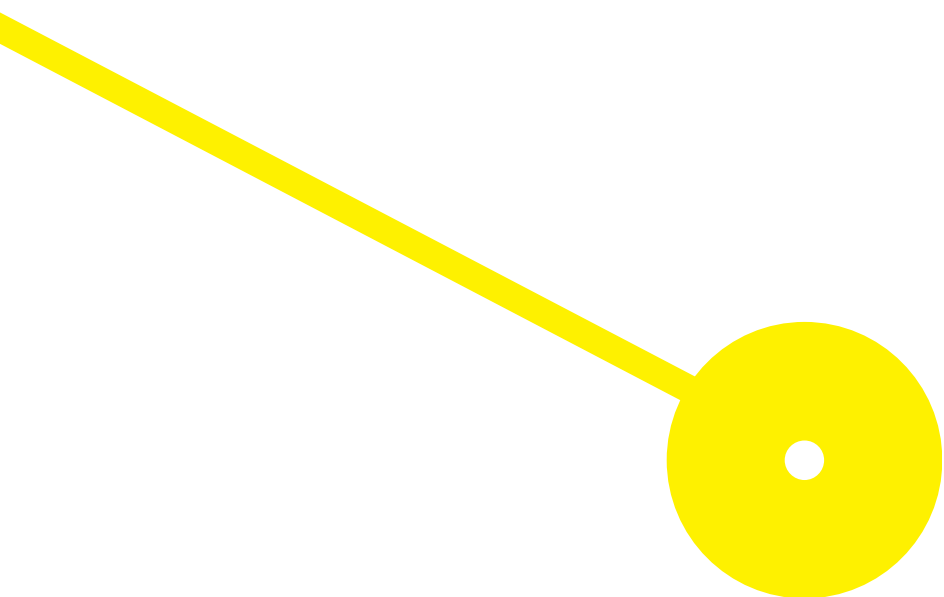




Desenvolvimento e implementação de técnicas para deteção de alergénios nos alimentos.

Andreia Sofia Rego dos Santos

10/2022





**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**



Desenvolvimento e implementação de técnicas para deteção de alergénios nos alimentos

Autor

Andreia Sofia Rego dos Santos

Orientador(es)

Professora Maria Manuela Amorim, Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA), Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Professor António Augusto Araújo Gomes, Biogerm S.A., Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Professor Hugo Daniel Carvalho de Azevedo Rocha, INSA-Porto, Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Relatório de Estágio apresentado para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública – Área de Especialização em Microbiologia e Saúde Pública pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Agradecimentos

Gostaria, primeiramente, de agradecer à Prof.^a Maria Manuela Amorim de Silva e Sousa a oportunidade de frequentar este mestrado, que considero uma experiência enriquecedora não só na minha formação académica como a nível pessoal e futuramente profissional.

Ao Prof. António Araújo Gomes pela oportunidade de estagiar na Biogerm SA, por me orientar ao longo deste percurso, por todos os conhecimentos transmitidos que, com certeza, colocarei em prática em todos os meus projetos futuros e, acima de tudo, por todo o apoio e confiança que depositou em mim, obrigada.

A todos os elementos da equipa da Biogerm SA, muito obrigada por toda a simpatia, boa disposição e disponibilidade com que me acolheram neste período da minha formação.

Um especial agradecimento ao Prof. Doutor Hugo Rocha, por toda a paciência, dedicação, disponibilidade e ajuda em todos os processos de elaboração deste relatório e, acima de tudo, pela boa disposição constante e pelos momentos de descontração.

A todos os meus colegas e amigos, em especial ao Isac pela paciência, transmissão de força e confiança. Às minhas colegas de turma, em especial à Rita, à Márcia e à Sofia pelos desabafos longos e grandes momentos de descontração ao longo destes dois anos, obrigadas meninas.

Por fim, quero agradecer à minha família, em especial os meus pais e irmão, obrigada por todo o carinho, compreensão, palavras de incentivo e acima de tudo apoio incondicional, tanto nesta como em tantas outras etapas da minha vida.

Resumo

As reações de hipersensibilidade ou alérgica aos alimentos tem vindo a aumentar, e sendo a mostarda preta e os crustáceos uns dos principais alergénios responsáveis por estas reações de hipersensibilidade, pelo que é impreterível a deteção e quantificação destes alergénios nas mais variáveis matrizes de alimentos.

O estágio realizado em um Laboratório de Saúde Pública teve como objetivo adquirir conhecimentos e competências nas metodologias referentes à implementação de métodos para deteção de alergénios. O principal objetivo deste estudo foi implementar um método de deteção de alergénios da mostarda preta e de crustáceos em amostras de alimentos com diferentes graus de processamento. A extração de ADN foi realizada com recurso a um kit comercial da Qiagen. Por sua vez, a deteção dos alergénios foi feita através da tecnologia TaqMan, utilizando a técnica de qPCR. Foram utilizados, respetivamente, primers e sondas específicas para a mostarda preta e os crustáceos.

Os resultados obtidos sugerem que este método permite detetar e quantificar a mostarda preta e os crustáceos, mesmo em matrizes mais complexas. Podemos afirmar que é um método sensível, dado que conseguimos detetar com 100% de eficiência uma quantidade reduzida de ADN do alergénio (<20,8pg de ADN de mostarda preta e <25pg de ADN de crustáceos).

Dado que a indústria alimentar não pára de evoluir e matrizes mais complexas surgem no mercado, tem sido desafiante a deteção e quantificação de alergénios. Assim, os resultados obtidos neste estudo podem contribuir para uma melhor determinação dos alergénios e, conseqüentemente, garantir a segurança do consumidor.

Palavras-chave: Deteção; Alergénios; Mostarda preta; Crustáceos; qPCR; Sondas TaqMan

Abstract

Hypersensitivity reactions or allergic reactions to foods have been increasing and, with black mustard and crustaceans being one of the main allergens responsible for these hypersensitivity reactions, they become essential for the detection of allergens in the most variable matrices.

The internship carried out in a Public Health Laboratory aimed to acquire knowledge and skills in methodologies related to the implementation of methods for the detection of allergens. Thus, the main objective of this study was to implement and validate a method for detecting black mustard allergens and crustaceans from food sources with different degrees of processing. DNA extraction was performed with a commercial Qiagen kit. In turn, allergen detection was performed using TaqMan technology, using the qPCR technique. Specific primers and probes for black mustard and crustaceans.

The results obtained in this study suggest that this method allows detecting and quantifying most of the black mustard and crustaceans, even in more complex matrices. Furthermore, we can say that it is a sensitive method, as we can detect with 100% efficiency a small amount of allergen DNA (<20.8pg of black mustard DNA and <25pg of crustacean DNA).

As the food industry continues to evolve and more complex matrices appear on the market, allergen detection and quantification has been challenging. Thus, the results obtained in this study may contribute to a better determination of allergens and consequently ensure consumer safety.

