Sandwich</i>	2h	6,3 ng/mL	Saliva e alimentos derivados do amendoim	[38]

\*11-MUA: Ácido 11-mercaptoundecanoico; AuE: Eléctrodo convencional de ouro; AuNPs: Nanopartículas de Ouro; MBs: Partículas magnéticas; SD: Sem Dados; "Silicon Wafer"; SPCE: Eléctrodo serigrafado de carbono; SWCNT: Nanotubos de carbono de parede simples.

O elemento transdutor mais descrito na literatura é o SPCE. Contudo, no trabalho de Huang et al. [36] foi utilizado um eléctrodo convencional de ouro, o qual requer um processo de limpeza complexo e laborioso. No trabalho de Sobhan et al. [37] foi utilizado como plataforma transdutora "Silicon Wafer" que requer várias etapas para poder ser empregue no desenvolvimento do imunossensor, sendo este procedimento moroso.

Em todos os trabalhos descritos foram utilizados nanomateriais (AuNPs, SWCNT), micromateriais (MBs) e/ou monocamadas auto-organizadas (11-MUA). A sua utilização tem como objetivo a imobilização do anticorpo de captura de forma eficaz e estável.

Huang et al. [36] e Sobhan et al. [37] desenvolveram ensaios do tipo *label-free*, em que o tempo de ensaio é consideravelmente inferior aos ensaios do tipo *sandwich*. Contudo, o formato utilizado (*label-free*) exige tempos prolongados na preparação da plataforma transdutora, sendo consideravelmente superiores aos ensaios do tipo *sandwich*.

Dos trabalhos descritos encontrados na literatura, apenas Alves et al. [23] e Montiel et al. [38] utilizaram amostras alimentares para validar as metodologias desenvolvidas

O imunossensor eletroquímico desenvolvido nesta dissertação apresenta vantagens diferenciadas relativamente aos descritos até à data. A nanoestruturação do SPCE com NDs para a determinação do Ara h 1 ainda não foi descrita, sendo que a utilização deste nanomaterial é considerada inovadora na estruturação da plataforma transdutora e imobilização do anticorpo de captura devido à configuração 3D do nanomaterial de carbono conferindo maior disponibilidade de locais de ligação. Além disso, usufruindo de um tempo de ensaio de 2 horas e 20 minutos, obteve-se um limite de deteção (LOD) de 0,78 ng/mL, sendo este valor consideravelmente inferior aos ensaios do tipo *sandwich* descritos, permitindo um melhor rastreio de amostras alimentares. Ainda se verificou que a plataforma desenvolvida (SPCE/ND) é estável durante pelo menos 2 semanas, permitindo a preparação da plataforma atempadamente.



## 5. Conclusão

As alergias alimentares são consideradas pela Organização Mundial da Saúde um dos principais problemas de saúde. Entre os alimentos/produtos alimentares que podem originar alergia, o amendoim destaca-se por causar reações alérgicas de moderadas a severas num curto espaço de tempo após a sua ingestão, podendo ser potencialmente fatais. A prevenção e a não ingestão destes produtos são as alternativas possíveis uma vez que não existem tratamentos para pessoas alérgicas.

A deteção de quantidades vestigiais de um alergénio de amendoim, nomeadamente Ara h 1, foi efetuada na presente dissertação utilizando um imunossensor eletroquímico. Foram utilizados SPCEs como plataforma transdutora, sendo o WE nanoestruturado com nanodiamantes dispersos em água (SPCE/ND). O imunoensaio do tipo *sandwich* foi desenvolvido num tempo de análise total inferior a 2 horas e 30 minutos, com um tempo de manuseio de 10 minutos. O sinal voltamétrico foi obtido utilizando a voltametria de varrimento linear. Em condições experimentais otimizadas, verificou-se a resposta linear do imunossensor desenvolvido entre 25 e 500 ng/mL, obtendo-se um limite de deteção de 0,78 ng/mL. Foi analisada a estabilidade do SPCE/ND biofuncionalizado com anticorpo de captura, verificando-se um período de estabilidade de 2 semanas.

