

Desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico para a análise de um alergénio alimentar

DUARTE JORGE MAGALHÃES GUIMARÃES

Julho de 2023

DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSENSOR ELETROQUÍMICO PARA A ANÁLISE DE UM ALERGÉNIO ALIMENTAR

Duarte Jorge Magalhães Guimarães

Estudante n.º 1180770

Dissertação apresentada ao Instituto Superior de Engenharia do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, realizada sob a orientação do Doutor Hendrikus Nouws e da Doutora Maria Freitas.

2023

Instituto Superior de Engenharia do Porto

Departamento de Física

isen

P.PORTO

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Hendrikus Nouws, pelos conselhos oportunos, pela orientação sempre pertinente e pelo apoio constante.

À Maria Freitas pela orientação, pela sua disponibilidade, pelo apoio contínuo, pelas lições e conselhos dados e pela imensa ajuda e suporte dado neste projeto.

A todas as pessoas que de uma forma ou outra contribuíram para que este projeto fosse possível.

À minha família, pela presença contínua e pelo incentivo nos momentos mais difíceis e por todo o apoio.

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 UIDP/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.



página propositadamente em branco

RESUMO

A alergia ao aipo pode ocorrer através da inalação ou do contacto direto ou indireto com o alimento, podendo levar a consequências graves no organismo, como por exemplo urticárias, falta de ar e inchaço na garganta e/ou em casos mais severos, choque anafilático. Por este motivo, é importante desenvolver métodos que permitam a deteção e quantificação do alergénio em amostras alimentares. Técnicas analíticas com capacidade de deteção rápida podem contribuir para o controlo dos rótulos de produtos alimentares, garantindo que indivíduos com hipersensibilidade possam consumir alimentos sem que ocorram reações indesejáveis.

O objetivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico, em formato *sandwich*, para a análise de um alergénio do Aipo (Api g 1) em amostras alimentares comerciais. Foram utilizados eléctrodos serigrafados de carbono (SPCE, transdutor) que foram biomodificados com um anticorpo de captura (CAb, bioreceptor). Posteriormente, o alergénio foi incubado juntamente com um anticorpo de deteção biotinilado (DAb), seguindo-se a incubação da enzima peroxidase conjugada com estreptavidina (HRP-Strep) e subsequente adição do substrato enzimático 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB-H₂O₂), obtendo-se o sinal eletroquímico por cronoamperometria. O tempo total do ensaio foi de 1h45min.

Foram efetuadas otimizações das condições experimentais (i.e., das concentrações do CAb, do DAb e da HRP-Strep, dos tempos de incubação e do formato de ensaio) que permitiram obter as melhores condições de análise. As principais características do imunossensor, em termos do desempenho analítico, foram: linearidade entre 50 a 4000 ng/mL, limite de deteção de 45 ng/mL, limite de quantificação de 151 ng/mL e coeficiente de variação de 4,7% (o que indica uma boa precisão). Confirmou-se a seletividade do sensor através da análise de outros alergénios alimentares (peixe, crustáceos, ovo, amendoim), que também revelaram não interferir na análise. Foi efetuado o estudo de recuperação, utilizando uma amostra alimentar, tendo sido obtidas percentagens que variaram entre 95% e 115%, o que demonstrou a exatidão dos resultados. Avaliou-se a estabilidade do sensor durante 6 semanas consecutivas, observando-se que neste período a plataforma desenvolvida respondia de forma efetiva. Deste modo, é possível preparar, biomodificar e armazenar o transdutor durante várias semanas, permitindo a redução do consumo de reagentes e soluções e do tempo necessário para a sua preparação.

A aplicabilidade do imunossensor foi avaliada através da análise de 20 amostras alimentares comerciais, que contemplaram as seguintes: 1 amostra cujo rótulo menciona “contém 3% de aipo”, 3 amostras cujos rótulos referem “contém aipo”, 3 amostras que “pode conter”, e 7 amostras que não contêm qualquer vestígio de aipo. Para além destas, foram analisadas 6 amostras de aipo (folha, caule e raiz, de aipo fresco e de aipo congelado), tendo sido analisado o efeito do processo de congelação do alimento para uma melhor compreensão da sua influência na conservação do alergénio. A deteção e quantificação do alergénio foram efetuadas com sucesso e os resultados obtidos demonstraram que os rótulos dos produtos se encontraram em conformidade com a legislação europeia (Regulamento (UE) n.º 1169/2011), determinando também que o imunossensor desenvolvido poderá ter utilidade prática para consumidores e indústrias alimentares.

PALAVRAS-CHAVE: alergia alimentar; aipo; Api g 1; cronoamperometria; imunossensor eletroquímico; SPCE

página propositadamente em branco

ABSTRACT

Celery allergy can occur through inhalation or direct or indirect contact with food, which can lead to serious, adverse health consequences, such as hives, shortness of breath and swelling of the throat, and/or in more severe cases, anaphylactic shock. For this reason, it is important to develop methods that allow the detection and quantification of the allergen in food samples. Analytical techniques with a fast detection capacity can contribute to the control of food product labels, ensuring that individuals with allergic hypersensitivity can safely consume pre-packed food, without undesirable reactions.

In this work, a sandwich-type electrochemical immunosensor was developed for the analysis of a celery allergen (Api g 1) in commercial food samples. Screen-printed carbon electrodes (SPCE, transducer) were biomodified with a capture antibody (CAb, bioreceptor). Subsequently, the allergen was incubated with a biotinylated detection antibody (DAb), followed by the addition of the enzyme-conjugate, peroxidase-streptavidin (HRP-Strep), and subsequent incubation of the enzymatic substrate 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB-H₂O₂), followed by electrochemical signal acquisition through chronoamperometry. The total assay time was 1h45min.

Several experimental conditions were optimized (i.e., CAb, DAb, and HRP-Strep concentrations, incubation times, and assay format), to obtain the best analysis conditions. The main analytical characteristics of the immunosensor were: linearity between 50 and 4000 ng/mL, detection limit of 45 ng/mL, quantification limit of 151 ng/mL, and coefficient of variation of 4.7% (which indicates good precision). The selectivity of the immunosensor was confirmed through the analysis of other food allergens (fish, crustaceans, eggs, peanuts), which also did not interfere in the analysis. The recovery study was carried out using a food sample, and the obtained results vary between 95% and 115%, indicating the accuracy of the results. The storage stability was evaluated during 6 consecutive weeks and the measurements revealed that the sensing phase was stable during the tested period. Thus, it is possible to prepare, biomodify, and store the transducer for several weeks, reducing the consumption of reagents and solutions and the time required for its preparation.

The applicability of the immunosensor was assessed through the analysis of 20 commercial food samples, which included the following: 1 sample whose label mention “contains 3% celery”, 3 samples whose labels state “contains celery”, 3 samples whose label refers “may contain”, and 7 samples that do not contain traces of celery. In addition, 6 celery samples (consisting of leaf, stem, and root, from fresh celery and frozen celery) were analysed. The effect of the freezing process was studied for a better understanding of its influence on the storage and preservation of the allergen. The detection and quantification were successfully performed and the results demonstrated the conformity of the products' labels with European legislation (Regulation (EU) No. 1169/2011), which also attested that the developed immunosensor may be of practical use for consumers and food industries.

KEYWORDS

Api g 1; celery; chronoamperometry; electrochemical immunosensor; food allergy; SPCE

página propositadamente em branco

ÍNDICE

RESUMO	I
ABSTRACT	III
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABELAS	XI
LISTAS DE SIGLAS E SÍMBOLOS	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Enquadramento e pertinência	1
1.1.1. Prevalência	1
1.1.2. Sintomas e reações associadas	1
1.1.3. Alergénios identificados no Aipo	2
1.1.4. Reatividade cruzada	3
1.1.5. Diagnóstico	4
1.1.6. Legislação relativa a alérgenos alimentares	5
1.1.7. Efeitos da alergenidade no processamento do aipo	5
1.1.8. Métodos analíticos para a análise de aipo em produtos alimentares	6
1.1.9. Biossensores	6
1.1.9.1. Classificação	6
1.1.9.2. Técnicas eletroquímicas	8
1.2. Questão e objetivos de investigação	8
1.3. Opções metodológicas	9
1.4. Estrutura do trabalho	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 Métodos para a análise de Aipo	11
2.1.1. ELISA	12
2.1.2. PCR	12
2.1.3. (Bio)sensores e dispositivos <i>Lab-on-a-chip</i>	13
2.2 Métodos de extração de alérgenos de aipo de amostras alimentares	13
3. MÉTODOS E APLICAÇÃO	15
3.1. Material, Equipamentos, Reagentes e Soluções	15
3.2. Ensaio de Otimização	15
3.2.1. Procedimento experimental	15
3.2.2. Procedimento para extração do alérgeno de amostras alimentares	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1. Otimização dos parâmetros/variáveis experimentais	17
4.1.1. Otimização da concentração de anticorpo de captura (CAb)	17
4.1.2. Otimização da concentração de anticorpo de deteção (DAb)	18
4.1.3. Etapa de bloqueio	19

4.1.4. Otimização da diluição da enzima peroxidase conjugada com estreptavidina (HRP-Strep) 20	
4.1.5. Otimização do tempo de incubação do alergénio.....	21
4.1.6. Otimização do formato do ensaio	22
4.2. Avaliação de interações não específicas e funcionamento do imunossensor	23
4.3. Desempenho analítico do imunossensor	24
4.4. Estudo da seletividade e interferentes	25
4.5. Estudo da estabilidade	26
4.6. Ensaio de recuperação.....	27
4.7. Estudo da diluição das amostras.....	28
4.8. Análise do alergénio Api g 1 em Aipo fresco e congelado	29
4.9. Análise de amostras alimentares	30
4.10. Comparação do imunossensor desenvolvido com outros métodos.....	32
5. CONCLUSÃO	35
5.1. Conclusões finais	35
5.2. Limitações e investigação futura.....	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

página propositadamente em branco

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Processo de diagnóstico de alergias (Adaptado de (Aalberse et al., 2022)).....	4
Figura 3 - Representação esquemática de diferentes tipos de imunoenaios (Adaptado de (Freitas et al., 2018)).....	7
Figura 4 - Gráficos representativos da CV (voltamograma, lado esquerdo) e da cronoamperometria (cronoamperograma, lado direito) (Adaptado de (Conradie & von Eschwege, 2020); (Amor-Gutiérrez et al., 2019)).....	8
Figura 5 - Esquema representativo do imunossensor construído para a análise de Api g 1.....	16
Figura 6 - Otimização da concentração de CAb (0,10; 0,25; 0,50; 1,0 e 2,0 µg/mL). Outros parâmetros experimentais: concentração de DAb de 0,50 µg/mL em T1 e diluição de HRP de 500× em T1-BSA 1%.	17
Figura 7 - Otimização da concentração de DAb (0,25; 0,50; 1,0 e 2,0 µg/mL). Outros parâmetros experimentais: concentração de CAb de 0,50 µg/mL em T1 e diluição de HRP de 500× em T1-BSA 0,5%.	18
Figura 8 - Comparação dos resultados obtidos entre os imunoenaios sem e com a adição de agente bloqueador (T1-BSA 0,5%). Outros parâmetros experimentais: concentração de CAb de 0,50 µg/mL em T1 e diluição de HRP de 500× em T1-BSA 0,5%.	19
Figura 9 - Otimização da diluição da solução de HRP-Strep (250, 500 e 1000× em T1-BSA 0,5%). Outros parâmetros experimentais: concentração de CAb de 0,50 µg/mL em T1, concentração DAb de 1,0 µg/mL em T1-BSA 0,5%.	20
Figura 10 - Otimização do tempo de incubação do alergénio Api g 1 (30 e 60 min). Outros parâmetros experimentais: concentração de CAb de 0,50 µg/mL em T1, concentração DAb de 1,0 µg/mL em T1-BSA 0,5%, e diluição de HRP de 500× em T1-BSA 0,5%.	21
Figura 11 - Otimização do formato de ensaio (i: passo-a-passo; ii: analito-alvo (Api g 1) + DAb 1,0 µg/mL, em T1-BSA 0,5%; iii: DAb 1,0 µg/mL + HRP-Strep diluição de 500×, em T1-BSA 0,5%). Outras parâmetros experimentais: concentração de CAb de 0,50 µg/mL em T1.	22
Figura 12 - Avaliação de interações não-específicas e funcionamento do imunossensor (sem a adição de: (I) BSA e analito-alvo (branco 1), (II) analito-alvo (branco 2), (III) CAb 0,50 µg/mL em T1, (IV) DAb 1,0 µg/mL em T1-BSA 0,5%, (V) HRP-Strep diluição de 500× em T1-BSA 0,5%, (VI) TMB. VII: adição de todos os componentes.).	23
Figura 13 - Resultados da análise de padrões de Api g 1 entre 50 e 8000 ng/mL.....	24
Figura 14 - Estudos da seletividade do imunossensor e a interferência de outros alergénios alimentares. Análises efetuadas: (a) ausência de alergénio; presença de apenas um alergénio: (b) peixe (Parvalbumina, β-PV), (c) ovo (ovotransferrina, Gal d 3), (d) crustáceos (Tropomiosina, TPM), (e) amendoim (Ara h 1), (f) aipo (Api g 1); presença de Api g 1, (f) juntamente com outro alergénio: (g) peixe (Parvalbumina, β-PV), (h) e ovo (ovotransferrina, Gal d 3), (i) crustáceos (Tropomiosina, TPM), (j) aipo (Api g 1) e amendoim (Ara h1)).....	25
Figura 15 – Resultados do estudo da estabilidade do imunossensor efetuados durante 42 dias.....	26
Figura 16 – Estudo da diluição das amostras (C: controlo negativo (branco, ausência de Api g 1), Diluições: 2×, 10×, 25×, 50×, 100× e 200×; 0: Amostra não diluída).	28
Figura 17 – Análise de amostras de Api g 1 em Aipo congelado e fresco (sem diluição e com diluição dos extratos de 1:2).....	29

página propositadamente em branco

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Alergénios alimentares do aipo (Adaptado de (EFSA, 2014)).....	2
Tabela 2 - Reatividade cruzada do aipo com outros alergénios (Adaptado de (EFSA, 2014)).....	3
Tabela 3 - Sumário de métodos para a análise de aipo em produtos alimentares.....	11
Tabela 4 - Figuras de Mérito do método para a análise de Api g 1	24
Tabela 5 – Resultados do estudo de recuperação de uma amostra, que não contém aipo, fortificada com concentrações crescentes de Api g 1.	27
Tabela 6 – Resultados da análise de Api g 1 em 14 amostras alimentares e 6 amostras de aipo (congelado e fresco), utilizando o imunossensor desenvolvido.	31
Tabela 7 – Sumário descritivo dos métodos da análise de Api g 1.....	32

LISTAS DE SIGLAS E SÍMBOLOS

Lista de Siglas

Api g	Aipo (<i>Apium graveolens</i>)
Ara h	Amendoim (<i>Arachis hypogaea</i>)
Art v	Artemísia (<i>Artemisia vulgaris</i>)
BAT	Teste de Ativação dos Basófilos (do inglês <i>Basophil Activation Test</i>)
Bet v	Bétula (<i>Betula verrucosa</i>)
BHQ2	Black Hole Quencher®-2
Biot	Biotina
BSA	Albumina de Soro Bovino (do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>)
CAb	Anticorpo de Captura (do inglês <i>Capture Antibody</i>)
CV	Voltametria Cíclica (do inglês <i>Cyclic Voltammetry</i>)
Cyn d	Relva Bermuda (<i>Cynodon dactylon</i>)
Cy5	Cianina-5 (do inglês <i>Cyanine-5</i>)
DAB	Anticorpo de Detecção (do inglês <i>Detection Antibody</i>)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DPV	Voltametria de Impulso Diferencial (do inglês <i>Differential Pulse Voltammetry</i>)
ELISA	Imunoensaios Enzimáticos (do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
FAD	Dinucleótido de flavina e adenina (do inglês <i>Flavin adenine dinucleotide</i>)
FAM	Amidita de Fluoresceína (do inglês <i>Fluorescein Amidite</i>)
Gly m	Soja (<i>Glycine max</i>)
Hel a	Girassol (<i>Helianthus annuus</i>)
HRP	Peroxidase de Rábano (do inglês <i>Horseradish peroxidase</i>)
IgE	Imunoglobulina E
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
LOD	Límite de Detecção (do inglês <i>Limit of Detection</i>)
LOQ	Límite de Quantificação (do inglês <i>Limit of Quantification</i>)
LSV	Voltametria de Varrimento Linear (do inglês <i>Linear Sweep Voltammetry</i>)
LTP	Proteína de Transferência Lipídica (do inglês <i>Lipid Transfer Protein</i>)
MS	Espectrometria em Massa (do inglês <i>Mass Spectrometry</i>)
NADPH	Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina (do inglês <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
ns-LTP	Proteína de transferência lipídica não-específica (do inglês <i>Non-specific lipid-transfer protein</i>)
Ole e	Azeitona (<i>Olea europaea</i>)
PBS	Tampão Fosfato-Salino (do inglês <i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
Phl p	Erva Timóteo (<i>Phleum pratense</i>)
PR	Relação com a Patogenética (do inglês <i>Pathogenesis-related</i>)

Pru av	Cereja (<i>Prunus avium</i>)
Pru p	Pêssego (<i>Prunus persica</i>)
Pyr c	Pêra (<i>Pyrus communis</i>)
RNA	Ácido Ribonucleico (do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>)
SP	Estreptavidina-Ficoeritrina (do inglês <i>Streptavidin-Phycoerythrin</i>)
SPCE	Elétrodo Serigrafado de Carbono (do inglês <i>Screen Printed Carbon Electrode</i>)
SPT	Teste da Sensibilidade Cutânea (do inglês <i>Skin Prick Test</i>)
SR	Svedberg RNA
Strep	Estreptavidina (do inglês <i>Streptavidin</i>)
SWV	Voltametria de Onda Quadrada (do inglês <i>Square-wave Voltammetry</i>)
T1	Tampão Fosfato-Salino PBS [0.1 M] de pH 7,4
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

Lista de Símbolos

%	porcentagem	%
C	concentração molar	M
f	frequência	Hz
I	intensidade de corrente	A
m	massa	kg
t	hora	h
t	minutos	min
T	temperatura	$^{\circ}C$
U	potencial elétrico	V
v	velocidade	rpm
v	velocidade	rf
V	volume	L

página propositadamente em branco

1. INTRODUÇÃO

O Aipo (*Apium graveolens*) é uma planta aromática, da família *Apiaceae*, sendo constituído pela raiz ou tubérculo, caule e folhas. A planta pode ser consumida de forma crua (p.ex. em saladas), cozida (p.ex. em sopas) ou pode ser encontrada como ingrediente em alimentos processados (p.ex. molhos, especiarias, *nuggets*, almondegas, etc.) (EFSA, 2014).