Keywords: Detection; Allergens; Black Mustard; Crustaceans; qPCR; TaqMan probes

Índice

Lista de Siglas e Abreviaturas.....	VIII
Índice de Tabelas	IX
Índice de Figuras.....	X
Organização do Relatório.....	XI
1. Capítulo I.....	1
1.1. Instituição e contextualização do estágio.....	1
1.2. Objetivo.....	1
1.3. Actividades Desenvolvidas.....	2
1.4. Procedimentos Laboratoriais.....	2
1.4.1.Extração de ADN.....	2
1.4.1.1 Extração com o kit comercial.....	2
1.4.1.2 Extração manual.....	3
1.4.2. Medição da concentração de ADN e avaliação do grau de pureza.....	4
1.4.3. Purificação de ADN.....	4
1.4.4. Amplificação e deteção dos alergénios pela técnica de qPCR.....	5
2. Capítulo II.....	6
2.1. Introdução.....	6
2.1.1. Alergénios.....	6
2.1.1.1 O impacto do processamento dos alimentos nos alergénios.....	9
2.2. Métodos de deteção de alergénios.....	10
2.2.1. Métodos baseados no ADN.....	11
2.2.1.1 Etapas de validação para a implementação de um método baseado no ADN.....	11
2.2.2. Métodos não-baseados no ADN.....	12
2.3. Os alergénios estudados.....	12
2.3.1. Mostarda.....	12
2.3.2. Crustáceos.....	14
2.4. Objetivo.....	15
2.5. Materias e Métodos.....	16
2.5.1. Seleção das amostras.....	16
2.5.2. Extração de ADN.....	16
2.5.3. Medição da concentração de ADN e avaliação do grau de pureza.....	16
2.5.4. Amplificação e deteção da mostarda preta e dos crustáceos pela técnica de qPCR.....	16

2.5.5. Etapas de validação do método realizadas.....	17
2.5.6. Análise estatística.....	18
2.6. Resultados	19
2.6.1. Mostarda preta.....	19
2.6.2. Crustáceos.....	21
2.7. Discussão	25
2.8. Conclusão	28
Referências Bibliográficas.....	29

Lista de Siglas e Abreviaturas

μ l	Microlitro
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
COI	Citocromo c oxidase
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
EAST	<i>Enzyme allergosorbent test</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ESS PPorto	Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto
IgE	Imunoglobulinas E
IPAC	Instituto Português de Acreditação
LOD	<i>Limit of Detection</i>
ml	Mililitro
ng	Nanograma
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pg	Picogramas
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
r^2	Coefficiente de correlação
RAST	<i>Radio-allergosorbent test</i>
RFU	Unidades relativas de fluorescência
RIE	<i>Rocket immuno-electrophoresis</i>
SOTI	<i>Systemic oral tolerance induction</i>
TE	Tris EDTA
UC	Unidade Curricular
xg	Força G (Força Gravitacional)

Índice de Tabelas

<i>Tabela 1 – Características clínicas comuns da alergia alimentar.</i>	8
<i>Tabela 2 – Alergénios da mostarda</i>	14
<i>Tabela 3 – Sequencias de Primes e Sondas utilizadas, bem como os volumes pipetados para cada poço em µl.</i>	17
<i>Tabela 4 – Grau de pureza e quantidade de ADN isolado das amostras de mostarda preta.</i>	19
<i>Tabela 5 – Diluições em série da amostra mostarda preta em grão e respetivos Cts.</i>	19
<i>Tabela 6 – Repetibilidade do método de PCR na concentração de ADN da mostarda preta perto do LOD (diluição 1:10000).</i>	19
<i>Tabela 7 – Grau de pureza e quantidade de ADN isolado das amostras de crustáceos.</i>	21
<i>Tabela 8 – Espécies de peixes testadas com a finalidade de verificar se existia alguma reatividade cruzada com os crustáceos e respetiva quantidade de ADN isolado, grau de pureza e Cts.</i>	21
<i>Tabela 9 – Diluições em série da amostra camarão cru e respetivos Cts.</i>	22
<i>Tabela 10 – Repetibilidade do método de PCR na concentração de ADN dos crustáceos perto do LOD (diluição 1:10000).</i>	23

Índice de Figuras

<i>Figura 1 – Classificação das reações adversas aos alimentos.....</i>	<i>7</i>
<i>Figura 2 – Curvas padrão obtidas por amplificação de ADN extraído de mostarda preta.....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 3 – Curva de amplificação obtida com mostarda Dijon e respetivo controlo negativo.....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 4 – Curvas de amplificação obtidas no teste de reatividade cruzada.....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 5 – Rótulo do alimento processado utilizado (Delícias do mar)</i>	<i>22</i>
<i>Figura 6 – Curvas padrão obtidas por amplificação de ADN extraído de crustáceos.....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 7 – Curvas de amplificação obtidas com os rissóis dos vários fornecedores.</i>	<i>24</i>

Organização do Relatório

Este relatório aborda a componente de estágio realizado para conclusão do Mestrado em Análises Clínicas e Saúde Pública na Biogerm S.A. e o estudo de caso desenvolvido que se intitula de “Desenvolvimento e implementação de técnicas para deteção de alergénios nos alimentos”.

De forma a organizar as duas componentes descritas no relatório, organizou-se o mesmo em dois capítulos:

- Capítulo I: contextualiza o estágio, objetivos e metodologias desenvolvidas no laboratório.
- Capítulo II: desenvolve-se o projeto com subdivisões de introdução com contextualização do tema, objetivos, metodologias, resultados, discussão dos mesmos e conclusão.

1. Capítulo I

1.1. Instituição e contextualização do estágio

A realização deste estágio foi proposta no âmbito da Unidade Curricular (UC) de Estágio, integrada no plano de estudos de 2º ano de mestrado em Análises Clínicas e Saúde Pública – ramo de Especialização em Microbiologia e Saúde Pública da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto (ESS|PPorto), e decorreu na empresa Biogerm SA, de 17 de janeiro a 31 de julho de 2022, sob orientação do Prof. António Araújo. Focou-se essencialmente na aquisição de conhecimentos e no treino para adquirir competências de perícia nas metodologias referentes a implementação de métodos para deteção de alergénios.

A Biogerm SA, é uma empresa constituída em 1994 e sediada no conselho da Maia, inicialmente com o objetivo de fabricar um meio de cultura específico para o bacilo da tuberculose. Contudo, rapidamente expandiu a produção para outros meios de cultura. Em 1997 alargou o seu especto de atuação para análises de águas, alimentos e ambiente.

Atualmente, é um “laboratório de referência na área da saúde pública, com análises microbiológicas e químicas no controlo da qualidade alimentar, águas e ambiente, contemplando as mais recentes e avançadas metodologias.” (1).

O laboratório possui um sistema de qualidade implementado e encontra-se acreditado pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC), segundo a Norma NP EN ISSO/IEC 17025 – Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração, com o número L0349, datado de 2005 (1).

Para o exercício das suas funções, a Biogerm SA encontra-se equipada com laboratórios de preparação de meios de cultura, de microbiologia alimentar e águas, de biologia molecular, de química instrumental e clássica, onde são realizados todos os procedimentos laboratoriais com o objetivo e a missão de transmitir confiança e garantir a satisfação do cliente.

O laboratório de biologia molecular encontra-se totalmente equipado e, diariamente, processa amostras de águas para pesquisa de *Legionella*, de alimentos para pesquisa de contaminantes, assim como também realiza a pesquisa do vírus SARS-CoV-2 e análise de alergénios, de forma a responder efetivamente aos pedidos dos seus clientes.

1.2. Objetivo

Este estágio teve como objetivo compreender e acompanhar todas as metodologias laboratoriais, bem como, desenvolver competências práticas a nível laboratorial, de forma a integrar os conhecimentos adquiridos ao longo do mestrado e deste estágio. Para além disso, poder integrar uma equipa de trabalho

laboratorial permitiu desenvolver competências interpessoais e compreender a realidade de um laboratório de análise de águas e alimentos, e refletir a importância que estes representam para a Saúde Pública.

1.3. Atividades Desenvolvidas

Neste relatório irei relatar todas as técnicas observadas ou realizadas e os conhecimentos e competências adquiridas, em todas as etapas do processo de amostras de alimentos com diferentes graus de processamento, desde a entrada no laboratório até à fase de armazenamento das mesmas, durante o meu período de estágio.

1.4. Procedimentos Laboratoriais

Para a realização da deteção de alérgenos em amostras de alimentos, tanto puras como de matrizes mais complexas, é necessário realizar uma extração de ácido desoxirribonucleico (ADN), medirmos de seguida a concentração de ADN e avaliarmos o grau de pureza da amostra. Consuante os valores do grau de pureza pode ser necessário a realização de um passo intermediário de purificação do ADN extraído e, por fim, realiza-se a amplificação e deteção do alérgeno em estudo pela técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

1.4.1. Extração de ADN

A extração de ADN genómico das amostras utilizadas do decorrer deste estágio foi realizada de duas formas diferentes, uma extração com recurso a um kit comercial e outra manual. Dependendo do método de extração escolhido, este pode influenciar quer a integridade do ADN quer a pureza do mesmo (2).