A análise de Ara h 1 em amostras alimentares foi efetuada com sucesso. Testaram-se vários produtos alimentares, nomeadamente amendoim, manteiga de amendoim, bolachas, cereais, barras energéticas e proteicas, que contém amendoim. Para além destes, analisaram-se outros legumes como ervilha e tremço. Foram ainda testados produtos que “podem conter vestígios de amendoim”, bem como ingredientes que englobam a matriz das amostras alimentares. Os alimentos analisados que continham amendoim foram quantificados e os resultados foram validados utilizando a técnica ELISA.

A nanoestruturação de SPCEs com NDs para a análise e determinação do Ara h 1 e/ou outros alergénios alimentares em produtos alimentares utilizando um imunossensor eletroquímico não foi descrita na literatura até à data, sendo a modificação da superfície transdutora referida descrita pela primeira vez nesta dissertação.

O imunossensor desenvolvido apresenta vantagens comparativamente aos métodos clássicos, nomeadamente pela sua sensibilidade, portabilidade, miniaturização, baixo custo, permitindo que as análises sejam realizadas no local da amostragem. O pré-tratamento da amostra para a extração do alergénio é efetuado num formato simplificado, com um tempo inferior a 1 hora.

O método utilizado e desenvolvido nesta dissertação permite a deteção de um alergénio de amendoim em quantidades vestigiais (até 0,1%), permitindo analisar com precisão amostras disponíveis comercialmente e processadas em indústrias de bens alimentícios.

Como perspetivas futuras, sugere-se o desenvolvimento de metodologias que forneçam resultados em menos tempo. Isto pode ser atingido, por exemplo, através da análise do alergénio num formato de ensaio do tipo *label-free* ou alteração da marca enzimática. A redução do tempo de análise pode ser efetuada por exemplo num formato de ensaio do tipo *label-free* uma vez que não é necessário utilizar anticorpo de deteção, enzima e substrato enzimático. Alterando a marca enzimática, pode também reduzir o tempo de análise visto que existem substratos enzimáticos alternativos ao testado na presente dissertação que necessitam de menor tempo de reação.

## Referências Bibliográficas

- [1] Grupo de Reação e Análises Químicas. <http://www.graq.isep.ipp.pt/>
- [2] Chafen JJ, Newberry SJ, Riedl MA, Bravata DM, Maglione M, Suttorp MJ, Sundaram V, Paige NM, Towfigh A, Hulley BJ, Shekelle PG. (2010) *Diagnosing and managing common food allergies: a systematic review*. *JAMA* 303:1848–1856.
- [3] Berin MC, Sicherer S (2011) *Food allergy: mechanisms and therapeutics*. *Current Opinion in Immunology* 23:794–800.
- [4] Leung A, Kamat D. (2008) em: *Chesterton CM (ed) Food allergies: new research*. New York, Nova Science Publishers Inc.
- [5] Yue D, Ciccolini A, Avilla E, Wasserman S. (2018) Food allergy and anaphylaxis. *Journal of Asthma and Allergy*. 11, 111–120.
- [6] Jonathan O’B. Hourihane, MD, DM (2016). Peanut Allergen Threshold Study (PATS): Novel single-dose oral food challenge study to validate eliciting doses in children with peanut allergy.
- [7] Loh W, Tang MLK. (2018) The Epidemiology of Food Allergy in the Global Context. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 15(9): 2043.
- [8] Tham EH, Leung DYM. (2018) How Different Parts of the World Provide New Insights into Food Allergy. *Allergy, Asthma & Immunology Research*. 10(4): 290–299.
- [9] Direção-Geral de Saúde (DGS). Alergias alimentares. <http://www.dgs.pt/>
- [10] Alves RC, Barroso MF, González-García MB, Oliveira MBPP, Delerue-Matos C. (2016) New Trends in Food Allergens Detection: Toward Biosensing Strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 56(14): 2304–19.
- [11] Regulamento (UE) Nº1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de outubro de 2011. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:02011R1169-20180101&from=EN>
- [12] de Leon MP, Rolland JM, O’Hehir RE (2007) The peanut allergy epidemic: allergen molecular characterization and prospects for specific therapy. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 9:1–18.
- [13] Khodoun M, Strait R, Orekov T, Hogan S, Karasuyama H, Herbert DR, Jörg Köhl MD, Finkelman FD (2009) Peanuts can contribute to anaphylactic shock by activating complement. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 123:342–351.
- [14] *International Union of Immunological Societies (IUIS)*. <http://www.allergen.org/>
- [15] Alves RC, Pimentel FB, Nouws HPA, Correr, W, González-García MB, Oliveira MBPP, Delerue-Matos C. (2015) Detection of the peanut allergen Ara h 6 in foodstuffs using a voltammetric biosensing approach. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 407, 7157–7163.