As alergias alimentares, nomeadamente ao aipo, resultam de reações imunológicas a proteínas específicas presentes em alimentos e/ou aos seus derivados. Estas reações originam posteriormente a libertação de um anticorpo designado imunoglobulina E (IgE) que é responsável pela indução das reações alérgicas através da libertação da histamina, um neurotransmissor. A alergia alimentar ao aipo, bem como a outras alergias alimentares, pode decorrer por contacto direto ou indireto de diferentes formas, sendo as mais comuns o contacto cutâneo, a ingestão e/ou inalação de produtos que contêm (vestígios) o alergénio alimentar. Entre os vários sintomas causados destaca-se como reações moderadas a urticária (no caso de contacto cutâneo), a falta de ar ou inchaço da garganta e ainda, em casos severos, o choque anafilático (nos casos de ingestão e inalação) (Thomas, 2019). A deteção da alergia alimentar é tipicamente efetuada recorrendo a testes de diagnóstico específicos, sendo o mais comum o teste da sensibilidade cutânea (SPT) por conter um número elevado de valores preditivos positivos e um número consideravelmente baixo de valores preditivos negativos, sendo assim um teste de diagnóstico fidedigno (EFSA, 2014). Este tipo de testes foi reportado pela primeira vez em 1984 através do reconhecimento dos anticorpos específicos IgE para o aipo em indivíduos hipersensíveis (Thierry, 1985).

1.1. Enquadramento e pertinência

1.1.1. Prevalência

De acordo com a literatura sobre a prevalência da alergia alimentar ao aipo, na Europa os valores variam entre 2,8% e 11,1%. Estes valores foram reportados com base nos resultados obtidos por dois testes distintos: as taxas de SPTs positivos para o aipo foram de 9,1% em adultos na Alemanha (Stephan Scheurer et al., 2001), 11,1% em adultos e 3,7% em idosos na Hungria (Bakos et al., 2006). Por outro lado, as taxas de sensibilização medidas pelos níveis do anticorpo IgE específico para aipo na Hungria foram de 2,8% para adultos e 9,2% para os idosos (Bakos et al., 2006), revelando valores divergentes entre os dois testes realizados. Em França, a prevalência desta alergia alimentar foi de 5,5% entre jovens de 5 a 17 anos (Touraine et al., 2002). Na Alemanha, de acordo com o número de SPTs positivos e histórico clínico de alergia ao aipo, a prevalência foi de 2,7% em todas as faixas etárias (Zuberbier et al., 2004).

Para além dos países europeus, encontram-se descritos estudos em países como a Tailândia, baseados no histórico clínico e em análises dos níveis de IgE de crianças desde os 6 até aos 8 anos, sendo a prevalência de alergia ao aipo de 1,8% (Wan & Chiu, 2012).

1.1.2. Sintomas e reações associadas

As reações alérgicas ao aipo podem variar desde muito leves a reações severas, podendo a duração variar de alguns minutos até algumas horas após a ingestão do aipo ou de algum alimento que contenha aipo na sua constituição. Em média, a reação é despoletada 2 horas após o consumo. A anafilaxia constitui a reação de maior severidade a que acresce a necessidade de rápidos cuidados médicos (Aalberse et al., 2022); (Scientific, 2021).

Os sintomas envolvem vários sistemas de órgãos que incluem o sistema cardiovascular, digestivo, respiratório, entre outros tais como por exemplo: diarreias, vômitos, congestão nasal, eczemas, urticárias, anafilaxia, colapso circulatório, entre outros (Scientific, 2021).

1.1.3. Alergénios identificados no Aipo

Atualmente encontram-se descritos 7 proteínas de alergenicidade ao aipo, sendo considerado o mais importante o Api g 1, uma proteína similar ao alergénio Bet v 1, proveniente da *Betula verrucosa* (Polen de abedul) que origina reações alérgicas orais (Wangorsch et al., 2022). O Api g 2 e o Api g 6 são classificados como proteínas de transferência lipídica (LTP) (Wangorsch et al., 2022); (Dölle et al., 2018). O Api g 3 é designado como proteína de ligação ao *Chlorophyll a-b* presente nos cloroplastos (EFSA, 2014). O Api g 4 é uma proteína designada por profilina envolvida no processo da junção dos filamentos de actina. O Api g 5 é uma oxidase que contém FAD, sendo uma glicoproteína com alto peso molecular (Dölle et al., 2018); (Gadermaier, Hauser, et al., 2011). Wangorsch *et al.* reportaram recentemente uma nova proteína (defensina) designada por Api g 7 e demonstraram que possui capacidade de ligação aos anticorpos IgE tendo ainda alergenicidade específica (Wangorsch et al., 2022).

Na **tabela 1** encontram-se descritos os vários tipos de alergénios do aipo, reportados na literatura.

Tabela 1 - Alergénios alimentares do aipo (Adaptado de (EFSA, 2014)).

Fonte	Alergénio	Nome Bioquímico	Família	Referência
Raiz	Api g 1	PR-10	Bet v 1	(EFSA, 2014)
Caule	Api g 2	ns-LTP 1	Prolamina	(EFSA, 2014); (Gadermaier, Egger, et al., 2011)
Caule	Api g 3	Clorofila a-b (Proteína de ligação)	–	(EFSA, 2014)
Raiz	Api g 4	Profilina	Profilina	
Raiz	Api g 5	FAD (contém oxidase)	Glicoproteína	(EFSA, 2014); (Dölle et al., 2018)
Raiz	Api g 6	ns-LTP 2	Prolamina	(EFSA, 2014)
Raiz	Api g 7	Defensina	Defensina	(Wangorsch et al., 2022)

*Api g – Aipo (*Apium graveolens*); Bet v – Bétula (*Betula verrucosa*); FAD – Dinucleótido de flavina e adenina; ns-LTP – Proteína de transferência lipídica não-específica; PR – “Pathogenesis-related-10”.

1.1.4. Reatividade cruzada

Numa população de pessoas que estão diagnosticadas com alergia alimentar ao aipo, parte dessa população pode desencadear reações alérgicas a outros alimentos para além do aipo, sendo designado como reatividade cruzada. Isto ocorre quando o sistema imunitário identifica proteínas idênticas e/ou similares em alimentos diferentes ou componentes que são estruturalmente similares. Entre os alimentos que são frequentemente referenciados destacam-se os frutos como os pêsegos e as cerejas, e os frutos secos como os amendoins e as avelãs. Na alergia ao aipo, para além da cenoura, estando descritos casos de alergia oral causadas pelo pólen e/ou pelo consumo de vegetais e diversas especiarias como coentros, cominhos, cravo-da-índia, funcho, pimenta, salsa, tomilho, etc. (Aalberse et al., 2022); (Scientific, 2021).

Na Tabela 2 encontra-se representada a categorização de alergénios do aipo e alimentos/pólen que podem provocar reatividade cruzada e os alergénios associados, e a deteção efetuada nos estudos descritos.

Tabela 2 - Reatividade cruzada do aipo com outros alergénios (Adaptado de (EFSA, 2014)).

Alergénio do Aipo	Reatividade Cruzada	Alergénio	Tipo de Deteção	Referência
Api g 1	Bétula	Bet v 1 (Proteína)	Interação imunológica e bioquímica	(Hoffmann-Sommergruber et al., 2000); (Lüttkopf et al., 2000); (Schirmer et al., 2005); (Wangorsch et al., 2007)
			IgE	
	Salsa	PcPR1-1 (Gene)	DNA/RNA	(Somssich et al., 1988)
		PcPR1-3 (Gene)		
Api g 2	Pêssego	Pru p 3 (Proteína)	IgE	(Gadermaier, Hauser, et al., 2011)
	Artemísia	Art v 3 (Proteína)		
Api g 4	Bétula	Bet v 2 (Proteína)	Interação imunológica e bioquímica	(Valenta et al., 1992); (Bauer et al., 1996); (Juan A. Asturias et al., 1997); (J. A. Asturias et al., 1998); (S. Scheurer et al., 2000)
	Azeitona	Ole e 2 (Proteína)	IgE	(S. Scheurer et al., 2000); (Stephan Scheurer et al., 2001)
	Erva Timóteo	Phl p 11 (Proteína)		
	Relva Bermuda	Cyn d 12 (Proteína)		
	Girassol	Hel a 2 (Proteína)		
	Soja	Gly m 3 (Proteína)		
	Amendoim	Ara h 5 (Proteína)		
	Pêra	Pyr c 4 (Proteína)		
	Cereja	Pru av 4 (Proteína)		
Api g 7	Artemísia	Art v 1 (Proteína)	IgE	(Wangorsch et al., 2022)

* IgE – Imunoglobulina E

1.1.5. Diagnóstico

O diagnóstico da alergia ao aipo, bem como a outras alergias, pode ser realizado através de diferentes tipos de testes que podem ser classificados em categorias distintas: os testes de resposta imediata (mediados pelos anticorpos IgE (p.ex. SPTs, 15 min), testes sanguíneos/serológicos (~1 semana), teste de ativação de basófilos (BATs, 2 dias) e os mais demorados que não são mediados pelos anticorpos IgE (p.ex. testes de desafio oral, 2-4 semanas) (LaHood & Patil, 2019); (Siles & Hsieh, 2011); (Santos et al., 2021).

Os testes mais demorados consistem num processo de administração do alergénio em pequenas doses de alimentos que possuem um determinado alergénio entre 2 - 4 semanas, sendo reintroduzido o alergénio na alimentação para averiguar o aparecimento de sintomas alérgicos no paciente com hipersensibilidade. Os testes imediatos permitem identificar a presença de anticorpos IgE específicos para um determinado alergénio, sendo que se subdivide em três tipos de testes: testes sanguíneos para os anticorpos IgE específicos, SPTs e BATs (Aalberse et al., 2022); (LaHood & Patil, 2019).

Os testes sanguíneos/serológicos são efetuados para determinar a concentração de IgE de um alergénio específico no sangue, e os SPTs são efetuados ao nível da pele através do contacto de um alimento que contém o alergénio. Os BATs são testes de diagnóstico realizados *in vitro* que monitorizam a função dos anticorpos IgE de induzir a ativação celular através da estimulação do alergénio em estudo (Aalberse et al., 2022); (LaHood & Patil, 2019).

Na **Figura 1** encontra-se detalhado o processo do diagnóstico das alergias. Sucintamente, analisa-se inicialmente o histórico clínico do paciente, seguindo-se a realização de um teste de sensibilidade e de acordo com o resultado obtido, caso seja positivo/confirmado deve-se averiguar a necessidade de aplicar terapêuticas de resposta à alergia. Caso se obtenha um resultado incerto é realizado um segundo teste de diagnóstico com relevância clínica, e perante resultado positivo, é indicada uma terapêutica direcionada ao paciente. Na obtenção de resultado negativo, conclui-se que o paciente não possui a alergia em questão (Aalberse et al., 2022).

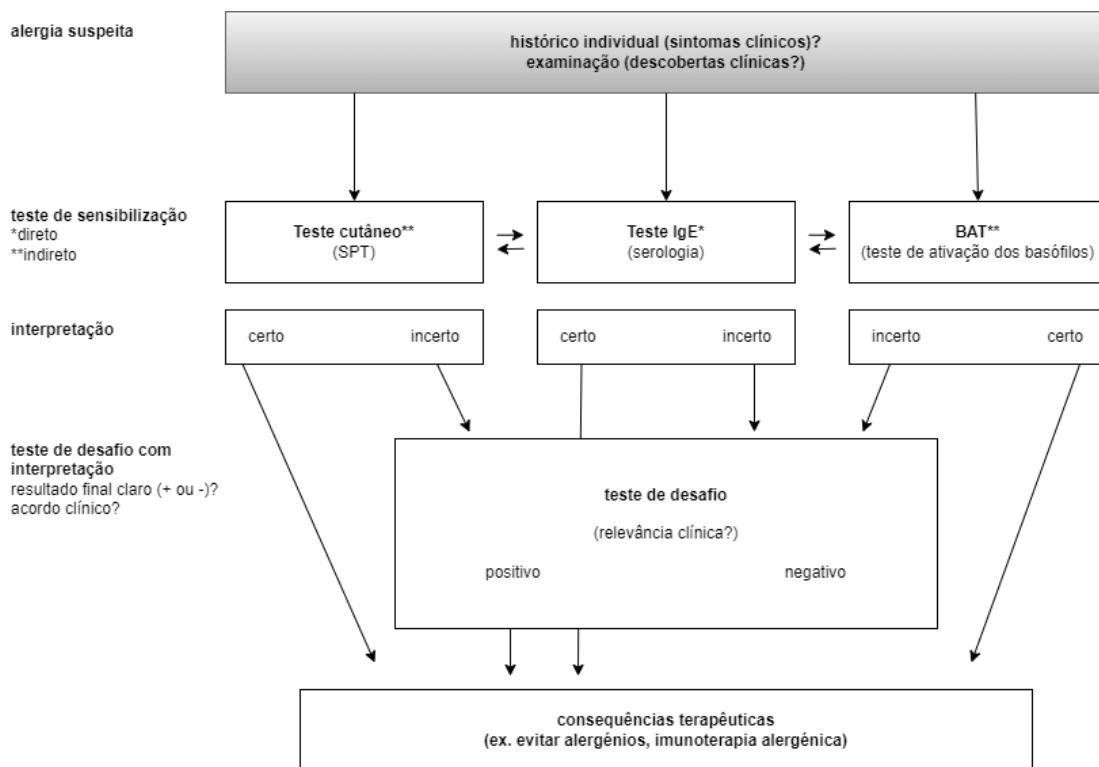


Figura 1 - Processo de diagnóstico de alergias (Adaptado de (Aalberse et al., 2022)).