1.4.1.1 Extração com o kit comercial

O kit comercial utilizado foi o da QIAGEN®, *DNeasy® mericon® Food Handbook*, seguindo as indicações do fabricante:

1. Coloca-se num tubo de centrifuga 2 g da amostra homogeneizada, 10 ml de *Food Lysis Buffer* e 25 µl de *Proteinase K*;
2. Incuba-se a amostra a 60°C durante 30 minutos, e de seguida procede-se ao arrefecimento da mesma (entre os 15 e o 25°C), para aumentar a precipitação do inibidor;
3. Centrifuga-se a 2500xg durante 5 minutos;
4. Pipeta-se 500 µl de Clorofórmio para um *eppendorf*;
5. Transfere-se, cuidadosamente, 700 µl do sobrenadante da amostra, que havia sido centrifugada no passo 3, para o *eppendorf* que contem o Clorofórmio;

6. Coloca-se a amostra a vortexar e centrifuga-se novamente a 14000xg durante 15 minutos¹;
7. Pipeta-se 350 µl de *Buffer PB* e 350µl do sobrenadante para um novo *eppendorf* e vortexar;
8. Transfere-se todo o conteúdo de cada amostra para uma coluna. Centrifuga-se a 17900xg durante 1 minuto e descarta-se o que se encontrava no reservatório;
9. Adiciona-se 500 µl de *Buffer AW2* à coluna, centrifuga-se a 17900xg durante 1 minuto e descarta-se o que se encontrava no reservatório;
10. Transfere-se a coluna para um novo *eppendorf* e pipeta-se 150 µl de *Buffer EB*. Incuba durante 1 minuto à temperatura ambiente e centrifuga-se a 17900xg durante 1 minuto.
11. Descarta-se a coluna.
12. Armazenam-se as amostras extraídas a -20°C.

1.4.1.2 Extração manual

Algumas amostras tiveram de passar por um processo de extração de ADN manual, uma vez que se tratavam de amostras com uma matriz mais complexa, que pelo método de extração descrito anteriormente não apresentam os resultados esperados no PCR. O processo de extração de ADN manual tem como objetivo a obtenção de uma amostra mais pura, seguindo as etapas a seguir descritas:

1. Coloca-se num tubo de centrifuga 4 g da amostra homogeneizada, 10 ml de *Food Lysis Buffer* e 25 µl de *Proteinase K*;
2. Incuba-se a amostra a 37°C durante a noite. De seguida, procede-se ao arrefecimento da amostra (entre os 15 e o 25°C), para aumentar a precipitação do inibidor;
3. Centrifuga-se a 5000xg durante 30 minutos;
4. Pipeta-se 700 µl de Fenol para um *eppendorf*;
5. Transfere-se, cuidadosamente, 700 µl do sobrenadante da amostra² que havia sido centrifugada no passo 3 para o *eppendorf* que contenha Fenol;
6. Coloca-se a amostra no vortex durante 5 minutos e centrifuga-se novamente a 10000xg durante 5 minutos;
7. Pipeta-se para um novo *eppendorf*, 350 µl de clorofórmio;
8. Pipeta-se 350 µl do sobrenadante;

¹ Pode ser necessário repetir este passo, isto é, voltar a pipetar 500 µl de Clorofórmio para um novo *eppendorf* juntamente com 500 µl do sobrenadante e centrifugar novamente a 14000xg durante 15 minutos. Esta alteração no procedimento deve-se ao facto de algumas amostras apresentarem matrizes mais complexas que as restantes, e deste modo, garantimos uma melhor purificação do ADN extraído.

² Em algumas amostras o volume pipetado do sobrenadante pode ser inferior ao descrito, por se tratar de amostras muito densas e não ser possível pipetar mais.

9. Coloca-se a amostra a vortexar e centrifuga-se a 10000xg durante 5 minutos. Este passo é repetido as vezes necessárias até termos uma interfase limpa;
10. Com a interfase limpa, recupera-se todo o sobrenadante para um *eppendorf*;
11. Pipeta-se 750µl de isopropanol a 6°C;
12. Incuba a -20° durante 30 minutos e centrifuga-se a 10000xg durante 5 minutos;
13. Retira-se todo o sobrenadante permanecendo apenas o *pellet* no *eppendorf*;
14. Lava-se o *pellet* com 500µl de etanol a 70°;
15. Centrifuga-se a 10000xg durante 5 minutos;
16. Descarta-se o sobrenadante e deixa-se secar o *pellet* ao ar durante 10 minutos;
17. Pipeta-se 100µl de tampão TE;
18. Armazenam-se as amostras extraídas a -20°C.

1.4.2. Medição da concentração de ADN e avaliação do grau de pureza

Cada amostra processada, por ambos os métodos, é quantificado o ADN e medido o grau de pureza da solução com recurso ao *NanoDrop One*, de onde são retirados dados como concentração em ng/µl e A₂₆₀/A₂₈₀.

A qualidade do ADN extraído é medida através do grau de pureza da amostra, dado que graus de pureza fora dos valores de referência indicam a presença de contaminantes na amostra, contaminantes esses que podem inibir a reação de PCR (3). Assim, se temos um rácio A₂₆₀/A₂₈₀ entre 1,8 e 2,0 é um indicador de que o ADN extraído está puro, valores acima deste intervalo pode indicar a presença de contaminantes (3).

1.4.3. Purificação de ADN

Algumas amostras, após o processo de extração de ADN, passam por um processo de purificação, com o objetivo de melhorar o grau de pureza.

Às amostras extraídas com recurso ao kit comercial, a seguir ao passo 11 são feitos alguns procedimentos extra:

1. Adiciona-se 350 µl de isopropanol frio;
2. Incuba durante 5 minutos a 4°C e centrifuga-se a 4200xg durante 10 minutos;
3. Descarta-se cuidadosamente o sobrenadante;
4. Pipeta-se 400 µl de etanol 70°, frio;
5. Coloca-se a amostra a vortexar e incuba durante 10 minutos a 4°C;
6. Centrifuga-se a 4200xg durante 10 minutos;
7. Remove-se o sobrenadante e junta-se 50 µl de *Buffer TE*.

Por fim, volta-se a armazenar nas condições referidas no passo 12.

Já as amostras extraídas pelo método manual, repete-se o passo 6 e de seguida são feitos alguns procedimentos extra:

1. Descarta-se o sobrenadante e ao *pellet* adiciona-se 200µl de isopropanol frio;
2. Centrifuga-se a 10000xg durante 5 minutos.
3. Descarta-se o sobrenadante;
4. Pipeta-se 200µl de fenol e 200µl de clorofórmio.

Recupera-se novamente o procedimento no passo 10 até ao final.

1.4.4. Amplificação e deteção dos alergénios pela técnica de qPCR

A reações de amplificação e deteção são realizadas através da tecnologia TaqMan® (*Applied Biosystems*), utilizando a técnica de qPCR.

São utilizados primers e sondas específicas para os alergénios que se querem estudar e para os respetivos controlos internos. O controlo interno mais comum para todas as amostras de origem vegetal é o gene 18S, enquanto se for de uma amostra de origem animal, o controlo interno mais utilizado é a miostatina, que se encontra presente no musculo esquelético.

As reações de amplificação decorrem em condições diferentes consoante o alergénio em estudo e o conjunto de primers/sondas que estão a ser utilizadas. A amplificação é detetada e analisada com recurso ao equipamento *CFX96 Deep Well™ Real-Time System* e através do software *Bio-Rad CFX Manager IDE* (versão 4.2.2500.1022).