- [16] Krause S, Reese, G Randow S, Zennaro D, Quaratino D, Palazzo P, Ciardiello MA, Petersen A, Becker W, Mari A. (2009) Lipid transfer protein (Ara h 9) as a new peanut allergen relevant for a Mediterranean allergic population. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 124(4): 771-8.e5.
- [17] Chruszcz M, Maleki SJ, Majorek KA, Demas M, Bublin M, Solberg R, Hurlburt BK, Ruan S, Mattisoehn CP, Breiteneder H, Minor W. (2011) Structural and Immunologic Characterization of Ara h 1, a Major Peanut Allergen. *The journal of biological chemistry*. 286, 39318–39327.
- [18] Taylor SL, Nordlee JA, Niemann LM, Lambrecht DM. (2009) Allergen immunoassays—considerations for use of naturally incurred standards. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 395, 83–92.
- [19] Pandey AK, Varshney RK, Sudini HK, Pandey MK. (2019) An Improved Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Based Protocol Using Seeds for Detection of Five Major Peanut Allergens Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3, Ara h 6, and Ara h 8. *Frontiers in Nutrition*. 6: 68.
- [20] *Sandwich* ELISA protocol. Leinco Technologies, Inc. <https://www.leinco.com/sandwich-elisa-protocol/>
- [21] Van Hengel, A.J. (2007) Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 389(1):111–118.
- [22] Neethirajan S, Weng X, Tah A, Cordero JO, Ragavan KV. (2018) Nano-biosensor platforms for detecting food allergens-New trends. *Sensing and Bio-Sensing Research*. 18, 13–30.
- [23] Alves RC, Pimentel FB, Nouws HPA, Marques RCB, González-García MB, Oliveira MBPP, Delerue-Matos C. (2015) Detection of Ara h 1 (a major peanut allergen) in food using an electrochemical gold nanoparticle-coated screen-printed immunosensor. *Biosensors and Bioelectronics*. 64, 19–24.
- [24] Thévenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS. (2001) Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics*. 16, 121–131.
- [25] Felix FS, Angnes L. (2018) Electrochemical immunosensors – a powerful tool for analytical applications. *Biosensors and Bioelectronics*. 102, 470–478.
- [26] Mishra GK, Barfidokht A, Tehrani F, Mishra RK. (2018) Food safety analysis using electrochemical biosensors. *Foods*. 7(9), 141.
- [27] Li, M, Li, Y, Li, D, Long, Y (2012). Recent developments and applications of screen-printed electrodes in environmental assays—A review, *Analytica Chimica Acta* 734, 31-44.
- [28] Arduini, F, Micheli, L, Moscone, D, Paleschi, G, Piermarini, S, Ricci, F, Volpe, G (2016). Electrochemical biosensors based on nanomodified screen- -printed electrodes: Recent applications in clinical analysis, *Trends in Analytical Chemistry* 79, 114-126.
- [29] Tudorache, M, Bala, C (2007). Biosensors based on screen-printing technology, and their applications in environmental and food analysis, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388, 565-578.
- [30] Campuzano S, Montiel V, Seratin V, Yáñez-Sedeño P, Pingarrón J. (2020) Cutting-edge advances in electrochemical affinity biosensing at different molecular level of emerging food allergens and adulterants. *Biosensors*. 10(2), 10.