1.1.6. Legislação relativa a alergénios alimentares

De acordo com o Regulamento da União Europeia nº 1169/2011, o aipo insere-se numa lista de 14 substâncias ou produtos que provocam alergias ou intolerâncias, acordada pela Autoridade Europeia para a Segurança dos alimentos. Pela severidade de danos que estas substâncias ou produtos podem causar, estes:

- devem ser indicados nos rótulos dos alimentos de forma clara e distinguível dos restantes ingredientes (como por exemplo o destaque a negrito, ou letras maiúsculas);
- no caso de não estar listado no rótulo, mas o ingrediente causador de alergias e/ou intolerâncias ter estado presente no armazenamento ou processo de fabrico, este deve estar descrito sob a forma de “pode conter” ou “contém” seguido do ingrediente em específico (Regulation (EC) No 1169/2011, 2011); (Comissão Europeia, 2017).

1.1.7. Efeitos da alergenicidade no processamento do aipo

De acordo com um estudo efetuado por Gadermaier *et al.*, vários pacientes demonstraram diferentes reações a diversos alergénios do aipo após este alimento ter sido cozinhado. A presença do alergénio Api g 4 (cujo estudo refere que é mais estável com o aumento da temperatura) foi detetada no soro da maioria da população do estudo. Para além deste alergénio, foram detetados carboidratos que demonstram reatividade cruzada. Observou-se ainda que, para uma minoria da população em estudo foi detetado apenas o alergénio Api g 1, sendo referido que este alergénio é menos estável com o aumento da temperatura. Este facto demonstra que os pacientes que reajam apenas ao Api g 1 reagem de forma mais significativa a aipo cozinhado comparativamente com outros pacientes. Para além deste, o alergénio Api g 2 é descrito como termicamente estável e resistente à digestão gastrointestinal (Gadermaier, Hauser, et al., 2011); (EFSA, 2014).

Outro estudo revelou, de modo similar, que o Api g 4 é mais estável comparativamente com o Api g 1, sendo que a sua reatividade com IgE, bem como a reatividade cruzada a determinantes carboidratos, não é afetada pelo aumento da temperatura (Ballmer-Weber et al., 2002). No mesmo estudo, observou-se que numa amostra de vários pacientes com histórico clínico da alergia ao aipo não se observaram reações à raiz do aipo cozida sem que não houvesse reações à raiz do aipo crua, o que prova que no processo de confeção do aipo a quantidade residual dos alergénios inicialmente presentes na amostra é responsável pelo processo de desencadeamento de reações alérgicas, não sendo desencadeada alergia a outros alergénios. Para além disso, foi testado o aipo sob a forma de tempero e foi observado que os sintomas foram menores quando comparados com o aipo cru. Assim sendo, provou-se neste estudo que algumas reações alérgicas são reportadas em pacientes específicos, referentes ao processo de confeção a altas temperaturas e que pacientes que são alérgicos ao aipo cru também são alérgicos ao aipo sob a forma de tempero (Ballmer-Weber et al., 2002).

De acordo com o estudo reportado por Dubiela *et al.*, efetuou-se a análise da reação de dois pacientes com alergia ao aipo a extratos de sementes e o caule do aipo por via de testes de IgE específicos em soro, verificando-se padrões proteicos distintos em ambos, o que resulta em diferenças quer no seu conteúdo, quer na quantidade de proteínas alergénicas (Dubiela et al., 2022).

No trabalho realizado por (Lüttkopf et al., 2000), foi analisada a resposta alérgica a extratos do caule do aipo em pacientes com resultado positivo ao teste alimentar duplo-cego controlado por placebos. De acordo com os resultados desta análise, os pacientes apresentaram resultado positivo referente a IgE destes alergénios específicos.

1.1.8. Métodos analíticos para a análise de aipo em produtos alimentares

Os métodos analíticos para a análise de aipo em produtos alimentares são de extrema importância, sendo os mais comumente utilizados os imunoenaios ELISA, os métodos de biologia molecular (PCR), e a espectrometria de massa (MS).

Os ELISA são ensaios utilizados para a quantificação de proteínas alérgicas. Este tipo de ensaio é baseado em interações anticorpo-antigénio, sendo que o anticorpo pode ser marcado por exemplo com uma enzima ou um marcador fluorescente, permitindo a determinação da concentração do antigénio específico em análise (Horlock & Imperial College London, 2023); (EFSA, 2014).

Os ensaios PCR permitem a amplificação de uma determinada sequência de DNA obtida de diferentes fontes, tais como tecidos, organismos e/ou fluidos biológicos, tais como saliva, sangue, etc. e ainda microrganismos. A técnica necessita de uma cadeia molde de DNA, nucleótidos e *primers* para formar as cadeias análogas através dos nucleótidos livres (Garibyan & Avashia, 2013); (EFSA, 2014).

A técnica de MS é uma técnica analítica que deteta e identifica moléculas-alvo através da sua razão massa/carga. Nesta técnica a amostra é convertida em iões através de um agente ionizante. De seguida, através de um analisador de massa/carga, as partículas são divididas e detetadas (Brown, 2023).

Para além destas metodologias, recentemente têm sido descritas na literatura abordagens inovadoras para a análise e determinação de alérgenos alimentares, nomeadamente os biossensores.

1.1.9. Biossensores

De acordo com a IUPAC, um biossensor é definido como um dispositivo analítico, no qual decorrem reações bioquímicas específicas mediadas por enzimas, anticorpos, tecidos, organelos ou até mesmo células para detetar compostos químicos através de sinais elétricos, térmicos e/ou óticos (Jurado-Sánchez, 2018).

1.1.9.1. Classificação

Um biossensor é constituído por dois componentes: o biorrecetor e o transdutor. O biorrecetor consiste num elemento biológico que pode ser, entre outros, um anticorpo, uma enzima ou ácidos nucleicos, enquanto o transdutor é um elemento que converte a resposta bioquímica resultante da interação dos elementos biológicos com o analito-alvo numa resposta elétrica que é processada por um equipamento utilizando um software específico (Jurado-Sánchez, 2018); (Robertson, 2019).

O sinal gerado pelo biossensor, que se relaciona proporcionalmente, em certas condições experimentais, com a concentração do analito, pode ser elétrico, ótico ou térmico. No caso de biossensores eletroquímicos, este sinal é, p.ex., uma corrente, uma diferença de potencial ou uma resistência (Jurado-Sánchez, 2018); (Robertson, 2019).

Existem diferentes tipos de imunoenaios, entre os quais competitivos, não-competitivos (*sandwich*) e *label-free*. Na figura 2 encontra-se esquematizada um imunossensor eletroquímico do tipo *sandwich*.

Num ensaio competitivo, o antigénio da amostra em estudo compete com um antigénio marcado com uma enzima. Após a incubação, o sensor é lavado para remover os componentes que não reagiram, sendo posteriormente adicionada uma solução com o substrato enzimático, sendo efetuada a medição do produto de reação. O sinal medido é inversamente proporcional à concentração do analito da amostra (J. Wang, 2006); (Wu et al., 2007).

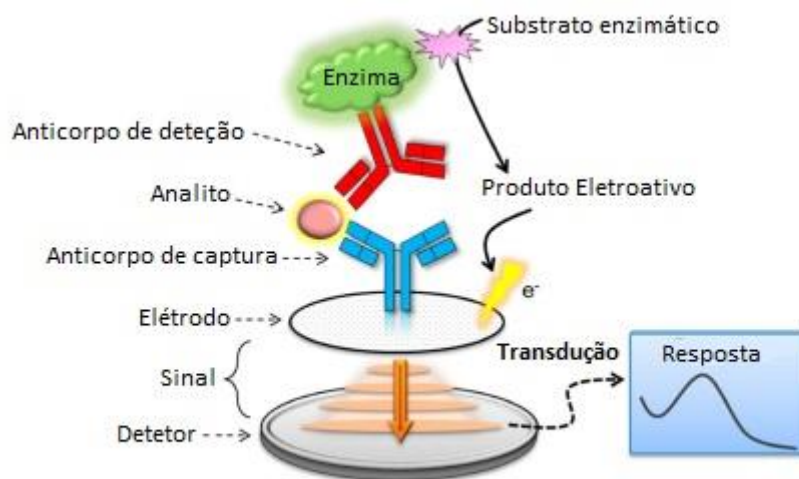


Figura – Exemplo de um esquema de um imunossensor eletroquímico (Adaptado de (Cho et al., 2018)).

Em ensaios não-competitivos, ou do tipo *sandwich*, são tipicamente utilizados dois anticorpos. Um primeiro anticorpo é imobilizado na superfície do eletrodo (anticorpo de captura, CAb), o qual efetua a captura do antígeno, e de seguida ocorre ligação com um segundo anticorpo, tipicamente marcado com uma enzima (anticorpo de detecção, DAB). Tal como os ensaios competitivos, efetua-se uma etapa de lavagem, para retirar os componentes que não interagiram, sendo de seguida adicionada o substrato enzimático que permitirá a geração de substâncias que possam ser analisadas. (J. Wang, 2006); (Wu et al., 2007). A figura 3 apresenta uma representação esquemática dos diferentes tipos de imunoensaios.

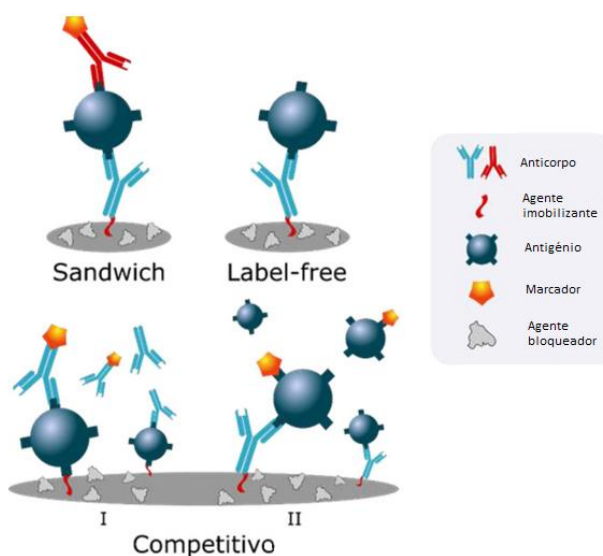


Figura 2 - Representação esquemática de diferentes tipos de imunoensaios (Adaptado de (Freitas et al., 2018)).

1.1.9.2. Técnicas eletroquímicas

Nos biossensores podem ser utilizadas técnicas eletroquímicas distintas, as quais permitem o estudo do analito-alvo determinada por reações redox. Para obter o sinal eletroquímico utilizam-se geralmente 3 eletrodos (no caso de transdutores miniaturizados, estes podem estar previamente associados à célula eletroquímica): eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e eletrodo auxiliar, sendo conectados a dispositivos elétricos, fazendo assim uma interface com o sistema de aquisição de dados que permite obter o sinal analítico relativo à reação bioquímica do analito-alvo (Cheriyedath, 2019). Entre as técnicas eletroquímicas mais utilizadas destacam-se a voltametria (técnica em que se aplica uma diferença de potencial variável num eletrodo de trabalho e mede-se a corrente gerada) e a amperometria (técnica que envolve a aplicação de uma diferença de potencial fixa e mede-se a corrente estacionária gerada) (Roy & Pandit, 2018); (Adeloju, 2005).

As técnicas voltamétricas mais utilizadas são: a Voltametria Cíclica (CV), a Voltametria de Varrimento Linear (LSV), a Voltametria de Onda Quadrada (SWV) e a Voltametria de Impulso Diferencial (DPV). Já na amperometria, a cronoamperometria tem ganho especial enfoque (Cheriyedath, 2019).

Neste trabalho utilizou-se como técnica voltamétrica a voltametria cíclica e como técnica amperométrica a cronoamperometria.

A CV é a técnica eletroquímica vastamente utilizada por permitir uma caracterização mais abrangente do processo eletroquímico que ocorre na superfície do eletrodo de trabalho. Nesta técnica ocorre a variação linear do potencial aplicado ao eletrodo de trabalho, sendo o varrimento efetuado de forma triangular, a uma determinada velocidade de varrimento, enquanto é medida a corrente, fornecendo informações acerca das reações *redox*. Já a cronoamperometria consiste na aplicação de um potencial fixo, sendo medida a intensidade de corrente ao longo do tempo (Forster & Walsh, 2005); (Cheriyedath, 2019).

Na figura 4 são apresentados gráficos representativos dos sinais obtidos na CV e na cronoamperometria.

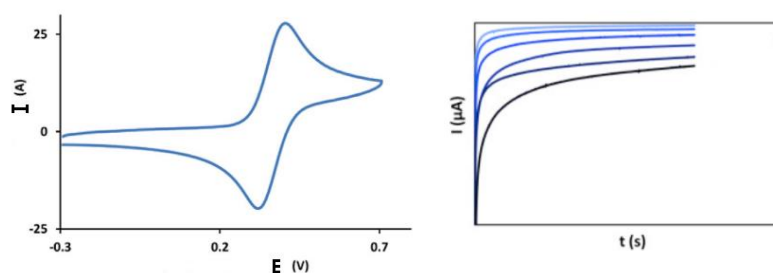


Figura 3 - Gráficos representativos da CV (voltamograma, lado esquerdo) e da cronoamperometria (cronoamperograma, lado direito) (Adaptado de (Conradie & von Eschwege, 2020); (Amor-Gutiérrez et al., 2019)).

1.2. Questão e objetivos de investigação

De acordo a legislação da EU em vigor (1169/2011), os produtos alimentares embalados disponíveis comercialmente, e que contenham alergénios referidos na mesma, devem ser devidamente rotulados. Deste modo, é necessário avaliar se o fabricante cumpre os requisitos exigidos por Lei. Assim, deve ser assegurado o controlo de qualidade do alimento de modo a não causar efeitos adversos a indivíduos hipersensíveis a determinados alergénios alimentares (Regulation (EC) No 1169/2011, 2011).

O objetivo deste trabalho de investigação consistiu em desenvolver um biossensor que permita a quantificação de um alérgeno do aipo (Api g 1) em amostras alimentares. O desenvolvimento deste dispositivo tem como objetivo auxiliar a indústria alimentar e o consumidor final, no controlo dos produtos comerciais, de acordo com o rótulo que apresentam. Com isto, rótulos assertivos poderão ser elaborados para produtos específicos para que pessoas com sensibilidade ao aipo tenham maior confiança na compra de alimentos embalados, garantido que não decorrerão efeitos adversos.

1.3. Opções metodológicas

Pretende-se que a avaliação de produtos alimentares seja efetuada recorrendo ao biossensor eletroquímico desenvolvido no presente trabalho. Deste modo, o objetivo principal consiste na construção um imunossensor eletroquímico, sendo efetuadas as medidas por cronoamperometria, utilizando eletrodos de carbono serigrafados (transdutor) e anticorpo específico para a deteção de Api g 1 (biorreceptor).

Face aos métodos atualmente existentes para a análise de alérgenos alimentares, como ELISA e PCR, os biossensores colmatam as suas desvantagens uma vez que têm características diferenciadoras, como por exemplo o baixo custo, sustentabilidade, miniaturização, portabilidade, permitindo a análise de amostras alimentares num curto espaço de tempo e com uma quantidade/volume de amostra reduzido.

1.4. Estrutura do trabalho

O trabalho apresenta-se estruturado de acordo de seguinte forma:

A introdução (Capítulo 1) contempla informação essencial para a compreensão do tema de trabalho nomeadamente, a problemática associada ao tema das alergias alimentares. O aipo foi escolhido com alérgeno a ser estudado e como tal são descritas as suas principais características, prevalência, alergenidade, e contextualização com a legislação europeia em vigor (Regulation (EU) No 1169/2011).

O estado de arte (Capítulo 2) apresenta a descrição dos trabalhos reportados na literatura para a análise de aipo em produtos alimentares, utilizando metodologias analíticas distintas, nomeadamente as convencionais, tais com ELISA, PCR, e metodologias inovadoras como (bio)sensores e *lab-on-a-chip*.

No capítulo de métodos e aplicação (Capítulo 3) são referidos os reagentes, materiais e equipamentos, bem como os procedimentos experimentais utilizados para a construção e o desenvolvimento do imunossensor eletroquímico, complementando com informação específica, nomeadamente reações específicas (redox) e interações moleculares.

No capítulo “Resultados e Discussão” (Capítulo 3) encontram-se descritos e discutidos os resultados obtidos para as otimizações das diferentes variáveis experimentais, interações não-específicas, o desempenho analítico do imunossensor, estudo da seletividade e interferentes, estabilidade, ensaios de recuperação, e por fim foi avaliada a aplicabilidade em amostras alimentares comerciais.