2. Capítulo II

2.1. Introdução

2.1.1. Alergénios

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a Saúde Pública é “a arte e a ciência de prevenir a doença, prolongar a vida e promover a saúde através de esforços organizados da sociedade” (4). Assim, a segurança alimentar representa um papel importante dentro da Saúde Pública, uma vez que através da segurança alimentar que melhoramos a saúde humana e aumentamos a duração e qualidade de vida, já que contribui para a redução do número de patógenos, toxinas e outros contaminantes que possamos ingerir através da alimentação (5).

No que diz respeito à segurança alimentar, a legislação obriga os fabricantes de produtos alimentares a sinalizarem nos rótulos que os produtos contêm determinado alergénio ou determinado ingrediente que possa causar hipersensibilidade ou reação alérgica (6, 7).

Os alergénios alimentares são substâncias que provocam hipersensibilidade ou uma reação alérgica num indivíduo (8).

A hipersensibilidade é uma resposta exacerbada do nosso sistema imunitário a substâncias endógenas ou exógenas do nosso corpo. Esta processa-se de forma indevida promovendo um processo inflamatório ou causando uma lesão tecidual (9).

Por norma, pequenas quantidades de um alergénio, pode instigar uma cascata de reações imunológicas, normalmente mediadas pelas Imunoglobulinas E (IgE), e podem, em casos severos, levar à morte (6).

Os alergénios alimentares têm vindo a ser considerados fatores importantes da segurança alimentar, em particular, e da saúde pública, no geral, dado que a frequência de pessoas com reações de hipersensibilidade tem vindo a aumentar ao longo do tempo, a nível mundial (10, 11). Este aumento ainda não é totalmente compreendido. Contudo, são referidos fatores ambientais, tais como estilo de vida, poluição e até mesmo a dieta, como importantes responsáveis (10). Para além disso, também a produção de novos alimentos, pela indústria alimentar, pode estar associada a estes aumentos de hipersensibilidade, já que introduzem nas formulas novos conservantes, aromas e até mesmo antiácidos, sobre os quais se desconhece até que ponto influenciam estas reações adversas (10).

As reações adversas aos alimentos podem ser classificadas em diferentes grupos com base nas vias de sinalização em que estes atuam, como se pode observar na Figura 1.

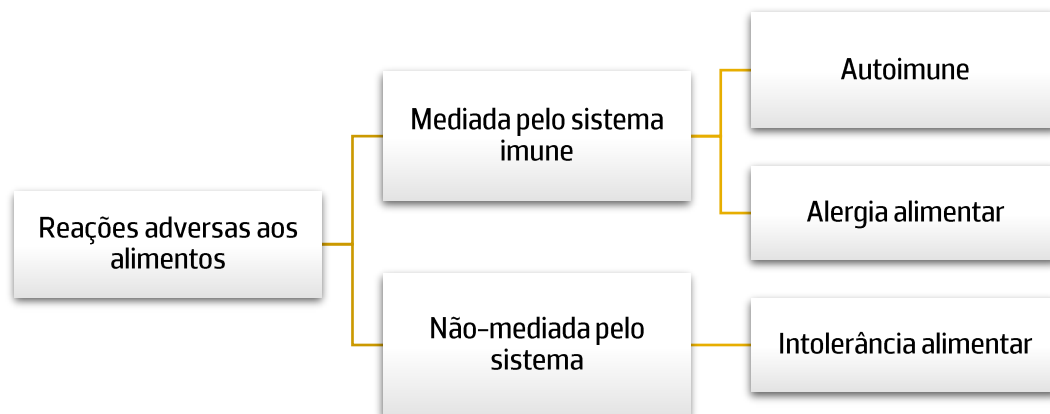


Figura 1 – Classificação das reações adversas aos alimentos. (Adaptado de (6))

Estas reações adversas aos alimentos subdividem-se em dois grandes grupos, as mediadas pelo sistema imune, onde se incluem as autoimunes e as alergias alimentares (12); e as não-mediadas pelo sistema imune, que estão associadas às intolerâncias alimentares, também conhecidas por hipersensibilidades (12-14).

Nas reações de carácter autoimune, o indivíduo já nasce com uma predisposição genética para a doença, como é o caso da doença celíaca (reação adversa autoimune associada à ingestão de glúten) (15).

As alergias alimentares, resultam de uma resposta mediada pelo sistema imune que, por sua vez, recorre a anticorpos IgE, a mecanismos celulares ou ambos (14). As alergias alimentares medidas por IgE são as que possuem um início rápido de reações graves, uma vez que são capazes de afetar vários sistemas ou órgãos, e a gravidade da reação varia desde leve, como é o caso de urticária, a muito grave como a anafilaxia (6). Por outro lado, as alergias alimentares mediadas por mecanismos celulares, como os linfócitos T e citocinas inflamatórias (16), possuem um início mais tardio e costumam afetar apenas o trato gastrointestinal, contudo, pode provocar tanto doença subaguda como crónica, por exemplo enteropatia resultante do leite de vaca (6).

Outras doenças como esofagite eosinofílica e gastroenterite eosinofílica, são muitas vezes classificadas como alergias alimentares mediadas por mecanismos celulares e, na realidade, podem ser mediadas por ambos, mecanismos celulares e IgE (17).

As intolerâncias alimentares, resultam de uma resposta não-mediada pelo sistema imune (17), onde se inclui deficiências enzimáticas, resposta a agentes infecciosos/tóxicos ou ingestão de substâncias quimicamente tóxicas (18). É exemplo o caso da intolerância à lactose, em que o organismo é incapaz de digerir o açúcar lactose, provocando mal-estar abdominal e diarreia (19). Neste caso, a lactose não é um

alergénio, pelo que não se trata de uma resposta imunológica, ao contrário do que seria caso o indivíduo fosse alérgico à proteína do leite de vaca, este sim um alergénio (19).

Uma reação alérgica, para que ocorra, decorre em duas etapas. Na primeira etapa, tem de existir um primeiro contacto com o alergénio, após o qual o sistema imune gera anticorpos IgE específicos contra esse alergénio. Numa segunda etapa, quando o indivíduo é novamente exposto ao mesmo alergénio, desenvolve-se uma reação alérgica sintomática (16). As reações alérgicas sintomáticas, manifestam-se com sinais clínicos definidos que podem variar em gravidade e duração, e afetar diferentes órgão e sistemas (12, 20), como expresso na Tabela 1.

Tabela 1 - Características clínicas comuns da alergia alimentar. (Adaptado de (12))

Órgãos e sistemas	Manifestações clínicas
Pele	Dermatite atópica
	Prurido
	Angioedema
	Urticária
	Eritema
Trato gastrointestinal	Síndrome de alergia oral
	Náusea/vómito
	Doença de refluxo gastroesofágico
	Dor abdominal
	Diarreia
	Enteropatias
	Cólica infantil
	Prisão de ventre
Falha em prosperar	
Trato respiratório	Asma
	Rinite
	Tosse
	Estridor
Olhos	Conjuntivite
Generalizado (sistémico)	Anafilaxia (com todas as suas complicações, incluindo sintomas cardiovasculares e colapso generalizado)

Perante um espetro tão alargado de sintomatologias e consequências de uma reação alimentar adversa, questiona-se qual será o tratamento mais adequado para os indivíduos que são portadores destas hipersensibilidades ou alergias alimentares. Contudo, os tratamentos que existem nem sempre são eficazes e não se adequam a todos os indivíduos.

Várias terapias têm sido propostas e testadas ao longo dos tempos com o objetivo de induzir a estes indivíduos uma tolerância ao alergénio, entre elas a indução de tolerância oral específica, do inglês *Systemic oral tolerance induction* (SOTI); a Imunoterapia sublingual e outras abordagens imunoterapêuticas (21).

O SOTI que tem por base aumentar a dose mínima de ingestão, com o objetivo da redução do risco de sofrer reações alérgicas graves após ingestão inadvertida (22–24). Ou seja, o alimento começa por ser ingerido em doses muito baixas, as quais vão sendo aumentadas diariamente até chegar a uma dose que o organismo tolere sem causar qualquer tipo de reação alérgica (25). À medida que estas doses aumentam o organismo vai criando tolerância ao alergénio. Contudo, e apesar do sucesso em alguns casos, também se verificou que se o tratamento não for contínuo a percentagem de sucesso diminui consideravelmente (22).