- [31] Zhang Y, Chen X. (2019) Nanotechnology and nanomaterials based no-wash electrochemical biosensors: from design to application. *Nanoscale*. 11, 19105–19118.
- [32] Gomes, F.; Freitas, M.; Nouws, H.; Morais, S.; Delerue-Matos C. Graphene as a Material for Bioelectrochemistry. In Encyclopedia of Interfacial Chemistry Surface Science and Electrochemistry; K.B.T.-E. of I.C. Wandelt (Ed.), Elsevier, Oxford, 2018: pp. 235–240. DOI:10.1016/B978-0-12-409547-2.13519-X.
- [33] Wang, J. Analytical Electrochemistry, Third Edition. Published by John Wiley and Sons, Inc. New York, USA. 2006, pp. 1-250. ISBN 0-471-28272-3.
- [34] Contreras-Naranjo JE, Aguilar O. (2019) Suppressing non-specific binding of proteins onto electrode surfaces in the development of electrochemical immunosensors. *Biosensors*. 9, 15.
- [35] Skoog, DA, West, DM, Holler, FJ, Crouch, SR, Fundamentos de Química Analítica. Editora Thomson. Tradução da 8ª edição norte-americana. 628, 655pp. (versão PDF do documento descarregada em 22 de outubro de 2015).
- [36] Huang Y, Bell MC, Suni I. (2008) Impedance Biosensor for Peanut Protein Ara h 1. *Analytical Chemistry*. 80, 9157–9161.
- [37] Sobhan A, Oh J, Park M, Kim SW, Park C, Lee J. (2018) Single walled carbon nanotube-based biosensor for detection of peanut allergy-inducing protein Ara h 1. *Korean Journal of Chemical Engineering*. 35(1), 172–178.
- [38] Montiel VR, Campuzano S, Pellicanò A, Torrente-Rodríguez RM, Reviejo AJ, Cosío MS, Pingarrón JM. (2015) Sensitive and selective magnetoimmunosensing platform for determination of the food allergen Ara h 1. *Analytica Chimica Acta*. 880, 52–59.



## Anexos

### A. Cálculo da massa de Ara h 1 em amostras alimentares

Utilizando a equação obtida através da reta de calibração ( $i_p$  ( $\mu\text{A}$ ) = (0,027  $\pm$  0,001) [Ara h 1] + (1,41  $\pm$  0,313),  $r = 0,994$ ,  $n = 5$  (Sector 4.9.)), é possível quantificar a massa de Ara h 1 nas amostras alimentares selecionadas para o estudo e obtidas comercialmente. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Tabela 5, no sector 4.15.

Exemplo de Cálculo (manteiga de amendoim):

→ Intensidade de corrente  $i_p$  obtida nos ensaios realizados

$$i_{p1} = 15 \mu\text{A}$$

$$i_{p2} = 14 \mu\text{A}$$

→ Dados necessários

$$m_{\text{amostra}} = 1,000 \text{ g}$$

$$V_{\text{sol. extração}} = 10,00 \text{ mL}$$

$$F_d \text{ (Fator de Diluição)} = 1000$$

→ Concentração de Ara h 1 em ng/mL

$$i_{p1} = 0,027 \times [\text{Ara h 1}]_1 + 1,41 \leftrightarrow$$

$$\leftrightarrow 15 = 0,027 \times [\text{Ara h 1}]_1 + 1,41 \leftrightarrow$$

$$\leftrightarrow [\text{Ara h 1}]_1 = 503,3 \text{ ng/mL}$$

$$i_{p2} = 0,027 \times [\text{Ara h 1}]_2 + 1,41 \leftrightarrow$$

$$\leftrightarrow 14 = 0,027 \times [\text{Ara h 1}]_2 + 1,41 \leftrightarrow$$

$$\leftrightarrow [\text{Ara h 1}]_2 = 466,3 \text{ ng/mL}$$

→ Concentração de Ara h 1 em mg/g

$$[\text{Ara h 1}]_1 = 503,3 \text{ ng/mL} \times 1000 \times 10,00 \text{ mL} / 1,000 \text{ g} \times 10^{-6} \frac{\text{mg}}{\text{ng}} =$$

$$5,03 \text{ mg/g}$$

$$[\text{Ara h 1}]_2 = 466,3 \text{ ng/mL} \times 1000 \times 10,00 \text{ mL} / 1,000 \text{ g} \times 10^{-6} \text{ mg/ng} =$$

$$4,66 \text{ mg/g}$$

→ Concentração média final de Ara h 1 (Média ± Desvio Padrão) em mg/g

$$[\text{Ara h 1}]_{\text{manteiga de amendoim}} = (4,85 \pm 0,26) \text{ mg/g}$$

→ **Existe 4,85 ± 0,26 mg de Ara h 1 por 1 g de amostra de Manteiga de Amendoim.**