No último capítulo (Capítulo 5) são contempladas as conclusões finais, evidenciando os principais resultados obtidos que demonstram a aplicabilidade final e pertinência do desenvolvimento do imunossensor para a análise de amostras alimentares, analisando tendo em conta o critério da legislação europeia nomeadamente a referência de conter, poder conter ou não conter o alérgeno em estudo. Por fim são descritas as limitações do trabalho, sendo ainda propostas possíveis trabalhos futuros para a melhoria do desempenho do imunossensor para a sua aplicabilidade e investigação futura.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Métodos para a análise de Aipo

Na tabela 3 encontram-se informações resumidas sobre os métodos utilizados/desenvolvidos para a análise do aipo em alimentos, incluindo o tipo de ensaio e detecção, as amostras analisadas, e os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ).

Tabela 3 - Sumário de métodos para a análise de aipo em produtos alimentares.

Método	Amostra	Bioensaio	LOD	LOQ	Referência
ELISA	Aipo cru e cozido	Anticorpo anti-Api g 1 marcado com HRP Detecção por ensaio tipo <i>sandwich</i>	1,9 µg/g (proteína do aipo solúvel)	5,6 µg/g (proteína do aipo)	(H. Wang et al., 2011)
ELISA	Aipo	SP utilizado como marcador Detecção por uma matriz <i>multiplex</i>	----	----	(Filep et al., 2022)
PCR	Aipo cru e amostras comerciais que continham aipo	Gene do aipo com o primer 18SR Detecção por PCR <i>duplex</i>	10 mg/kg	----	(Pafundo et al., 2011)
PCR	Três variedades de aipo: raiz, caule e folha E produtos alimentares comerciais (p. ex.: salsichas)	Amplificação da sequência do gene do aipo Detecção por PCR em tempo-real	10 pg de DNA (extratos diluídos), 0,005% de aipo (salsichas)	----	(Fuchs et al., 2012)
PCR	Alergénio do aipo presente em amostras comerciais	Utilizado marcadores fluorescentes Detecção por PCR <i>multiplex</i> em tempo-real	0,1%	----	(Köppel et al., 2012)
PCR	Três tipos de aipo (raiz, caule e folha) em géneros alimentares (p. ex.: salsichas cruas e processadas)	Utilizado Cy5 e BHQ2 como marcadores Detecção por PCR <i>triplex</i> em tempo-real	50 ppm	----	(Palle-Reisch et al., 2015)
PCR	Misturas lizadas de linguiça cozida Produtos alimentares com a menção “pode conter vestígios”	FAM utilizado como marcador Detecção por PCR <i>tetraplex</i> em tempo-real	3,7 mg/kg	----	(Luber et al., 2015)

PCR	Alimentos processados comerciais	Sequências-alvo do gene de manitol desidrogenase Detecção por PCR digital	$0,20 \pm 0,12$ Cp/ μ L	$0,83 \pm 0,20$ Cp/ μ L	(Cau et al., 2021)
<i>Lab-on-a-chip</i>	Alimentos processados	Utilização de farinha de trigo como agente diluente para o <i>primer</i> específico do aipo Detecção por <i>Lab-on-chip</i>	100 ppm	-----	(Coïsson et al., 2010)
Biossensor baseado em fibra ótica	Aipo cru (folhas e caule)	Utilização de um gene-alvo designado por manitol desidrogenase Detecção por ensaio de fusão em PCR através da fibra ótica	-----	-----	(Daems et al., 2017)

2.1.1. ELISA

Neste subtópico são descritos métodos desenvolvidos para a análise de aipo em produtos alimentares com ELISA.

Foi desenvolvido um imunoensaio do tipo *sandwich*, usando anticorpos monoclonais (produzidos com a proteína Api g 1.01 pura), com o objetivo de detetar e quantificar proteínas do aipo em amostras processadas. O método desenvolvido possui especificidade e sensibilidade elevadas, apresentando reatividade cruzada reduzida para a cenoura. O LOD foi de 1,9 μ g de proteína do aipo solúvel/g de amostra e o LOQ foi de 5,6 μ g de proteína do aipo inteira/g de amostra, demonstrando assim resultados confiáveis na detecção de aipo cru e cozido (H. Wang et al., 2011).

No trabalho descrito por Filep *et al.*, foi desenvolvido um ensaio *multiplex* com detecção por fluorescência para identificar vários alérgenos incluídos na lista reportada na legislação, incluindo o aipo, simultaneamente. Neste ensaio foram usadas microesferas acopladas a anticorpos monoclonais específicos para a detecção destes mesmos alérgenos. Os autores reportam que o LOD variou de acordo com o alérgeno em estudo, sendo considerado como a menor concentração da curva de calibração com sinal distinguível do branco. Contudo, os valores obtidos não são indicados (Filep et al., 2022).

2.1.2. PCR

Neste subtópico são descritos trabalhos desenvolvidos para a análise e a detecção de aipo em produtos alimentares utilizando a PCR.

Num estudo realizado por Pafundo *et al.*, utilizaram-se dois métodos, sendo um deles, ensaios duplos de PCR, para detetar e quantificar vários alérgenos, incluindo o aipo, em vários tipos de amostras comerciais em. Obteve-se um LOD de 10 mg/kg tanto em amostras de aipo cru como em amostras comerciais que continham aipo, revelando resultados satisfatórios e reprodutíveis (Pafundo et al., 2011).

No trabalho desenvolvido por Fuchs *et al.* foi apresentado um método de PCR em tempo-real que permitiu a detecção de vestígios de aipo em matrizes alimentares complexas, nomeadamente de três partes diferentes de aipo: raiz, caule e folhas. Este método não revelou reatividade cruzada com qualquer vegetal em estudo e nem mesmo da família *Apiaceae* e apresentou um LOD de 10 pg de DNA de aipo em extratos diluídos e um LOD de 0,005% de aipo em amostras de salsichas. Este método foi testado em 26 produtos alimentares comerciais e o DNA de aipo foi detetado em 1 de 10 amostras que não continham nenhuma informação da presença deste mesmo alérgeno (Fuchs et al., 2012).

Num outro estudo (Köppel et al., 2012) foi descrito um método de PCR *multiplex* em tempo real (dois sistemas PCR *hexaplex* em tempo real), desenvolvido para detetar 12 alérgenos, incluindo o aipo.

Este método permitiu a detecção de 0,1% de aipo em todos os alimentos testados, contudo a quantidade da proteína e o peso do alergénio do aipo não foram reportados (Köppel et al., 2012).

Palle-Reisch *et al.* reportou o aplicação de PCR *triplex* em tempo-real com o objetivo de analisar três tipos de mostardas e três partes diferentes de aipo (raiz, caule e folhas) em gêneros alimentícios. Este método demonstrou baixa reatividade cruzada com outros vegetais tais como o feno-grego, os cominhos, o gengibre, o açafrão e o centeio. Para além disto, foi obtido um LOD de 50 ppm em amostras de salsichas cruas e processadas. Este método permitiu a detecção de vestígios de DNA de componentes alergénicos como o aipo, apesar da existência de outros tipos de templates de DNA (Palle-Reisch et al., 2015).

Num estudo descrito por Luber et al., foi utilizada a PCR *tetraplex* em tempo-real para quantificar vestígios de 4 alergénios, incluindo o aipo. Para tal, foi extraído DNA de misturas de linguiça cozida triturada e de padrões com concentrações de 1, 5, 10, 20, 40, 100 e 400 mg/kg. Neste trabalho foi obtido um LOQ de 3,7 mg/kg para o aipo e foram analisados produtos alimentares comerciais rotulados com um ou mais alergénios ou com a menção “pode conter traços de...” (Luber et al., 2015).

Relativamente ao estudo de Cau *et al.*, utilizou-se a PCR digital (dd-PCR) para quantificar o aipo em alimentos comerciais processados, tais como sopas, alimentos *fast-food*, etc. Este método não demonstrou reatividade cruzada com qualquer outra espécie de vegetal sendo obtidos um LOD de $0,20 \pm 0,12$ Cp/ μ L e um LOQ de $0,83 \pm 0,20$ Cp/ μ L. Este método apresentou boa especificidade e foi possível determinar a presença do alergénio em alimentos processados de origem animal e vegetal. Contudo uma limitação consistiu no facto de os resultados terem sido expressos em números de cópia por microlitro, não tendo sido expressos na quantidade de conteúdo de alergénio no alimento (ex: mg/kg ou % w/w) (Cau et al., 2021).

2.1.3. (Bio)sensores e dispositivos *Lab-on-a-chip*

No presente subtópico são descritos métodos desenvolvidos para a análise de aipo em produtos alimentares baseados em biossensores e/ou *lab-on-chip*.

No trabalho de Coisson *et al.* foi utilizada um protocolo do método PCR, sendo substituído o gel de agarose utilizado na eletroforese convencional com uma plataforma *Lab-on-chip* (eletroforese capilar tendo como base um microchip), com o objetivo de aumentar a sensibilidade da análise para detetar simultaneamente sésamo e aipo em alimentos processados. Este dispositivo permitiu analisar eficientemente *primers* específicos de aipo e sésamo. Para a análise em amostras alimentares, almôndegas caseiras e sopas comerciais (5% almôndegas cozidas, e 0,1% sopas) foram fortificadas com percentagens diferentes de aipo e sésamo, sendo obtido o LOD de 100 ppm para o aipo. Este método demonstrou uma detecção sensível, precisa, e económica (Coisson et al., 2010).

Daems *et al.* desenvolveram um sensor de fibra ótica para uma detecção rápida e simples de aipo. Este método foi utilizado para a detecção de diferentes concentrações de DNA de aipo extraído das folhas e do caule. Para efetuar a análise foi desenvolvido um bioensaio inovador, rápido e sensível e para tal foi utilizada uma plataforma compacta de ressonância plasmónica de superfície, de fibra óptica (FO-SPR). As concentrações usadas para quantificar o aipo foram de 1 pM e 0,1 fM (Daems et al., 2017).

2.2 Métodos de extração de alergénios de aipo de amostras alimentares

Filep *et al.*, utilizou um método de extração de alergénios de aipo de alimentos que consistia na adição de 1ml de tampão PBS, 2% de *tween-20* (PBS-T) pH 7,4 contendo 1 M de cloreto de sódio, a amostras alimentares sólidas (100 mg). As amostras foram previamente trituradas, agitadas no vórtex durante 5 s, sonicadas por 30 s a uma frequência de 35 kHz, e posteriormente aquecidas num banho de água, a 60

°C, durante 15 min. De seguida foram centrifugadas durante 20 min, a 1250 rcf, a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido em microtubos e armazenado a -20 °C até a realização da análise (Filep et al., 2022).

No trabalho descrito por Wang *et al.*, o método de extração consistiu nas seguintes etapas: as amostras foram congeladas com nitrogénio líquido e trituradas até obter um pó. As proteínas foram extraídas de 300g do pó congelado, sendo adicionado 300-400 mL de tampão de extração (PBS, 10 mM, pH 7,0, contendo 2% (w/v) de suspensão sólida de polivinilpirrolidona, 2 mM de EDTA, 10 mM dietilditiocarbamato de sódio, e 3 mM azida de sódio), permanecendo em agitação durante a noite, a 4 °C. Procedeu-se a uma centrifugação (14000 g, 30 min, 4 °C), seguindo-se filtração através de papel de filtro. A concentração da proteína foi determinada utilizando o kit de ensaio BCA. As aliquotas foram armazenadas a -20 °C (H. Wang et al., 2011).

Já Coïsson *et al.*, no seu artigo descreveu que o seu método extração de DNA genómico consistiu em congelar as amostras (com nitrogénio líquido), sendo de seguida trituradas manualmente com almofariz. O aipo foi liofilizado diretamente de modo a obter um pó fino, permitindo melhorar o processo de homogeneização e extração. sendo posteriormente peneirado e armazenado a -20 °C, antes de serem usados. Utilizou-se um kit de extração de DNA, o qual é efetuado de acordo com instruções do fornecedor. (Coïsson et al., 2010).

3. MÉTODOS E APLICAÇÃO

Este capítulo descreve os materiais e equipamentos, reagentes e soluções utilizados ao longo do trabalho. Para além disto, referem-se ainda as otimizações das condições experimentais e os procedimentos realizados. É explicado sucintamente o procedimento experimental, bem como o procedimento da extração do alergénio de amostras alimentares, sendo de seguida descritos os ensaios de otimização.

3.1. Material, Equipamentos, Reagentes e Soluções

Para o desenvolvimento do trabalho utilizaram-se, como transdutores, eléctrodos serigrafados de carbono (DRP-110, eléctrodo de trabalho: carbono (diâmetro = 4 mm), eléctrodo de pseudo-referência: prata, eléctrodo auxiliar: carbono, conexões elétricas: prata, substrato: cerâmica) adquiridos à Metrohm DropSens. Um conector específico (DRP-CRAC, Metrohm DropSens) foi utilizado para ligar os SPCE ao potenciostato/galvanostato (PGSTAT 101, Metrohm Autolab, software NOVA, versão 1.10).

Foram utilizados outros materiais importantes para a realização do procedimento experimental, nomeadamente microtubos (0,5; 1,5 e 5,0 ml) designados também por Eppendorfs; micropipetas de 10, 100, 200 e 1000 μL ; vórtex de bancada (Lab Dancer S000, IKA); agitador basculante (Movil Tub, P-Selecta); balança analítica (Mettler Toledo); pH-metro (Crison 2002); placa de agitação (VMS-C7, VWR); e sistema de purificação de água (Synergy UV, Merck-Millipore, resistividade de 18,2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$).

Os reagentes utilizados foram os seguintes: hidrogenofosfato de potássio trihidratado, dihidrogenofosfato de potássio e 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) com peróxido de hidrogénio (H_2O_2) da Sigma-Aldrich, cloreto de sódio da Honeywell-Fluka, albumina de soro bovino (BSA) e peroxidase-estreptavidina (HRP-Strep) da Merck. Foram adquiridas à MyBioSource as seguintes biomoléculas: anticorpo de captura (CAb), anticorpo de detecção conjugado com biotina (DAb) e o analito-alvo, o antigénio *Apium graveolens* (Api g 1).

As soluções utilizadas ao longo do trabalho foram as seguintes: **T1** (tampão fosfato-salino PBS [0,1 M], pH 7,4), **T1-BSA 0,5%** (PBS [0,1 M], pH 7,4 + BSA 0,5% m/V), **T1-BSA 1%** (PBS [0,1 M], pH 7,4 + BSA 1% m/V).

A preparação do CAb foi efetuada em **T1** e a preparação das soluções do alergénio (Api g 1), do DAb, e HRP-Strep foi efetuada utilizando **T1-BSA 0,5%**. O TMB- H_2O_2 foi utilizado tal como adquirido. Para a extração do alergénio das amostras alimentares foi utilizado **T1**.

3.2. Ensaios de Otimização

Os parâmetros/variáveis experimentais essenciais para a realização do trabalho foram otimizadas, nomeadamente: concentração de anticorpo de captura (CAb), anticorpo de detecção (DAb), agente bloqueador (BSA), diluição da enzima (HRP conjugada com estreptavidina), tempos de incubação das biomoléculas e formato do ensaio.

3.2.1. Procedimento experimental

A biomodificação do transdutor consistiu na adição de 10 μL de uma solução do CAb (concentração de 0,50 $\mu\text{g/mL}$) na superfície do eléctrodo de trabalho do SPCE, sendo incubado em ambiente húmido, a 4-8 $^\circ\text{C}$, durante a noite.

A realização do imunoensaio é efetuada de acordo com as seguintes etapas (ensaio otimizado):

Etapa de bloqueio, que consiste na incubação (20 min) da solução T1-BSA 0,5%. De seguida o é lavado com T1, seguindo-se a adição de 40 μL de solução que contém antígeno Api g 1 (em concentrações variáveis, ou amostra alimentar) juntamente com DAb (1,0 $\mu\text{g/mL}$, em T1-BSA 0,5%) sendo incubada durante 60 min, procedendo-se em seguida a nova etapa de lavagem. Posteriormente, adiciona-se 40 μL da enzima conjugada HRP-Strep (diluição de 500 $\times$, em T1-BSA 0,5%) durante 30 min. Após a lavagem com T1, a última etapa consistiu na adição de 40 μL do substrato enzimático TMB- H_2O_2 , sendo incubado durante 1 min, procedendo-se de seguida à obtenção do sinal analítico por cronoamperometria (potencial fixo: -0,2 V, 1 min).

Após a adição da solução de TMB- H_2O_2 , o HRP catalisa a redução do H_2O_2 e a oxidação do TMB, que de seguida pode ser analisada por cronoamperometria (redução).

Na **figura 5** é apresentado a representação esquemática dos passos da construção do imunossensor.