A Imunoterapia sublingual, consiste na introdução de extratos de alergénios na mucosa oral, contudo, a longo prazo a adesão ao tratamento vai sendo diminuída e a faixa etária com mais sucesso é a pediátrica (26). Para além disso é uma terapia que está mais indicada para alergénios ambientais e raramente para alergias alimentares (27).

Neste contexto, o melhor tratamento é evitar o consumo do alergénio e fazer uma dieta à base da restrição, principalmente quando houver o risco de ingestão inadvertida (19, 28). O mesmo se estende a uma mãe a amamentar que sofra de hipersensibilidade ou reação alérgica, dado que os anticorpos que esta possui podem passar para à criança/lactente através da amamentação e, conseqüentemente, a criança/lactente poder ficar hipersensibilizado ou adquirir a alergia alimentar (29).

Dentro dos alergénios com maior prevalência em todo o mundo encontram-se o ovo, o leite, os cereais, o peixe e marisco, a mostarda, os frutos secos entre outros (11).

2.1.1.1 O impacto do processamento dos alimentos nos alergénios

O processamento dos alimentos começou desde cedo com a evolução da humanidade, de forma a preservar os alimentos por mais tempo (salga, secagem, defumação, entre outros). A formulação de alimentos tem como objetivo a criação de um produto de elevada complexidade que combina diferentes ingredientes, como por exemplo, pães, molhos e comida pré-confeccionada (30).

Contudo, o processamento de alimentos, pode suprimir, reduzir ou até aumentar o carácter alergénico dos alimentos, uma vez que, ao longo do processamento dos mesmos, estes sofrem vários tipos de hidrólise, aquecimento, alterações de pH, tratamentos físicos, uso de conservantes, como são utilizadas mais do que uma destas técnicas em simultâneo (30). Estes processos físicos e químicos são capazes de alterar a estrutura das proteínas alimentares de diferentes formas (31–34). Estas modificações estruturais,

conduzem a uma alteração das propriedades físico-químicas das proteínas alimentares, afetando a sua digestão gastrointestinal e, conseqüentemente, influenciando o seu carácter alergénico (34).

As alterações no carácter alergénico dos alimentos podem ser explicadas devido a alterações na estrutura e propriedade das proteínas alimentares, que nem sempre são totalmente conhecidas, tornando as investigações sobre o impacto do processamento de alimentos ainda mais complexas (30).

O processamento dos alimentos também provoca fragmentação de ADN, ou seja, compromete a integridade do ADN mesmo antes da sua extração, o que pode dificultar a sua deteção e, conseqüentemente, a deteção do alergénio (30).

Para além disso, a produção em massa de produtos finais complexos, pode originar contaminações cruzadas entre matérias-primas, linhas de produção, bem como equipamentos, fazendo com que determinado alergénico esteja presente nos alimentos, mesmo que o ingrediente não se encontre presente (35, 36).

2.2. Métodos de deteção de alergénios

Para que ocorra uma correta rotulagem dos produtos, tem também de haver métodos confiáveis para a deteção e quantificação de alergénios. Ao longo dos tempos, com os avanços tecnológicos, têm sido desenvolvidos vários métodos para a deteção dos mesmos. Contudo, a escolha do método está diretamente ligada ao alergénio que queremos detetar e à matriz onde o mesmo se encontra, dado que nenhum método, por si só, responde a todas as necessidades (6).

Os métodos de deteção variam na sua sensibilidade e especificidade analítica. Quando falamos de sensibilidade, o que se pretende é que sejam analisados em simultâneo o maior número de alergénios possíveis. Já quando nos referimos a especificidade, o que se pretende é detetar um alergénio em específico. Os crustáceos são bom exemplo, já que onde existe um ou mais alergénios específicos para cada espécie, se utilizarmos um método altamente sensível mas inespecífico, vamos detetar todos os alergénios de todas as espécies, por outro lado, se utilizarmos um método altamente específico vamos apenas detetar um alergénio característico de uma só espécie de crustáceos (37).

Por norma, métodos altamente sensíveis, visam a deteção de ADN do alimento que contém o alergénio (análise indireta), já os métodos altamente específicos, visam a deteção da(s) proteína(s) presente(s) no alergénio (análise direta) (6).

2.2.1. Métodos baseados no ADN

Os métodos baseados no ADN recorrem à técnica de PCR com o objetivo de detetar e amplificar um fragmento específico de ADN característico de determinado alergénio (6). Estes métodos têm como principal limitação o facto de não detetarem o alergénio em si, mas sim genes característicos do organismo/espécie de onde o alergénio é originário (38).

Por norma, realiza-se a pesquisa de sequências específicas do gene citocromo c oxidase (COI), designadas por *barcodes* de ADN (39). *Barcodes* são um sistema de “códigos de barras” do ADN que foi criado de forma a facilitar a taxonomia do reino animal, com base na alta diversidade da subunidade 1 do citocromo c oxidase (COI) (40). O COI é um gene mitocondrial altamente diversificado entre espécies, daí o seu carácter identificativo(39).

Podem ainda ser pesquisados variações em genes nucleares como, por exemplo, o 18S rRNA, ou o gene que codifica a miostatina, proteína responsável pela limitação do crescimento do tecido muscular. Contudo, a utilização de genes nucleares é, na sua maioria, menos eficaz que os genes mitocondriais, como *barcodes*, devido ao baixo carácter identificativo dado que a taxa de mutação é inferior (39).

2.2.1.1 Etapas de validação para a implementação de um método baseado no ADN

Qualquer que seja o método que queiramos implementar em um laboratório, este tem de ser validado previamente (41). Para isso tem de ser avaliados critérios de desempenho como sensibilidade, especificidade, repetibilidade e reprodutibilidade.

Para estudarmos a sensibilidade e especificidade do método temos de calcular os limites de deteção, do inglês, *Limit of Detection* (LOD) e avaliar a especificidade e seletividade do conjunto de primers/sondas selecionadas (41).

- I. Especificidade do conjunto primers/sondas – são usadas amostras geneticamente próximas à amostra alvo. Na reação de PCR só deve ser detetado e amplificado a amostra alvo (42).
- II. Seletividade do conjunto de primers/sonda – tem como objetivo detetar a presença de inibidores da reação de PCR. São utilizados controlos positivo, isto é, amostras cujo fragmento de ADN que queremos detetar está presente na mesma, caso não ocorra amplificação desta amostra podemos afirmar que existe na mix algum inibidor da reação de PCR (42).
- III. LOD – tem como finalidade calcularmos a quantidade mínima que conseguimos detetar. São utilizadas diluições em série e é usada a diluição mais alta onde obtivemos amplificação da amostra alvo como base para o cálculo do LOD. As diluições em série podem ainda ser usadas para medir a eficiência de amplificação de PCR, utilizando dados com linearidade e inclinação (41, 42).

A repetibilidade do método mede a concordância entre réplicas de uma amostra dentro do mesmo laboratório, isto é, fazemos várias corridas de PCR com a mesma amostra e o resultado nunca deve variar muito de corrida para corrida (42).

A reprodutibilidade do método é último teste de validação antes da implementação do mesmo e consiste em medir a consistência dos resultados dos testes com ensaios realizados em diferentes laboratórios tendo por base alíquotas da mesma amostra (42).

2.2.2. Métodos não-baseados no ADN

Os métodos não-baseados no ADN são métodos imunológicos ou físico-químicos que visam a análise/deteção das proteínas causadoras de hipersensibilidade (6).

O método mais antigo é o de testes cutâneos, que visa correlacionar sintomas clínicos com o exame físico (apresenta ou não reação na pele) (43). Contudo, por se tratar de um método muito pouco específico, outros foram-se desenvolvendo, tais como a espectrometria de massa, *radio-allergosorbent test* (RAST), *enzyme allergosorbent test* (EAST), *rocket immuno-electrophoresis* (RIE) e *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (38). Destes vários métodos, o mais utilizado na indústria alimentar é o método ELISA pela sua alta especificidade e por permitir uma quantificação do alergénio (37). Já a espectrometria de massa é mais utilizada quando se pretende confirmar e principalmente quantificar o alergénio, apesar de não ser tão específica quando a ELISA (6).

2.3. Os alergénios estudados

Sendo os alergénios alimentares muito variados, neste estudo decidimos estudar os crustáceos, por serem um dos grupos com maior prevalência no que diz respeito a provocar reação alérgica. Decidimos, também, estudar a mostarda, em particular, a mostarda preta por ser a mais consumida na Europa e por se tratar de um alergénio que se encontra muitas vezes oculto nos rótulos das embalagens, colocando em risco a saúde do consumidor.

2.3.1. Mostarda

A planta mostarda pertence à família *Brassicaceae*, e são conhecidas três espécies diferentes, a mostarda branca (*Sinapis alba* L.), a mostarda preta (*Brassica nigra* L.) e a mostarda castanha/oriental (*Brassica juncea* L.) (44). Contudo, a espécie *Brassica juncea*, mais conhecida por mostarda castanha, descende diretamente da espécie *Brassica nigra*, mais conhecida por mostarda preta (45). Uma vez que estas duas espécies são geneticamente muito semelhantes, ao longo deste trabalho, vamos considerar que existem apenas duas espécies de mostarda, a mostarda branca e a mostarda preta.

As sementes da mostarda são muito usadas na culinária e nos alimentos processados, e a sua ingestão varia muito com os diferentes hábitos de consumo a nível mundial. A mostarda está, normalmente, presente em pratos de carne, como hamburgers ou cachorros-quentes, mas também encontramos mostarda em molhos, temperos e muitas vezes oculta em outros alimentos (46).

A mostarda branca é muito usada na culinária do norte de América, já a mostarda preta encontra-se muito na Europa, na China e na Índia (6).

Da família *Brassicaceae* também fazem parte outras hortícolas como o repolho, couve-flor, rabanetes e brócolos. Contudo é raro existir uma hipersensibilidade cruzada entre as espécies desta família (47).

Alergia à mostarda representa 1,1% das alergias alimentares nas crianças e cerca de 6-7% em todas as alergias alimentares (44). Apesar de a alergia à mostarda não ser tão prevalente como outros alergénicos, pessoas com sensibilidade a este alergénio podem sofrer uma reação alérgica severa e o risco de anafilaxia é elevado, sendo necessário, nestes casos, tratamento médico urgente (44).

Quanto maior é o consumo, existe uma maior probabilidade de desenvolvimento de hipersensibilidade. Países como a França, em que o consumo de mostarda é superior ao resto da Europa, a mostarda é a quarta causa de alergia alimentar (48).

A mostarda é também muito utilizada como ingrediente oculto em muito alimentos processados e pode ainda ser usada em aromatizantes que, por norma, têm presentes alimentos como mostarda, paprica, gengibre, orégãos e alho (44). Desta forma, a mostarda quando usada como ingrediente oculto, encontra-se em reduzidas quantidades, que podem ser indetetáveis mas causar reações, de leves a graves, em indivíduos com hipersensibilidade (44).

Torna-se difícil, para os indivíduos com hipersensibilidade evitarem a ingestão de alergénicos, dado que podem ocorrer de forma não intencional, devido a rotulagens enganosas, contaminações cruzadas e até listagem de artigos com termos vagos (49); um exemplo é que a mostarda pode estar presente pelo simples facto de o rótulo dizer “especiarias” (47).

A mostarda contém cinco principais moléculas responsáveis pelo seu carácter alergénico. Estas moléculas e as respetivas espécies encontram-se representadas na Tabela 2. Como se pode observar, a espécie que apresenta mais alergénios é a *Sinapis alba*, mais comumente conhecida por mostarda branca, assim pode concluir-se que a espécie que possui um maior carácter alergénio é a mostarda branca.

Tabela 2 – Alergênios da mostarda

Nº	Alergénio	Espécie
1	Sin a 1	Sinapis alba
2	Sin a 2	Sinapis alba
3	Sin a 3	Sinapis alba
4	Sin a 4	Sinapis alba
5	Bra j 1	Brassica juncea

A maior parte dos alergénios da mostarda são resistentes ao calor, apenas a molécula Bra j 1 é desnaturada a 82°C (50). A resistência ao calor pode ser explicada por interações moleculares que são estabelecidas com outros constituintes da matriz alimentar, formando uma estrutura mais estável (51). Além disso, as proteínas da mostarda são, também, resistentes à digestão gástrica e intestinal (52). Apenas a conjugação do processamento térmico e físico é capaz de suprimir o poder alergénico das sementes da mostarda (44).

Não existem tratamentos preventivos para a alergia à mostarda. Por esta razão, os indivíduos com hipersensibilidade devem evitar o consumo da mesma (53), embora se encontre muitas vezes oculta nos alimentos (47).

2.3.2. Crustáceos

O marisco e, em particular, os crustáceos, são uma das maiores causas de alergia alimentar (35); são responsáveis por reações de hipersensibilidade e causam anafilaxia com muita frequência (54). Dentro dos crustáceos, o camarão, o caranguejo e a lagosta, são os principais alimentos responsáveis por causar uma reação alérgica (35). As reações alérgicas são manifestadas após um contacto com o alergénio e este pode ser por ingestão, inalação ou contacto direto (provocando dermatites de contacto) (55, 56); sendo a ingestão que provoca um maior número de sintomas (35).

Ao contrário da mostarda, os crustáceos não são muitas vezes encontrados como ingredientes ocultos, mas os seus alergénios podem estar presentes nos alimentos, mesmo que o ingrediente não se encontre presente, devido a contaminações cruzadas (35). Em simultâneo, continuam a existir erros e omissões nas rotulagens dos artigos, o que se torna perigoso para o indivíduo com hipersensibilidade (57).

Os crustáceos possuem inúmeros alergénios cuja sua grande maioria apresenta resistência ao calor (6). Contudo, quando os crustáceos passam por mais de um tipo de processamento, alguns dos seus alergénios, perdem ou enfraquecem o seu poder alergénico (6).

À semelhança da mostarda, o melhor tratamento, para prevenir uma possível reação fatal, é evitar o consumo destes alergénios (35, 57).

2.4. Objetivo

Adaptar e implementar um método de deteção de alergénios da mostarda preta e de crustáceos, em amostras de alimentos, com diferentes graus de processamento.

A finalidade deste método é detetar a presença dos alergénios da mostarda preta e dos crustáceos em amostras de alimentos, de forma a obtermos um método que possa ser implementado na rotina do laboratório.

2.5. Materias e Métodos

2.5.1. Seleção das amostras

Para a realização deste trabalho experimental, foram analisadas amostras quer de mostarda preta, quer de crustáceos. Em relação à mostarda preta, como amostra pura foi utilizada a mostarda em grau e como matriz mais complexa, molho de mostarda dijon com 28% de mostarda preta na sua composição. Para os crustáceos como amostra pura foi utilizado camarão cru e sapateira e como matrizes mais complexas foram utilizados rissóis de camarão de cinco fornecedores diferentes e delícias de mar que continham 4,3% de caranguejo na sua composição.

Neste trabalho foram ainda utilizadas amostras de várias espécies de peixes (garoupa, cachupo, pota, verдинhos, faneca, robalo e dourada) todas eles crus, com o objetivo de verificar de existia alguma reatividade cruzada com os crustáceos.

As amostras foram obtidas através do sistema de recolha de amostras da Biogerm SA.