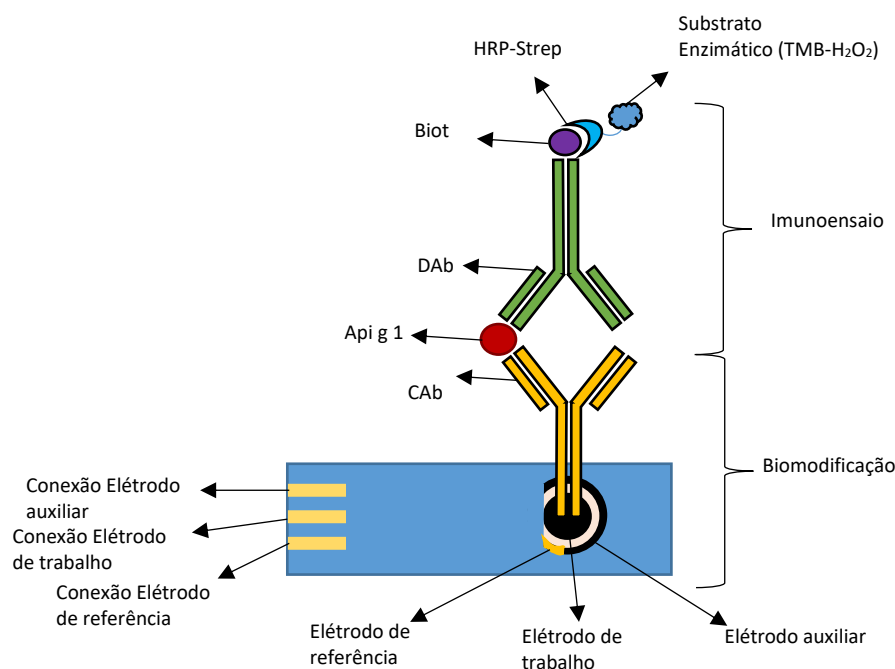


Figura 4 - Esquema representativo do imunossensor construído para a análise de Api g 1.

3.2.2. Procedimento para extração do alérgeno de amostras alimentares

A extração do Api g 1 de amostras alimentares consistiu nas seguintes etapas: trituração da amostra sólida (amostras líquidas não carecem desta etapa inicial), pesagem de 1 g de amostra e adição de 10 mL de tampão de extração PBS. Após este passo as amostras foram agitadas no vórtex durante 10 s, sendo posteriormente incubadas a 60 °C, durante 30 min. Segue-se a centrifugação durante 5 min, a 10000 rpm. Posteriormente, são retirados os sobrenadantes para microtubos, os quais são submetidos a nova centrifugação durante 5 min, a 10000 rpm. Os sobrenadantes finais foram colocados em microtubos, os quais foram armazenados a -20 °C até efetuar a análise.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Otimização dos parâmetros/variáveis experimentais

A otimização e avaliação dos diferentes parâmetros/variáveis experimentais para o desenvolvimento do imunossensor foram efetuadas na ausência (0 ng/mL, branco, B) e na presença (1000 ng/mL, sinal, S) de Api g 1. De modo a selecionar o parâmetro ótimo de cada otimização foi utilizado o valor correspondente à razão entre o sinal e o branco (S/B).

4.1.1. Otimização da concentração de anticorpo de captura (CAb)

Foi efetuada a otimização da concentração do CAb, tendo sido testadas concentrações crescentes de CAb: 0,10; 0,25; 0,50; 1,0 e 2,0 $\mu\text{g/mL}$. Utilizaram-se os seguintes parâmetros fixos: concentração de DAb 0,5 $\mu\text{g/mL}$ e diluição de HRP 500x, em T1-BSA 0,5%. O tempo total do imunoensaio foi de 1h30min (tempos de incubação: Api g 1, 30 min; DAb, 30 min; HRP-Strep, 30 min).

Como se pode observar na **Figura 6**, a razão S/B mais elevada foi obtida com a concentração de 0,50 $\mu\text{g/mL}$. Deste modo, esta concentração foi utilizada para as otimizações seguintes.

Os resultados obtidos demonstram que para baixas (0,10 e 0,25 $\mu\text{g/mL}$) e altas concentrações (1,0 e 2,0 $\mu\text{g/mL}$) de CAb, a intensidade de corrente é menor. Para a concentração de CAb mais elevada, o sinal do branco é maior, podendo este facto ser justificado por ligações não-específicas, existindo maior reatividade entre as biomoléculas, justificável pela presença de elevada quantidade de anticorpo, o que resulta numa maior intensidade de corrente, tanto na ausência como na presença do alergénio Api g 1. Utilizando uma solução de HRP em T1-BSA 0,5%, e sendo BSA um agente bloqueante, verifica-se que nas concentrações de CAb menores, o bloqueio dos sítios de ligação do CAb induzirá a uma menor interação e, por conseguinte, um menor sinal. Porém, para elevadas concentrações de CAb é expectável que a presença de BSA exerça como função o bloqueio de locais não específicos das biomoléculas, no SPCE.

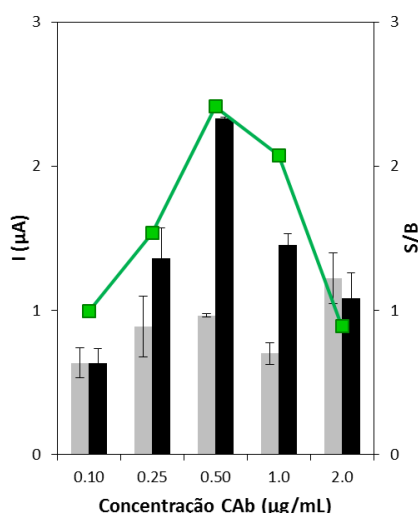


Figura 5 - Otimização da concentração de CAb (0,10; 0,25; 0,50; 1,0 e 2,0 $\mu\text{g/mL}$). Outros parâmetros experimentais: concentração de DAb de 0,50 $\mu\text{g/mL}$ em T1 e diluição de HRP de 500 $\times$ em T1-BSA 1%.

4.1.2. Otimização da concentração de anticorpo de detecção (DAb)

Para a otimização de DAb, testaram-se as seguintes concentrações: 0,25; 0,50; 1,0 e 2,0 $\mu\text{g/mL}$. Utilizaram-se os seguintes parâmetros fixos: concentração de CAb de 0,50 $\mu\text{g/mL}$ em T1 e diluição de HRP de 500x em T1-BSA 0,5%. O tempo total do imunoenensaio foi de 1h30min (tempos de incubação: Api g 1, 30 min; DAb, 30 min; HRP-Strep, 30 min).

Os resultados obtidos estão presentes na **Figura 7**, sendo possível verificar que a concentração ótima de DAb é de 1,0 $\mu\text{g/mL}$, verificando-se para esta concentração a razão S/B mais elevada. Assim, esta concentração foi utilizada para otimizações posteriores.

Os resultados revelaram que para concentrações mais baixas de DAb (0,25 e 0,50 $\mu\text{g/mL}$) o sinal obtido na presença de alergénio foi baixo, indicando que estas concentrações não são suficientes para a detecção efetiva do alergénio. Para concentrações mais elevadas de DAb (1,0 e 2,0 $\mu\text{g/mL}$) verifica-se intensidades de sinal superiores, o que evidencia o reconhecimento efetivo de Api g 1, sendo selecionada a concentração de DAb e 1,0 $\mu\text{g/mL}$ para prosseguir os estudos.

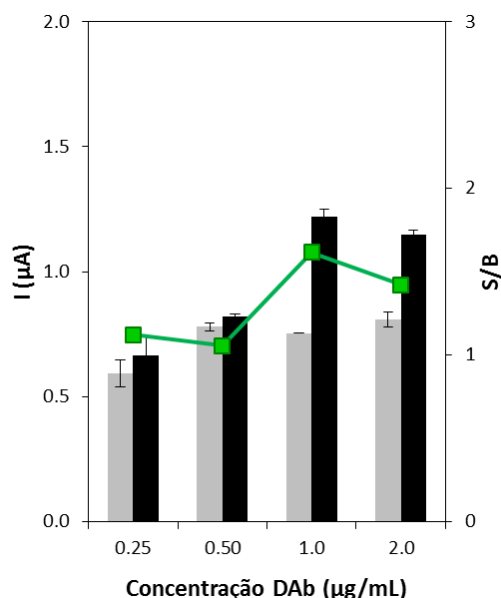


Figura 6 - Otimização da concentração de DAb (0,25; 0,50; 1,0 e 2,0 $\mu\text{g/mL}$). Outros parâmetros experimentais: concentração de CAb de 0,50 $\mu\text{g/mL}$ em T1 e diluição de HRP de 500 $\times$ em T1-BSA 0,5%.

4.1.3. Etapa de bloqueio

No desenvolvimento de imunossensores, a inclusão de um passo prévio ao imunoensaio, nomeadamente a adição de um agente bloqueador (p.ex. BSA ou caseína) pode melhorar o sinal eletroquímico, dependendo do analito-alvo e dos anticorpos específicos. Esta melhoria pode decorrer do bloqueio de locais/ligações não específicos referentes à incubação do CAb decorrentes da incubação num período prolongado (durante a noite). Assim, após otimização da concentração dos anticorpos, foi adicionada a etapa de bloqueio, que consistiu na incubação de T1-BSA 0,5%, durante 15 min. Na **Figura 8** encontram-se os resultados obtidos para o imunoensaio com a adição da etapa de bloqueio (tempo total de ensaio de 1h45min), sendo este resultado comparado com o ensaio sem adição desta etapa (tempo total de ensaio 1h30min).

Os resultados obtidos evidenciam a importância da adição da etapa de bloqueio, reduzindo consideravelmente o sinal dos brancos, ou seja, de reações não-específicas, obtendo-se uma razão S/B bastante superior comparativamente à ausência desta etapa.

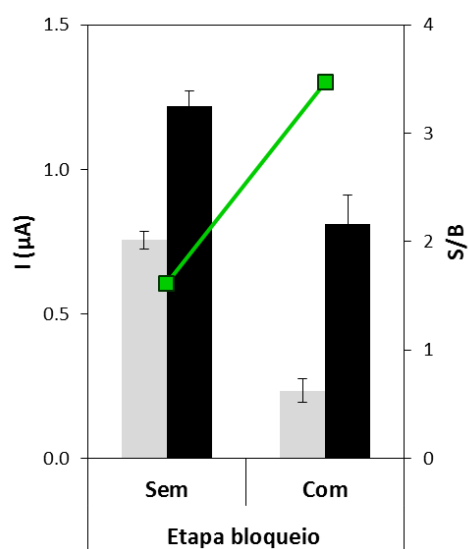


Figura 7 - Comparação dos resultados obtidos entre os imunoensaios sem e com a adição de agente bloqueador (T1-BSA 0,5%). Outros parâmetros experimentais: concentração de CAb de 0,50 $\mu g/mL$ em T1 e diluição de HRP de 500 $\times$ em T1-BSA 0,5%.

4.1.4. Otimização da diluição da enzima peroxidase conjugada com estreptavidina (HRP-Strep)

Nesta etapa procedeu-se a otimização da diluição da enzima peroxidase conjugada com estreptavidina (HRP-Strep), tendo sido testadas as seguintes diluições: 250, 500 e 1000 $\times$, preparadas em T1-BSA 0,5%. Os parâmetros experimentais utilizados foram: concentração de CAb de 0,50 $\mu\text{g/mL}$ em T1 e DAb de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ em T1-BSA 0,5%. Os resultados obtidos encontram-se representados na **Figura 9**. O tempo total do imunoensaio foi de 1h45min (tempos de incubação: BSA, 15 min; Api g 1, 30 min; DAb, 30 min; HRP-Strep, 30 min).

A diluição selecionada foi de 500 $\times$, a qual se encontrava na gama de diluições recomendada pelo fabricante, verificando-se que apresenta a razão S/B mais elevada. Os resultados demonstram que para as restantes diluições (dobro e metade: 1000 $\times$, 250 $\times$) não se observam diferenças significativas entre os sinais do branco e do analito.

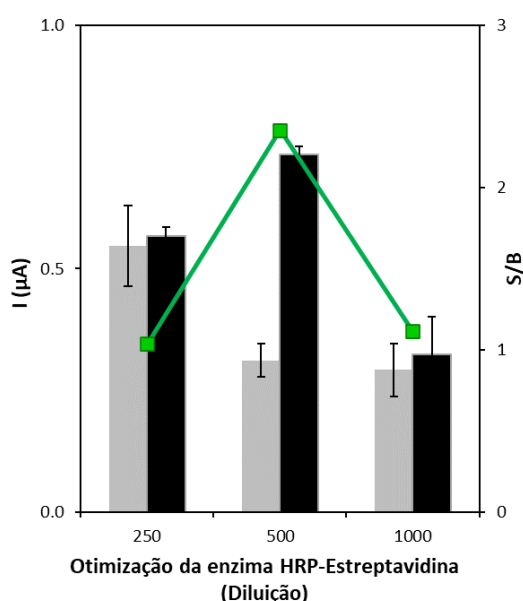


Figura 8 - Otimização da diluição da solução de HRP-Strep (250, 500 e 1000 $\times$ em T1-BSA 0,5%). Outros parâmetros experimentais: concentração de CAb de 0,50 $\mu\text{g/mL}$ em T1, concentração DAb de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ em T1-BSA 0,5%.

4.1.5. Otimização do tempo de incubação do alergénio

Procedeu-se à otimização do tempo de incubação do Api g 1, o qual é de considerável importância uma vez que cada antígeno tem o seu tempo ótimo para deteção e reconhecimento pelos anticorpos. Deste modo, incubou-se o alergénio durante 60 min (tempo total de ensaio de 2h15min) e comparou-se o resultado obtido com o anteriormente testado: 30 min (tempo total do ensaio de 1h45min).

De acordo com os resultados obtidos (**Figura 10**) verifica-se que o tempo de incubação mais prolongado (60 min) permite obter um aumento considerável do sinal analítico. De igual modo, verifica-se um aumento da razão S/B, observando-se ainda que a intensidade de corrente dos brancos é semelhante, independentemente do tempo de incubação.

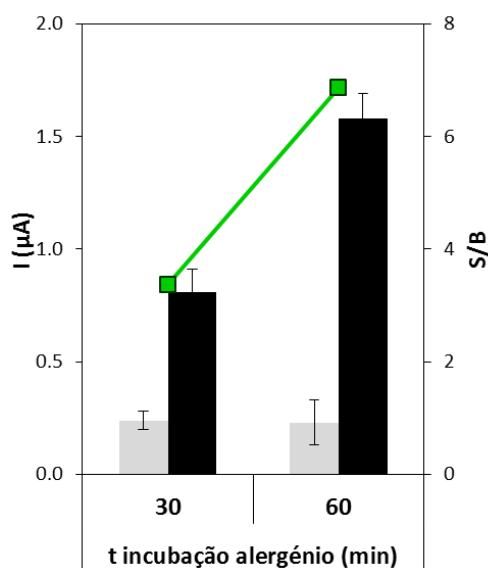


Figura 9 - Otimização do tempo de incubação do alergénio Api g 1 (30 e 60 min). Outros parâmetros experimentais: concentração de CAb de 0,50 µg/mL em T1, concentração DAb de 1,0 µg/mL em T1-BSA 0,5%, e diluição de HRP de 500× em T1-BSA 0,5%.

4.1.6. Otimização do formato do ensaio

O tempo total de ensaio é crucial para a utilização de imunossensores sendo um dos requisitos fundamentais obter o resultado em pouco tempo (minutos ou horas). Deste modo, comparou-se o resultado previamente obtido com um formato diferente que consistia na junção de duas das etapas da construção do imunoensaio:

- (i) passo-a-passo (tempo total 2h15 min);
- (ii) analito-alvo (Api g 1) com DAb, em B1-BSA 0,5% (tempo total 1h45min);
- (iii) DAb com o conjugado enzimático (HRP-Strep), em B1-BSA 0,5% (tempo total 1h45 min).

De acordo com os resultados obtidos (**Figura 11**), a melhor razão S/B foi obtida no ensaio (ii), observando-se maior intensidade de corrente na presença de Api g 1, e sinal do branco f baixo, o que resultou na diminuição de reações não-específicas. O sucesso deste formato pode ser explicado pela correta conjugação do analito-alvo com o DAb que resulta em menos reações não-específicas tal como descrito anteriormente.