2.5.2. Extração de ADN

A extração de ADN genómico das amostras utilizadas neste estudo foi feita com recurso ao kit comercial da QIAGEN®, *DNeasy® mericon® Food Handbook*, seguindo as indicações do fabricante, descritas no ponto 1.4.1.1 do presente trabalho.

2.5.3. Medição da concentração de ADN e avaliação do grau de pureza

Para cada amostra processada foram quantificadas as concentrações do ADN extraído em ng/ μ l e o rácio entre A_{260}/A_{280} de forma a apurarmos o grau de pureza do ADN extraído, com recurso ao *NanoDrop One*.

2.5.4. Amplificação e deteção da mostarda preta e dos crustáceos pela técnica de qPCR

As reações de amplificação e deteção foram realizadas através da tecnologia TaqMan® (*Applied Biosystems*), utilizando a técnica de qPCR.

Foram utilizados, respetivamente, primers e sondas específicas para a mostarda preta (58), e para os crustáceos (8, 57). Como controlo negativo foi utilizado um branco, com o objetivo de assegurar que a Mix utilizada para a reação de PCR não tem qualquer tipo de contaminação. As reações de amplificação, que preferiam um volume de reação final de 25 μ l/poço, continham 12,5 μ l de Taqman Universal Master Mix, 5 μ l de ADN, os respetivos *primers* e sondas, quer dos controlos, quer da mostarda e dos crustáceos, conforme os volumes apresentados na Tabela 3 e quando necessário água desionizada para prefazer o

volume. As condições de amplificação basearam-se na ativação da Taq ADN Polimerase a 50°C por 2 minutos e de 95°C durante 5 minutos, seguindo-se 45 ciclos de 95° por 15 segundos para desnaturação e de 55° durante 1 minuto para emparelhamento dos primers e extensão. A amplificação foi detetada e analisada com recurso ao aparelho CFX96 Deep Well™ Real-Time System e através do software Bio-Rad CFX Manager IDE (versão 4.2.2500.1022).

Tabela 3 - Sequencias de Primes e Sondas utilizadas, bem como os volumes pipetados para cada poço em µl.

Primer/Sonda	Sequencia 5'- 3'	Tamanho de amplificação (pb)	Volume por poço (µl)
Mostarda Preta (58)			
Primer 11 forward	GTT GAG CCG AGG GTC ATA ATT TC	76	0,5
Primer 11 reverse	TCG ACT TAG GCA TCC TTA CGG		0,75
Sonda 11	CGA GAG TCC GAA TAC TGG GCT GGG GTC		0,4
Crustáceos (8, 57)			
Primer Crust forward	TAA AGT CTG GCC TGC CCA	205	2,25
Primer Crust reverse	GCT TTA TAG GGT CTT ATC GT		2,25
Sonda Crust	HEX – TGC TAC CTT IGC ACG GTC A-BHQ1(LNA)		0,625

2.5.5. Etapas de validação do método realizadas

A implementação deste método no laboratório teve como base em métodos já validados (8, 57, 58). Contudo, testamos alguma etapa de validação do mesmo, como LOD, especificidade e repetibilidade.

O LOD e eficiência de amplificação foram testados com recurso a diluições em série, quer para a mostarda, quer para os crustáceos (amostras puras). Para o cálculo do LOD é de realçar que, conforme descrito acima, para cada poço de reação foram pipetados 5µl de ADN logo, temos de ter em conta que a concentração da amostra mais diluída detetada terá de ser multiplicada por 5 para chegarmos à quantidade de ADN mínima do alergénio que estamos a estudar.

A especificidade do conjunto de primers/sondas selecionadas foi testada apenas para os crustáceos, onde foram utilizadas as amostras de várias espécies de peixes de forma a garantir que não existia reatividade cruzada.

Por último, a repetibilidade do ensaio foi analisada realizando cinco corridas de PCR com a diluição em série maior de cada alergénio e verificando se os Cts das corridas tinham valores aproximados.

2.5.6. Análise estatística

O tratamento de dados foi realizado através de uma análise estatística descritiva e testou-se a relação e a correlação entre os métodos (r^2). Todos os dados foram sistematizados no programa Microsoft Office Excel® 2013 e os resultados apresentados em tabelas e gráficos.

2.6. Resultados

2.6.1. Mostarda preta

As amostras estudadas da mostarda preta obtiveram uma concentração e grau de pureza representado na Tabela 4.

Tabela 4 - Grau de pureza e quantidade de ADN isolado das amostras de mostarda preta.

	Quantidade de ADN extraída (ng/ μ l)	Grau de pureza (A_{260}/A_{280})
Mostarda preta em grão	41,5	1,86
Molho mostarda Dijon	4,3	2,27

A eficiência de amplificação e LOD foram comprovados com extratos de mostarda preta diluídos em série (1:100, 1:1000, 1:5000, 1:10000). Na Tabela 5 podemos verificar os Cts correspondentes para cada diluição em série.

Tabela 5 - Diluições em série da amostra mostarda preta em grão e respectivos Cts.

Diluições em série	1:100	1:1000	1:5000	1:10000
Cts	29,9	30,7	32,6	34,3

A repetibilidade do ensaio de PCR foi investigada analisando extratos de mostarda preta em série e foram realizadas cinco corridas de PCR, cujos dados estão apresentados na tabela 6 e mostram a repetibilidade do método.

Tabela 6 - Repetibilidade do método de PCR na concentração de ADN da mostarda preta perto do LOD (diluição 1:10000).

Nº Repetições	Ct	Média \pm desvio padrão dos Ct
Ensaio 1	35,6	36,2 \pm 0,7
Ensaio 2	35,7	
Ensaio 3	35,6	
Ensaio 4	37,0	
Ensaio 5	37,0	

A análise de extratos de ADN de mostarda preta diluídos em série (concentração de ADN inicial de 41,5 ng/ μ L) mostrou linearidade até uma concentração de 4,2 pg/ μ L (correspondente ao fator de diluição 1:10000) (Figura 2). O coeficiente de correlação (r^2) da curva padrão foi de 0,9185. Considerando que os replicados da amplificação com 20,8 pg de ADN amplificaram a 100%, o LOD será inferior a 20,8 pg de ADN de mostarda preta.

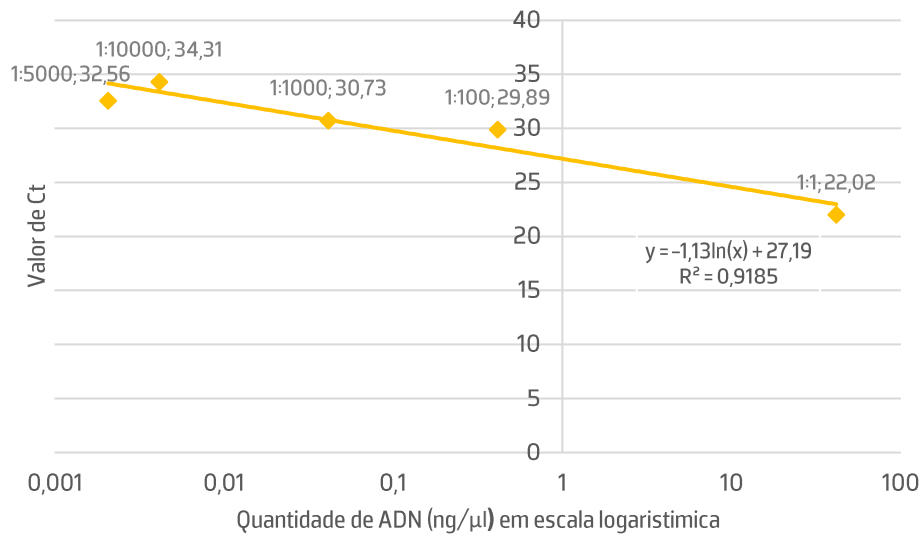


Figura 2 – Curvas padrão obtidas por amplificação de ADN extraído de mostarda preta.

De forma a investigar a aplicabilidade do método PCR, foi analisada uma amostra de um alimento processado (Molho de mostarda Dijon). Esta amostra apresenta uma curva de amplificação, com um Ct de 22,3 (Figura 3).