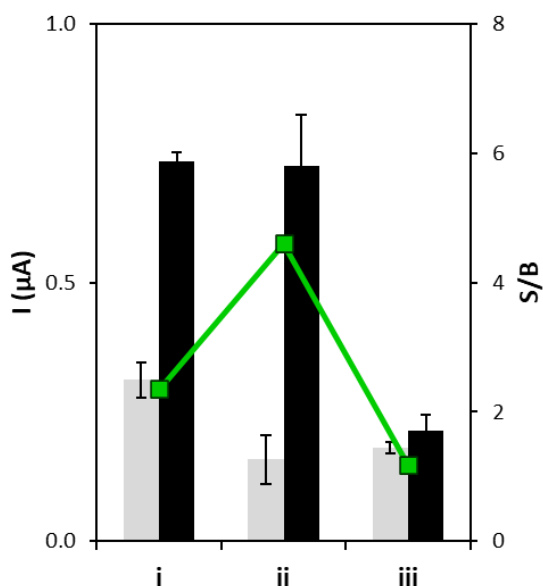


Figura 10 - Otimização do formato de ensaio (i: passo-a-passo; ii: analito-alvo (Api g 1) + DAb 1,0 $\mu\text{g/mL}$, em T1-BSA 0,5%; iii: DAb 1,0 $\mu\text{g/mL}$ + HRP-Strep diluição de 500 $\times$, em T1-BSA 0,5%). Outras parâmetros experimentais: concentração de CAb de 0,50 $\mu\text{g/mL}$ em T1.

4.2. Avaliação de interações não específicas e funcionamento do imunossensor

Após otimização dos diversos parâmetros experimentais, foi avaliado o correto funcionamento do imunossensor, uma vez que a construção do imunossensor do tipo *sandwich* consiste na incubação de diferentes biomoléculas: agente bloqueador (BSA), CAb, analito-alvo (alergénio), DAb, HRP-Strep e TMB. Deste modo, é possível avaliar o contributo de cada biomolécula e os seus efeitos, nomeadamente interações não específicas. Este teste é efetuado na ausência de cada biomolécula, i.e., sem a adição de: (I) BSA e analito-alvo (branco 1), (II) analito-alvo (branco 2), (III) CAb, (IV) DAb, (V) HRP-Strep, (VI) TMB (**Figura 12**).

Os resultados obtidos na ausência de pelo menos um dos reagentes (I a VI) foram comparados com o ensaio correspondente ao uso de todos os reagentes (VII). Assim, de acordo com os resultados apresentados, verifica-se que para I e III são obtidos valores superiores ao do branco (na figura 12, a linha verde tracejada delimita os valores superiores e inferiores), indicando a deteção do analito-alvo, o que revela que ambos os ensaios experimentais podem ser utilizados para detetar o alergénio aipo sob a forma de um teste rápido. Porém, a ausência de agente bloqueador em I e a ausência de CAb em III resultou numa menor precisão de resultados, com intensidades de sinal visivelmente inferiores, decorrendo reações não específicas pelo menor bloqueio decorrente da ausência de BSA. Deste modo, a presença de todos os componentes essenciais para o correto funcionamento do imunoensaio permite a deteção eficaz do alergénio, como se pode verificar em VII.

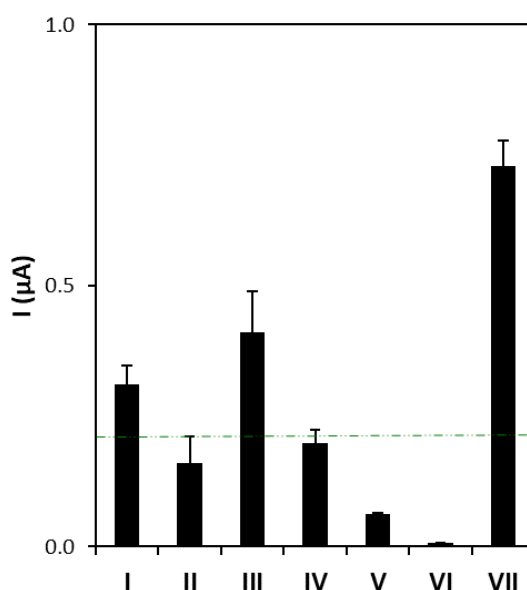


Figura 11 - Avaliação de interações não-específicas e funcionamento do imunossensor (sem a adição de: (I) BSA e analito-alvo (branco 1), (II) analito-alvo (branco 2), (III) CAb 0,50 µg/mL em T1, (IV) DAb 1,0 µg/mL em T1-BSA 0,5%, (V) HRP-Strep diluição de 500× em T1-BSA 0,5%, (VI) TMB. VII: adição de todos os componentes.).

4.3. Desempenho analítico do imunossensor

Foram analisadas concentrações crescentes de alergénio entre 50 e 8000 ng/mL. A reta de calibração foi obtida para as concentrações entre 50 e 4000 ng/mL, obtendo-se a seguinte equação: $I(\mu A) = (2,1 \times 10^{-4} \pm 4,8 \times 10^{-6}) [A_{pi\ g\ 1}] + (0,32 \pm 6,8 \times 10^{-3})$, $r = 0,998$, $n=8$). Na **Figura 13** encontram-se representadas as intensidades de corrente obtidas para as diferentes concentrações, bem como exemplos representativos dos respetivos cronoamperogramas.

O LOD e o LOQ foram calculados com base nas equações $3 \cdot S_x/m$ e $10 \cdot S_x/m$, respetivamente, onde S_x é o desvio padrão do branco e m corresponde ao declive da reta de calibração, tendo-se obtido 45 ng/mL e 151 mg/L, respetivamente. O coeficiente de variação do método, calculado como $V_{x0} (\%) = S_{x0}/\bar{x}$ (onde S_{x0} corresponde ao desvio padrão do método e $\bar{x}$ à média das concentrações dos padrões), foi de 4,7%, revelando assim boa precisão do método. Estes valores e outras figuras de mérito do método estão presentes na **Tabela 4**.

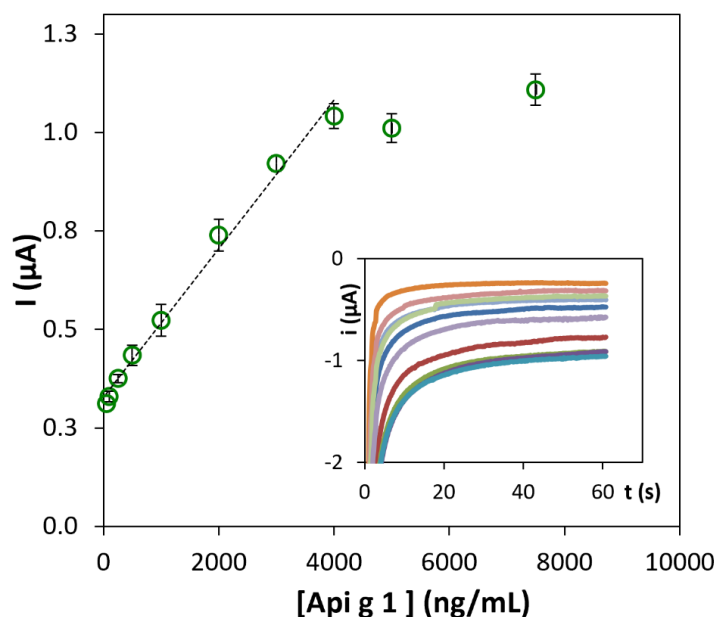


Figura 12 - Resultados da análise de padrões de Api g 1 entre 50 e 8000 ng/mL.

Tabela 4 - Figuras de Mérito do método para a análise de Api g 1

Figuras de Mérito	
Intervalo de linearidade (ng/mL)	50 - 4000
Coeficiente de correlação (r)	0,998
Declive (m) ($\mu A / (ng/mL)$)	$2,1 \times 10^{-4}$
Desvio padrão do declive (S_m) (ng/mL)	$4,8 \times 10^{-6}$
Interceção (b) (μA)	0,32
Desvio padrão da interceção (S_b) (μA)	$6,8 \times 10^{-3}$
Desvio padrão do método (S_{x0})	64
Coeficiente de variação do método (V_{x0}) (%)	4,7
Limite de deteção (LOD) (ng/mL)	45
Limite de quantificação (LOQ) (ng/mL)	151

4.4. Estudo da seletividade e interferentes

Foram testados diferentes alérgenos alimentares, cuja presença possa ser concomitante com o aipo em produtos comerciais. Inicialmente analisaram-se um branco (a) e uma solução de Api g 1 (f), que foram utilizados como controlos negativo e positivo, respetivamente. De seguida analisaram-se soluções de outros alérgenos alimentares com concentrações de 3000 ng/mL: peixe (Parvalbumina, β -PV) (b), ovo (ovotransferrina, Gal d 3) (c), crustáceos (Tropomiosina, TPM) (d), e amendoim (Ara h1) (e). Os resultados obtidos encontram-se a cinzento na **Figura 14**. Adicionalmente, testou-se a possível interferência destes alérgenos na análise de Api g 1 através da análise de soluções de Api g 1 com cada um deles em igual concentração (3000 ng/mL), encontrando-se os resultados representados a verde na **Figura 14**: (g), (h), (i) e (j).

De acordo com os resultados obtidos, relativamente à seletividade, os sinais obtidos para os outros alérgenos alimentares são muito próximos do sinal do branco (**Figura 14**, barras a cinzento), o que indica a seletividade do sensor. Em relação à possível interferência (**Figura 14**, barras a verde), como os sinais obtidos são muito semelhantes na presença dos outros alérgenos em comparação com a análise de Api g 1, pode-se afirmar que estes não interferem na análise.

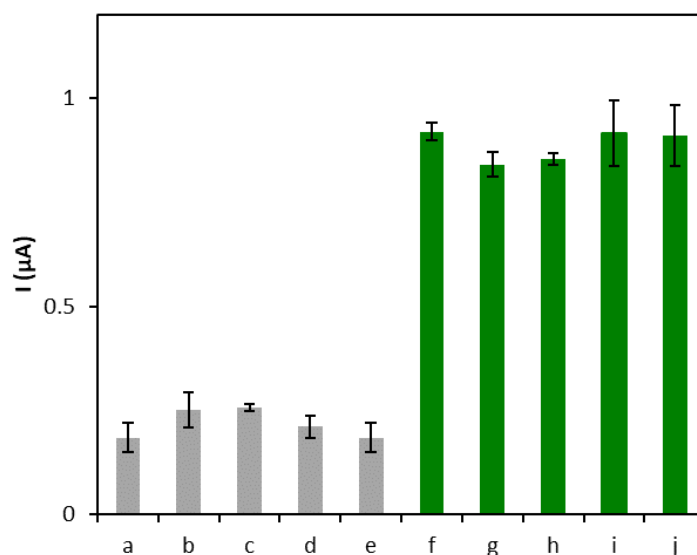


Figura 13 - Estudos da seletividade do imunossensor e a interferência de outros alérgenos alimentares. Análises efetuadas: (a) ausência de alérgénio; presença de apenas um alérgénio: (b) peixe (Parvalbumina, β -PV), (c) ovo (ovotransferrina, Gal d 3), (d) crustáceos (Tropomiosina, TPM), (e) amendoim (Ara h 1), (f) aipo (Api g 1); presença de Api g 1, (f) juntamente com outro alérgénio: (g) peixe (Parvalbumina, β -PV), (h) e ovo (ovotransferrina, Gal d 3), (i) crustáceos (Tropomiosina, TPM), (j) aipo (Api g 1) e amendoim (Ara h1)).

4.5. Estudo da estabilidade

Para avaliar a estabilidade do imunossensor, vários SPCEs foram biomodificados com o CAb e armazenados, a 4 °C. Foram realizadas análises periodicamente; após 1, 7, 21, 28 e 42 dias (correspondente a 6 semanas consecutivas).

De acordo com os resultados obtidos (**Figura 15**), observa-se que o imunossensor apresenta uma estabilidade de pelo menos 42 dias, não se verificando decréscimo da intensidade de corrente durante o período testado. Este facto revela ser vantajoso relativamente à preparação prévia do transdutor, nomeadamente a biomodificação, permitindo a redução do tempo necessário para a realização desta etapa e a redução da quantidade de reagentes e soluções utilizadas.

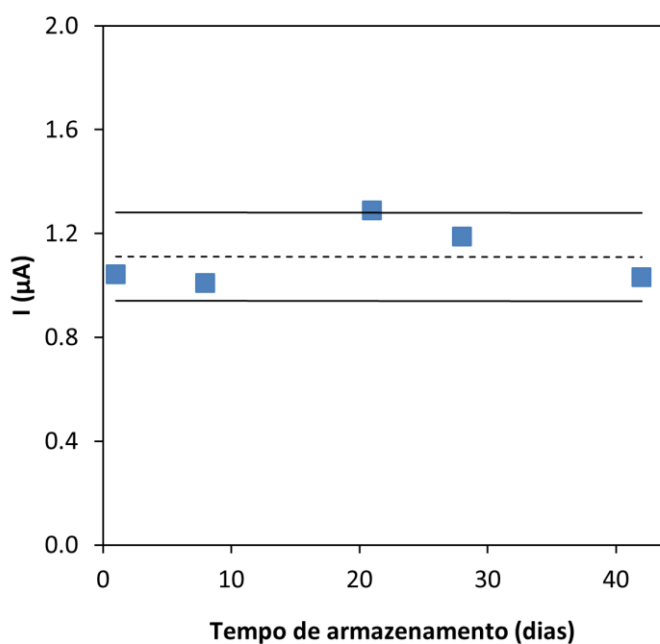


Figura 14 – Resultados do estudo da estabilidade do imunossensor efetuados durante 42 dias.

4.6. Ensaios de recuperação

Idealmente a avaliação da exatidão dos resultados é efetuada utilizando materiais de referência certificados. Porém, na ausência destes materiais procedeu-se à fortificação de um extrato de uma amostra alimentar (farinha, não contém aipo) com concentrações conhecidas do alergénio Api g 1 (250, 500, 1000 e 2000 ng/mL).

Os resultados obtidos encontram-se presentes na tabela 5, verificando-se que as percentagens de recuperação obtidos variam entre 95% a 115%, os quais são satisfatórios. Assim, os resultados obtidos com o uso do sensor são exatos.

Tabela 5 – Resultados do estudo de recuperação de uma amostra, que não contém aipo, fortificada com concentrações crescentes de Api g 1.

[Api g 1] adicionada (ng/mL)	[Api g 1] obtida (ng/mL)	Recuperação (%)	CV (%)
250	285	114,0	7,9
500	571	113,0	0,4
1000	1190	95,2	11,9
2000	1905	95,0	7,7

4.7. Estudo da diluição das amostras

A análise de produtos alimentares pode requerer uma diluição prévia, por ter o analito-alvo em concentrações elevadas ou para minimizar o efeito matriz. Deste modo, para avaliar qual a diluição mais indicada para a análise de amostras utilizando o imunossensor desenvolvido, procedeu-se a diluições sucessivas de uma amostra cujo rótulo mencionava “contém aipo (3%)”, a qual consistia num creme alimentar (líquido) homogéneo, ou seja, não necessitou de ser triturada.

Testou-se uma série de diluições (2×, 10×, 25×, 50×, 100× e 200×) e comparou-se os resultados com o controlo negativo e a amostra não diluída (**Figura 16**).

Observa-se que o Api g 1 não foi detetado nas diluições testadas. Porém, foi possível efetuar a análise e deteção na amostra não diluída.

Deste modo, conclui-se que para esta amostra que contém aipo numa percentagem referenciada a aplicação de diluição não produz qualquer resultado, ou seja, não é possível efetuar a deteção do alérgénio em estudo, o que pode ser justificável pela baixa quantidade de alérgénio presente. Deste modo, a quantificação de Api g 1 foi efetuada na amostra não diluída, permitindo observar que a diluição das amostras é um fator importante nesta análise.

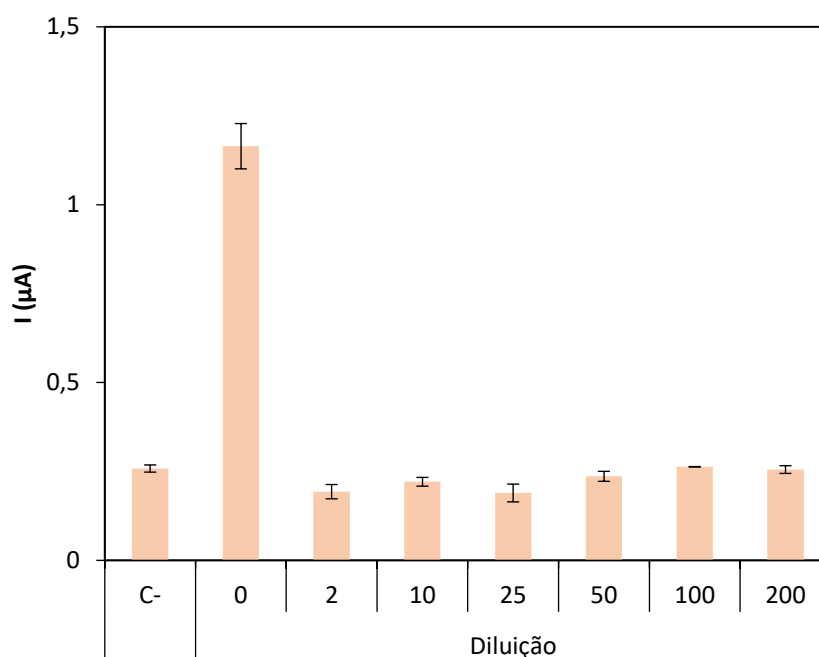


Figura 15 – Estudo da diluição das amostras (C-: controlo negativo (branco, ausência de Api g 1), Diluições: 2×, 10×, 25×, 50×, 100× e 200×; 0: Amostra não diluída).

4.8. Análise do alergénio Api g 1 em Aipo fresco e congelado

O estudo anterior demonstrou que o imunossensor permitia a deteção de pequenas quantidades de Api g 1 em amostras não diluídas. Deste modo, antes de efetuar a análise de amostras comerciais, procedeu-se à análise do aipo (planta) de modo a determinar e quantificar o Api g 1. Assim, a análise do foi efetuada em amostras de aipo fresco e congelado, para verificar a influencia que a temperatura poderá exercer na amostra. Para ambas foram analisadas individualmente as folhas, o caule e a raiz da planta. Procedeu-se à análise das amostras sem diluição do extrato (verde-claro) e à análise das amostras após diluição do extrato (1:2, verde-escuro) de modo a verificar se o alergénio era detetável em amostras diluídas. Os resultados encontram-se na **Figura 17**.

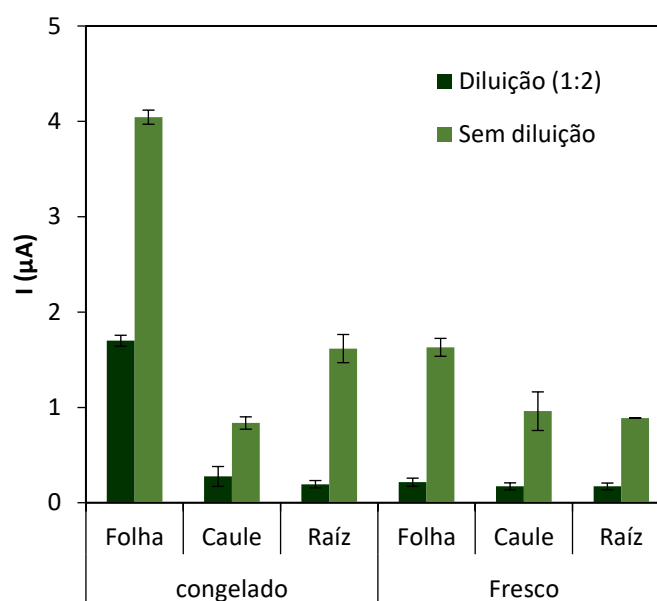


Figura 16 – Análise de amostras de Api g 1 em Aipo congelado e fresco (sem diluição e com diluição dos extratos de 1:2).

De acordo com os dados apresentados na figura 17, é possível observar que as amostras não diluídas apresentam um sinal analítico consideravelmente mais elevado do que as diluídas, permitindo a deteção do Api g 1 em todas as partes do aipo. Para as amostras diluídas apenas se detetou o Api g 1 em folha congelada. Deste modo, é possível concluir que a diluição da amostra não é adequada, tendo em conta que é suposto detetar o alergénio nas diferentes partes da planta.

Comparando os valores obtidos para as amostras não diluídas é possível diferenciar a concentração do Api g 1 nas diferentes partes analisadas. Ou seja, para folhas e raiz congelada obtiveram-se resultados superiores às mesmas, porém frescas. Para as análises do caule verificaram-se resultados semelhantes entre o produto fresco ou congelado.

Este facto (para as folhas e raiz) poderá ser explicado pela lise da parede celular das plantas perante o processo de congelação, o que resulta na libertação do conteúdo intracelular, podendo deste modo provocar maior elicitación em pessoas com hipersensibilidade aumentada a este alergénio.

4.9. Análise de amostras alimentares

Foram analisadas amostras alimentares cujos rótulos apresentaram designações de acordo com a legislação atual em vigor. Ou seja, produtos com presença de aipo referiam conter ou poder conter vestígios. Para além destas, analisaram-se amostras que não contêm aipo de modo a avaliar o correto funcionamento do imunossensor perante a ausência do alergénio em estudo. A análise destas amostras foi comparada com os resultados anteriores, referentes à planta (aipo). A análise foi realizada sem efetuar diluição das amostras, sendo posteriormente determinada a quantificação.

Os resultados obtidos nas análises (média e desvio-padrão, $n=3$ ($\mu\text{g/g}$) bem como todas as especificações essenciais a esse estudo (rotulagem, presença/ausência de aipo, estado da amostra) encontram-se indicados na **Tabela 6**. As amostras analisadas foram numeradas da seguinte forma: 1 – Creme de curgete (contém 3%); 2 – Especiarias (contém); 3 - Aipo moído (contém); 4 - Folhas de aipo secas (contém); 5 - Creme de marisco (pode conter); 6 - Creme de brócolos (pode conter); 7 - Esparguete à bolonhesa (pode conter); 8 - Amendoim em pó (não contém); 9 - Lecitina de soja (não contém); 10 - Clara de ovo 100% (não contém); 11 - Aveia (não contém); 12 - Cereais integrais (não contém); 13 – farinha de trigo sarraceno (não contém); 14 – Bolachas de água e sal (não contém); 15 - Folhas de aipo (aipo congelado); 16 - Caule (aipo congelado); 17 - Raiz (aipo congelado); 18 - Folhas de aipo (aipo fresco); 19 - Caule (aipo fresco); 20 - Raiz (aipo fresco).

A presença do aipo foi confirmada na amostra que contém 3% e também nas amostras cujo rótulo indicava que continham aipo, mas sem menção da quantidade, sendo a quantidade determinada superior à da amostra que contém 3%. Porém, este dado não é indicativo de que as amostras sem referência possam conter maior ou menor quantidade, uma vez que o estado em que a amostra é adquirida (líquido, sólido, seco ou em grão) pode ser relevante. Relativamente às amostras analisadas com indicação no rótulo de “pode conter”, verificou-se que os cremes analisados evidenciam uma quantidade reduzida de aipo, porém a amostra de esparguete à bolonhesa revela um valor elevado. Este valor é semelhante ao do valor obtido para as folhas de aipo, podendo ser indicativo da parte da planta presente da amostra.

Para as amostras de aipo, e tal como mencionado na secção anterior, há diferenças significativas entre a porção da planta e o seu estado de conservação, sendo os valores mais elevados de Api g 1 foram obtidos para folhas de aipo congelado, seguindo-se a raiz e o caule. Estes resultados poderão auxiliar na justificação dos valores de quantificação obtidos para as amostras “Especiarias” e “Esparguete à bolonhesa”. Apesar de não existir qualquer indicação da quantidade de aipo existente no rótulo dos produtos mencionados, possivelmente estas amostras contêm folha de aipo (muito utilizada para salsas ou como condimento), podendo assim justificar o valor obtido.

Nas amostras que “não contêm aipo” a intensidade de corrente obtida era similar ao branco, sendo o valor de quantificação inferior ao LOQ, indicando a ausência do alergénio nas amostras, permitindo corroborar a boa precisão do imunossensor para a análise de amostras alimentares.

Tabela 6 – Resultados da análise de Api g 1 em 14 amostras alimentares e 6 amostras de aipo (congelado e fresco), utilizando o imunossensor desenvolvido.

	Rotulagem	Nome	Especificação	Concentração ($\mu\text{g/g}$)
Amostras alimentares	Contém (3%)	Creme de curgete	Líquido	$41,3 \pm 3,11$
	Contém	Especiarias	Sólido	$91,4 \pm 0,08$
		Aipo moído	Sólido	$58,6 \pm 2,06$
		Folhas de aipo	Seco	$58,4 \pm 4,83$
	Pode conter	Creme de marisco	Sólido	$26,9 \pm 0,97$
		Creme de brócolos	Sólido	$16,5 \pm 1,01$
		Esparguete à bolonhesa	Sólido	$102,4 \pm 9,40$
	Não contém	Amendoim em pó	Sólido	<LOQ
		Lecitina de soja	Grão	<LOQ
		Clara de ovo 100%	Sólido	<LOQ
		Aveia	Sólido	<LOQ
		Cereais integrais	Sólido	<LOQ
		Farinha de trigo-sarraceno	Sólido	<LOQ
		Bolachas de água e sal	Sólido	<LOQ
Aipo	Congelado	Folhas de aipo		$181,7 \pm 3,62$
		Caule	Congelado	$25,3 \pm 3,14$
		Raiz		$67,5 \pm 1,47$
	Fresco	Folhas de aipo		$64,0 \pm 4,58$
		Caule	Fresco	$31,3 \pm 9,86$
		Raiz		$27,9 \pm 0,10$

4.10. Comparação do imunossensor desenvolvido com outros métodos

Neste trabalho foi desenvolvido o primeiro imunossensor eletroquímico para a análise de Api g 1. Na **Tabela 7** indicam-se as suas características e as de outros métodos descritos na literatura para a mesma análise.

Tabela 7 – Sumário descritivo dos métodos da análise de Api g 1.

Método	Amostra	Bioensaio	LOD	LOQ	Referência
ELISA	Aipo fresco e cozido	Api g 1, imunoensaio tipo <i>sandwich</i>	1,9 µg/g	5,6 µg/g	(H. Wang et al., 2011)
ELISA	Aipo	Api g 1, Sistema <i>multiplex</i>	-----	-----	(Filep et al., 2022)
PCR	Aipo fresco e amostras comerciais que continham aipo	Gene, PCR <i>duplex</i>	10 mg/kg	-----	(Pafundo et al., 2011)
PCR	Aipo (raiz, caule e folha). Produtos alimentares (salsichas)	Gene, PCR em tempo-real	10 pg DNA (extratos), 0,005% (salsichas)	-----	(Fuchs et al., 2012)
PCR	Alergénio do aipo presente em amostras comerciais	Gene, PCR <i>multiplex</i> em tempo-real	0,1%	-----	(Köppel et al., 2012)
PCR	Aipo (raiz, caule e folha), salsichas cruas e processadas	Gene, PCR <i>triplex</i> em tempo-real	50 ppm	-----	(Palle-Reisch et al., 2015)
PCR	Misturas lizadas de linguiça cozida. Produtos com a menção “pode conter vestígios”	Gene, PCR <i>tetraplex</i> em tempo-real	3,7 mg/kg	-----	(Luber et al., 2015)
PCR	Alimentos processados comerciais	Gene, PCR digital	0,20 ± 0.12 Cp/µL	0,83 Cp/µL	(Cau et al., 2021)
Lab-on-a-chip	Alimentos processados	<i>Primer</i> específico do aipo, microchip (<i>Lab-on-chip</i>)	100 ppm	-----	(Coisson et al., 2010)
Biossensor baseado em fibra ótica	Aipo fresco (folhas e caule)	Gene, PCR acoplado a detecção por fibra ótica	-----	-----	(Daems et al., 2017)
Imunossensor eletroquímico	Aipo fresco e congelado (folhas, caule e raiz); amostras alimentares processadas (contém 3%; contém; pode conter; não contém)	Api g 1, imunossensor do tipo <i>sandwich</i>	45 ng/mL	151 ng/mL	Este trabalho

Comparado com o método ELISA, o imunossensor foi testado em amostras de aipo fresco (cru) e congelado e também em amostras processadas, enquanto os métodos ELISA apenas descrevem testes realizados em aipo fresco. Relativamente aos trabalhos efetuados com a técnica PCR, estes são mais trabalhosos, utilizam equipamentos e recursos caros. Por outro lado, o imunossensor desenvolvido envolve menos gastos uma vez que requer volumes mais baixos (40 μL para o imunossensor e 100 μL para ELISA), sendo utilizados elétrodos e equipamentos de pequenas dimensões.

Foi ainda descrita a análise de aipo utilizando um microchip (*lab-on-chip*) cuja análise se baseia num protocolo de PCR do tipo *end-point* para realizar a deteção de aipo em amostras alimentares. Este método requer grande quantidade de recursos, nomeadamente materiais e equipamentos estando associado a custos mais elevados comparativamente aos biossensores. Neste estudo foi efetuada a análise de uma quantidade reduzida de amostras (apenas duas).

Foi ainda descrito um biossensor com deteção baseada em fibra ótica, o qual recorre ao método PCR para fazer analisar o alergénio. Neste trabalho foram avaliadas amostras de aipo fresco, nomeadamente folhas e caule. Comparativamente, o método desenvolvido nesta tese é mais simples, é portátil e menos dispendioso, para além de que, mais uma vez, envolveu a análise de um número de amostras consideravelmente superior.

5. CONCLUSÃO

5.1. Conclusões finais

As alergias alimentares são consideradas um problema de saúde pública que afeta milhões de pessoas em todo o mundo. De acordo com a legislação europeia, a menção obrigatória da presença de alérgenos no rótulo de produtos alimentares revela uma extrema importância. Assim, é fundamental desenvolver ferramentas analíticas que possibilitem a detecção e quantificação do alérgeno em produtos alimentares de forma expedita e barata.

Neste sentido, desenvolveu-se um imunossensor eletroquímico para a análise de um alérgeno do aipo (Api g 1) em amostras alimentares comerciais embaladas. Para este fim, utilizaram-se elétrodos serigrafados de carbono como transdutores, nos quais foi construído um imunoensaio do tipo *sandwich*. Foram otimizadas várias condições experimentais, nomeadamente: as concentrações do anticorpo de captura, do anticorpo de detecção, do agente bloqueador (BSA) e da enzima (HRP), os tempos de incubação e o formato do ensaio. O tempo total do ensaio foi de 1h 45min.

As principais características do imunossensor, em termos do desempenho analítico, foram: linearidade entre 50 e 4000 ng/mL, limite de detecção de 45 ng/mL, limite de quantificação de 151 ng/mL e coeficiente de variação de 4,7%. A seletividade do sensor foi confirmada através da análise de outros alérgenos alimentares (peixe, ovo, crustáceos, amendoim), que também revelaram não interferir na análise. Foi efetuado o estudo de estabilidade do transdutor biomodificado durante 42 dias, revelando um sinal analítico estável durante o tempo de estudo, permitindo diminuir o tempo necessário para a preparação da etapa de biomodificação do transdutor, bem como a redução da quantidade de reagentes e soluções a utilizar. Realizaram-se ensaios de recuperação de modo a avaliar a exatidão dos resultados, tendo sido testadas as seguintes concentrações de Api g 1: 250, 500, 1000 e 2000 ng/mL. A percentagem de recuperação obtida encontra-se entre 95% e 115%, demonstrando boa exatidão dos resultados.

A aplicabilidade do sensor foi avaliada através da análise de 20 amostras alimentares comerciais cujos rótulos apresentavam diferentes especificações referentes à presença de aipo, nomeadamente “contém 3%”, “contém”, ou “pode conter”. Para além destas, foram analisadas amostras que não contêm aipo ou qualquer vestígio deste. Adicionalmente, efetuaram-se análises de aipo sendo avaliada a quantidade de Api g 1 na planta tal como adquirida e também após o processo de congelação, sendo analisadas individualmente as diferentes partes da planta (folha, caule e raiz).

O imunossensor desenvolvido apresenta características diferenciadoras comparativamente com os métodos convencionais descritos na literatura, como ELISA e PCR, nomeadamente em relação à sua portabilidade, à quantidade de recursos necessários e ao custo.

Perante isto, o imunossensor desenvolvido revela ser uma ferramenta útil e prática para ser utilizado na indústria alimentar e/ou por consumidores com dietas restritivas.

5.2. Limitações e investigação futura

O tempo total do ensaio do imunossensor desenvolvido foi de 1h45min, sendo este inferior ao tempo de análise dos métodos tradicionais, os quais são tipicamente superiores a 2 h. Contudo, este parâmetro poderá ser melhorado/reduzido através de um dispositivo que possibilite uma mais rápida análise, por exemplo, através do uso de outro tipo de imunoensaio, como *label-free*. Este formato pode levar a menor sensibilidade na deteção quando comparado ao formato *sandwich*, o qual, por utilizar dois ou mais anticorpos, também tem especificidade mais elevada, porém o tempo necessário para a sua realização é consideravelmente inferior. Para além disto, a utilização de outras enzimas/substratos enzimáticos (p.ex., hidroquinona, naftol, indol fosfato) poderá permitir análises diferenciadas utilizando outras técnicas eletroquímicas, nomeadamente voltametria de onda quadrada, voltametria de pulso diferencial, ou voltametria de varrimento linear. Para além destas sugestões poderá ser pertinente desenvolver imunossensores para a análise de outro alérgénio do aipo, como por exemplo o Api g 4, o qual é mencionado na literatura devido à sua prevalência em alimentos cujas confeções alimentares são efetuadas a temperaturas altas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aalberse, R. C., Acevedo, N., Aglas, L., Altmann, F., Arruda, K. L., Asero, R., & Ballmer-Weber, B. (2022). *Molecular Allergy User's Guide 2.0* (K. Hoffmann-Sommergruber, C. Hilger, A. Santos, L. de las Vecillas, & S. Dramburg (eds.)). European Academy of Allergy and Clinical Immunology.
- Adeloju, S. B. (2005). Amperometry. *Encyclopedia of Analytical Science*, 70–79. ISBN 9780123693976.
- Amor-Gutiérrez, O., Costa-Rama, E., & Fernández Abedul, M. T. (2019). Determination of glucose with an enzymatic paper-based sensor. In *Laboratory Methods in Dynamic Electroanalysis*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815932-3.00025-5>
- Asturias, J. A., Arilla, M. C., Gómez-Bayón, N., Aguirre, M., Martínez, A., Palacios, R., & Martínez, J. (1998). Cloning and immunological characterization of the allergen Hel a 2 (profilin) from sunflower pollen. *Molecular Immunology*, 35(8), 469–478. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(98\)00036-4](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(98)00036-4)
- Asturias, Juan A., Arilla, M. C., Bartolomé, B., Martínez, J., Martínez, A., & Palacios, R. (1997). Sequence polymorphism and structural analysis of timothy grass pollen profilin allergen (Phl p 11). *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1352(3), 253–257. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(97\)00061-4](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(97)00061-4)
- Bakos, N., Schöll, I., Szalai, K., Kundi, M., Untersmayr, E., & Jensen-Jarolim, E. (2006). Risk assessment in elderly for sensitization to food and respiratory allergens. *Immunology Letters*, 107(1), 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2006.06.003>
- Ballmer-Weber, B. K., Hoffmann, A., Wüthrich, B., Lüttkopf, D., Pompei, C., Wangorsch, A., Kästner, M., & Vieths, S. (2002). Influence of food processing on the allergenicity of celery: DBPCFC with celery spice and cooked celery in patients with celery allergy. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 57(3), 228–235. <https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2002.1o3319.x>
- Bauer, L., Ebner, C., Hirschwehr, R., Wüthrich, B., Pichler, C., Fritsch, R., Scheiner, O., & Kraft, D. (1996). IgE cross-reactivity between birch pollen, mugwort pollen and celery is due to at least three distinct cross-reacting allergens: Immunoblot investigation of the birch-mugwort-celery syndrome. *Clinical and Experimental Allergy*, 26(10), 1161–1170. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.1996.tb00503.x>
- Brown, J. (2023). *Mass spectrometry Mass spectrometry*. Encyclopaedia Britannica, Inc. <https://www.britannica.comhttps://www.britannica.com/science/mass-spectrometry>
- Cau, S., Tilocca, M. G., Spanu, C., Soro, B., Tedde, T., Salza, S., Melillo, R., Piras, G., Virgilio, S., Vodret, B., & Mudadu, A. G. (2021). Detection of celery (*Apium graveolens*) allergen in foods of animal and plant origin by droplet digital PCR assay. *Food Control*, 130(June). <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108407>
- Cheriyedath, S. (2019). *Electrochemical Analysis.pdf* (pp. 1–4). News Medical Life Sciences. <https://www.news-medical.net/life-sciences/Electrochemical-Analysis.aspx>
- Cho, I. H., Lee, J., Kim, J., Kang, M. S., Paik, J. K., Ku, S., Cho, H. M., Irudayaraj, J., & Kim, D. H. (2018). Current technologies of electrochemical immunosensors: Perspective on signal amplification. *Sensors (Switzerland)*, 18(1), 1–18. <https://doi.org/10.3390/s18010207>
- Coïsson, J. D., Cereti, E., Garino, C., D'Andrea, M., Recupero, M., Restani, P., & Arlorio, M. (2010). Microchip capillary electrophoresis (Lab-on-chip®) improves detection of celery (*Apium graveolens* L.) and sesame (*Sesamum indicum* L.) in foods. *Food Research International*, 43(5), 1237–1243. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.03.008>
- Comissão Europeia. (2017). Comunicação da Comissão de 13 de julho de 2017. *Jornal Oficial Da União Europeia*, C428(12 de dezembro), 1–5.
- Conradie, J., & von Eschwege, K. G. (2020). Cyclic voltammograms and electrochemical data of FeII

- polypyridine complexes. *Data in Brief*, 31, 105754. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2020.105754>
- Daems, D., Peeters, B., Delpont, F., Remans, T., Lammertyn, J., & Spasic, D. (2017). Identification and quantification of celery allergens using fiber optic surface plasmon resonance PCR. *Sensors (Switzerland)*, 17(8). <https://doi.org/10.3390/s17081754>
- Dölle, S., Welter, S., Ruppel, E., Lehmann, K., Schwarz, D., Jensen-Jarolim, E., Zieglmayer, P., Franken, P., & Worm, M. (2018). Clinical reactivity of celery cultivars in allergic patients – Role of Api g 1. *Clinical & Experimental Allergy*, 1–20.
- Dubiela, P., Humeniuk, P., Bublin, M., Metz-Favre, C., Viel, S., Bienvenu, F., Hafner, C., Pauli, G., & Hoffmann-Sommergruber, K. (2022). Two patients with allergy to celery — Possible role of carbohydrate determinants and difference between seeds and tuber allergenicity. *World Allergy Organization Journal*, 15(11), 100708. <https://doi.org/10.1016/j.waojou.2022.100708>
- EFSA. (2014). Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes. *European Food Safety Authority (EFSA)*, 12(11), 1–286. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3894>
- Filep, S. C., Reid Black, K., Smith, B. R. E., Block, D. S., Kuklinska-Pijanka, A., Bermingham, M., Oliver, M. A., Thorpe, C. M., Schuhmacher, Z. P., Agah, S., Wuenschmann, S., & Chapman, M. D. (2022). Simultaneous quantification of specific food allergen proteins using a fluorescent multiplex array. *Food Chemistry*, 389(September 2021), 132986. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132986>
- Forster, R. J., & Walsh, D. A. (2005). VOLTAMMETRY | Overview. In *Encyclopedia of Analytical Science* (second, pp. 181–188). Elsevier Ltd.
- Freitas, M., Nouws, H. P. A., & Delerue-Matos, C. (2018). Electrochemical Biosensing in Cancer Diagnostics and Follow-up. *Electroanalysis*, 30(8), 1576–1595. <https://doi.org/10.1002/elan.201800193>
- Fuchs, M., Cichna-Markl, M., & Hochegger, R. (2012). Development and validation of a novel real-time PCR method for the detection of celery (*Apium graveolens*) in food. *Food Chemistry*, 130(1), 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.005>
- Gadermaier, G., Egger, M., Girbl, T., Erler, A., Harrer, A., Vejvar, E., Liso, M., Richter, K., Zuidmeer, L., Mari, A., & Ferreira, F. (2011). Molecular characterization of Api g 2, a novel allergenic member of the lipid-transfer protein 1 family from celery stalks. *Molecular Nutrition and Food Research*, 55(4), 568–577. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000443>
- Gadermaier, G., Hauser, M., Egger, M., Ferrara, R., Briza, P., Santos, K., Zennaro, D., Girbl, T., Zuidmeer-Jongejan, L., Mari, A., & Ferreira, F. (2011). Sensitization prevalence, antibody cross-reactivity and immunogenic peptide profile of Api g 2, the non-specific lipid transfer protein 1 of celery. *PLoS ONE*, 6(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024150>
- Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 1–4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
- Hoffmann-Sommergruber, K., Ferris, R., Pec, M., Radauer, C., O’Riordain, G., Laimer Da Camara Machado, M., Scheiner, O., & Breiteneder, H. (2000). Characterization of Api g 1.0201, a new member of the Api g 1 family of celery allergens. *International Archives of Allergy and Immunology*, 122(2), 115–123. <https://doi.org/10.1159/000024367>
- Horlock, C., & Imperial College London, U. (2023). *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*. BiteSized Immunology: Experimental Techniques. <https://doi.org/10.1385/1-59259-870-6:419>
- Jurado-Sánchez, B. (2018). Nanoscale biosensors based on self-propelled objects. *Biosensors*, 8(3), 1–15. <https://doi.org/10.3390/bios8030059>
- Köppel, R., van Velsen-Zimmerli, F., & Bucher, T. (2012). Two quantitative hexaplex real-time PCR systems for the detection and quantification of DNA from twelve allergens in food. *European Food Research and Technology*, 235(5), 843–852. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1806-8>

- LaHood, N. A., & Patil, S. U. (2019). Food Allergy Testing. *Clinics in Laboratory Medicine*, 39(4), 625–642. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2019.07.009>
- Luber, F., Demmel, A., Pankofer, K., Busch, U., & Engel, K. H. (2015). Simultaneous quantification of the food allergens soy bean, celery, white mustard and brown mustard via combination of tetraplex real-time PCR and standard addition. *Food Control*, 47, 246–253. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.06.047>
- Lüttkopf, D., Ballmer-Weber, B. K., Wüthrich, B., & Vieths, S. (2000). Celery allergens in patients with positive double-blind placebo-controlled food challenge. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106(2), 390–399. <https://doi.org/10.1067/mai.2000.108711>
- Pafundo, S., Gulli, M., & Marmiroli, N. (2011). Comparison of DNA extraction methods and development of duplex PCR and real-time PCR to detect tomato, carrot, and celery in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(19), 10414–10424. <https://doi.org/10.1021/jf202382s>
- Palle-Reisch, M., Hochegger, R., & Cichna-Markl, M. (2015). Development and validation of a triplex real-time PCR assay for the simultaneous detection of three mustard species and three celery varieties in food. *Food Chemistry*, 184, 46–56. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.049>
- Regulation (EC) No 1169/2011. (2011). The European Parliament and the Council of the European Union on the provision of food information to consumers. *Oj*, 17(1169), 5–50. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:02011R1169-20180101&from=EN>
- Robertson, S. (2019). *What are Biosensors?* News Medical Life Sciences. <https://www.news-medical.net/health/What-are-Biosensors.aspx>
- Roy, S., & Pandit, S. (2018). Microbial electrochemical system: Principles and application. In *Biomass, Biofuels, Biochemicals: Microbial Electrochemical Technology: Sustainable Platform for Fuels, Chemicals and Remediation*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64052-9.00002-9>
- Santos, A. F., Alpan, O., & Hoffmann, H. J. (2021). Basophil activation test: Mechanisms and considerations for use in clinical trials and clinical practice. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 76(8), 2420–2432. <https://doi.org/10.1111/all.14747>
- Scheurer, S., Wangorsch, A., Haustein, D., & Vieths, S. (2000). Cloning of the minor allergen Api g 4 profilin from celery (*Apium graveolens*) and its cross-reactivity with birch pollen profilin Bet v 2. *Clinical and Experimental Allergy*, 30(7), 962–971. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2000.00821.x>
- Scheurer, Stephan, Wangorsch, A., Nerkamp, J., Stahl Skov, P., Ballmer-Weber, B., Wüthrich, B., Haustein, D., & Vieths, S. (2001). Cross-reactivity within the profilin panallergen family investigated by comparison of recombinant profilins from pear (Pyr c 4), cherry (Pru av 4) and celery (Api g 4) with birch pollen profilin Bet v 2. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 756(1–2), 315–325. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(01\)00090-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00090-1)
- Schirmer, T., Hoffmann-Sommergrube, K., Susani, M., Breiteneder, H., & Marković-Housley, Z. (2005). Crystal structure of the major celery allergen Api g 1: Molecular analysis of cross-reactivity. *Journal of Molecular Biology*, 351(5), 1101–1109. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.06.054>
- Scientific, T. (2021). *Celery Allergen Fact Sheet* (pp. 1–3).
- Siles, R. I., & Hsieh, F. H. (2011). Allergy blood testing: A practical guide for clinicians. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 78(9), 585–592. <https://doi.org/10.3949/ccjm.78a.11023>
- Somssich, I. E., Schmelzer, E., Kawalleck, P., & Hahlbrock, K. (1988). Gene structure and in situ transcript localization of pathogenesis-related protein 1 in parsley. *MGG Molecular & General Genetics*, 213(1), 93–98. <https://doi.org/10.1007/BF00333403>
- Thierry, R. (1985). *Mémoires originaux Allergie au c61eri Etude clinique et biologique*. 25(1), 1–6.
- Thomas, B. L. (2019). *A food allergy is a result of your immune system getting confused by the structural similarity between proteins found in pollen or the harmless proteins found in certain foods*. 1–4.

- Touraine, F., Ouzeau, J. F., Boullaud, C., Dalmay, F., & Bonnaud, F. (2002). Enquête descriptive en milieu scolaire sur la prévalence de l'allergie alimentaire. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 42(8), 763–768. [https://doi.org/10.1016/S0335-7457\(02\)00225-3](https://doi.org/10.1016/S0335-7457(02)00225-3)
- Valenta, B. R., Duchene, M., Ebner, C., Valent, P., Sillaber, C., Deviller, P., Ferreira, F., Tejkl, M., Edelmann, H., Kraft, D., Scheiner, O., Mddecine, F. De, & Carrel, A. (1992). Profilins Constitute a Novel Family of Functional Plant Pan-allergens. *Immuno-Virologie Moléculaire et Cellulaire*, 175(February).
- Wan, K. S., & Chiu, W. H. (2012). Food hypersensitivity in primary school children in Taiwan: Relationship with asthma. *Food and Agricultural Immunology*, 23(3), 247–254. <https://doi.org/10.1080/09540105.2011.615063>
- Wang, H., Li, G., Yuan, F., Wu, Y., & Chen, Y. (2011). Detection of the allergenic celery protein component (Api g 1.01) in foods by immunoassay. *European Food Research and Technology*, 233(6), 1023–1028. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1597-3>
- Wang, J. (2006). *Analytical Electrochemistry* (Wiley-VCH (ed.); Third edit). John Wiley & Sons, Inc. <https://download.e-bookshelf.de/download/0000/5854/31/L-G-0000585431-0002361450.pdf>
- Wangorsch, A., Ballmer-Weber, B. K., Rösch, P., Holzhauser, T., & Vieths, S. (2007). Mutational epitope analysis and cross-reactivity of two isoforms of Api g 1, the major celery allergen. *Molecular Immunology*, 44(10), 2518–2527. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2006.12.023>
- Wangorsch, A., Lidholm, J., Mattsson, L. A., Larsson, H., Reuter, A., Gubesch, M., Gadermaier, G., Bures, P., Scheurer, S., Ballmer-Weber, B., & Vieths, S. (2022). Identification of a defensin as novel allergen in celery root: Api g 7 as a missing link in the diagnosis of celery allergy? *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 77(4), 1294–1296. <https://doi.org/10.1111/all.15196>
- Wu, J., Fu, Z., Yan, F., & Ju, H. (2007). Biomedical and clinical applications of immunoassays and immunosensors for tumor markers. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 26(7), 679–688. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.05.007>
- Zuberbier, T., Edenharter, G., Worm, M., Ehlers, I., Reimann, S., Hantke, T., Roehr, C. C., Bergmann, K. E., & Niggemann, B. (2004). Prevalence of adverse reactions to food in Germany - A population study. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 59(3), 338–345. <https://doi.org/10.1046/j.1398-9995.2003.00403.x>