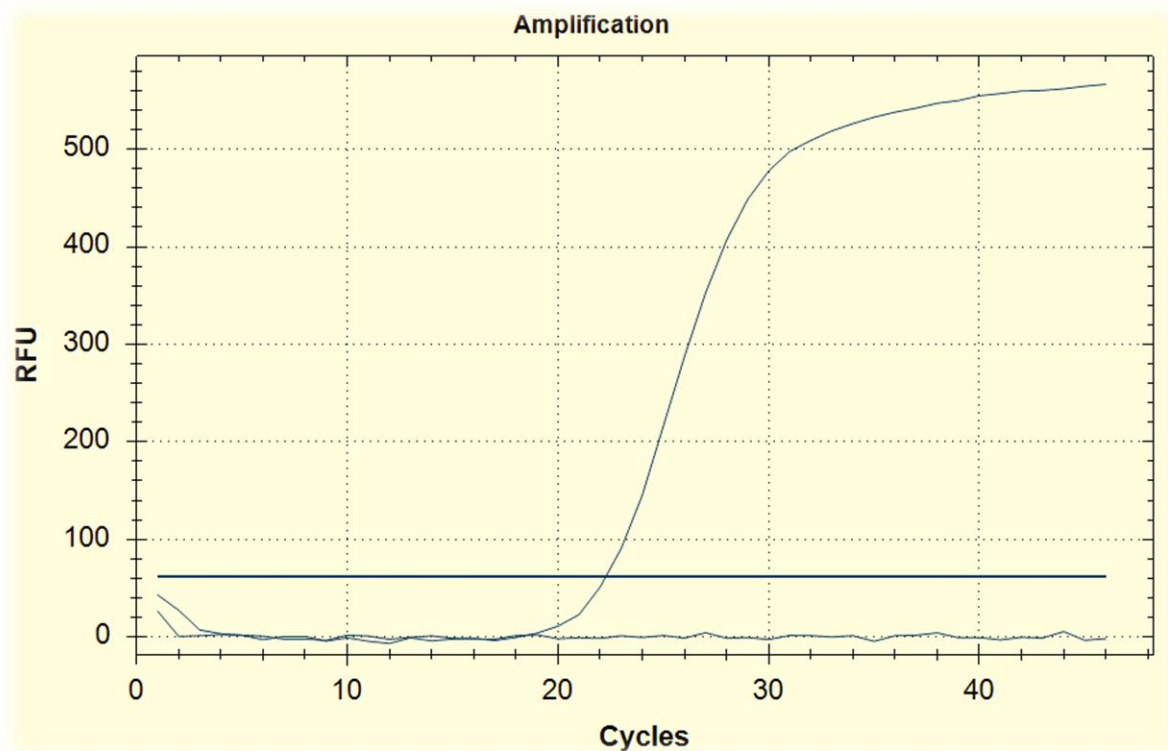


Figura 3 – Curva de amplificação obtida com mostarda Dijon e respetivo controlo negativo.

2.6.2. Crustáceos

As amostras estudadas de crustáceos obtiveram uma concentração e grau de pureza representado na Tabela 7.

Tabela 7 – Grau de pureza e quantidade de ADN isolado das amostras de crustáceos.

	Quantidade de ADN extraída (ng/ μ l)	Grau de pureza (A_{260}/A_{280})
<i>Camarão cru</i>	51,0	1,85
<i>Rissol de camarão A</i>	13,1	1,84
<i>Rissol de camarão B</i>	13,3	1,9
<i>Rissol de camarão C</i>	22,1	1,82
<i>Rissol de camarão D</i>	26,1	1,79
<i>Rissol de camarão E</i>	20,5	1,88
<i>Sapateira</i>	21,0	1,74
<i>Delícias do mar</i>	19,7	1,99

Em relação à especificidade do conjunto primers/sonda utilizadas podemos afirmar que estes são altamente específicos, dado que foram feitos testes de reatividade cruzada com outras espécies de peixes, a lista dos peixes utilizados encontra-se na Tabela 8 e os resultados do PCR podem ser confirmados na Figura 4.

Tabela 8 – Espécies de peixes testadas com a finalidade de verificar se existia alguma reatividade cruzada com os crustáceos e respetiva quantidade de ADN isolado, grau de pureza e Cts.

Espécies testadas	Quantidade de ADN extraída (ng/ μ l)	Grau de pureza (A_{260}/A_{280})	Ct
Sapateira	21,0	1,74	16,6
Delícias do mar	19,7	1,99	27,4
Garoupa	8,7	2,42	-
Cachupo	18,1	2,08	-
Pota	18,3	2,03	-
Verdinhos	26,8	2,01	-
Faneca	28,4	2,04	-
Robalo	9,2	2,49	-
Dourada	34,2	1,98	-

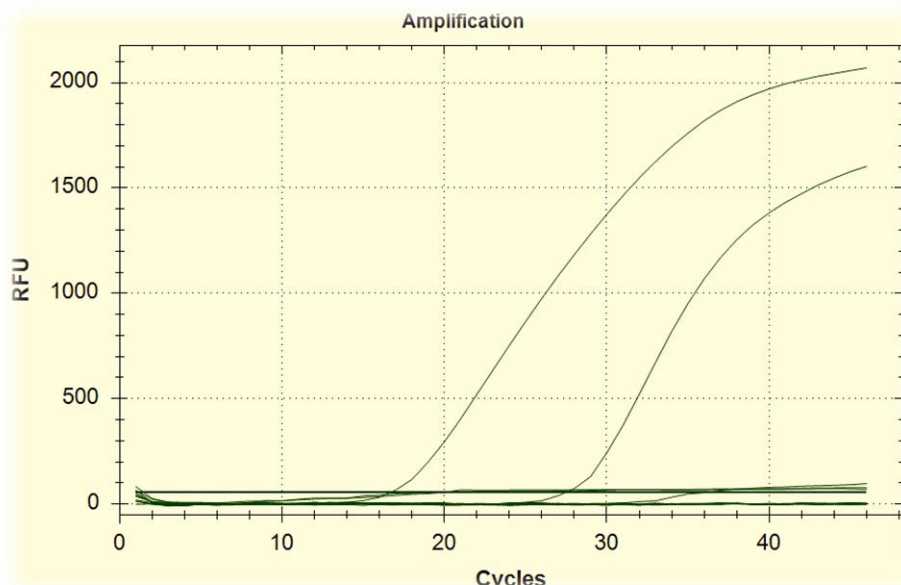


Figura 4 - Curvas de amplificação obtidas no teste de reatividade cruzada.

Como se pode verificar nas curvas de amplificação acima, apenas foi amplificada a amostra de sapateira com um Ct de 16,6 e a amostra de um alimento processado (Delícias do mar) com um Ct de 27,4, que conforme se pode verificar pelo rótulo da embalagem na Figura 5, estas contêm caranguejo na sua composição. Todas as restantes espécies testadas não apresentaram qualquer amplificação.

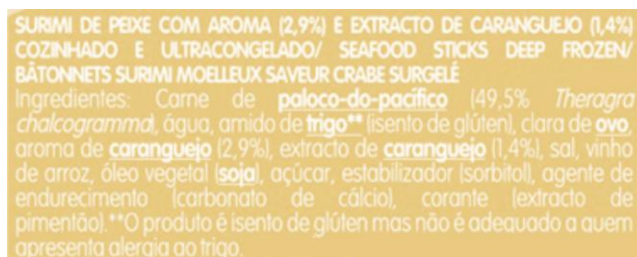


Figura 5 - Rótulo do alimento processado utilizado (Delícias do mar)

A eficiência de amplificação e LOD foram comprovados com extratos de camarão diluídos em série (1:10, 1:100, 1:1000, 1:5000, 1:10000). Na Tabela 9 podemos verificar os Cts correspondentes para cada diluição em série.

Tabela 9 - Diluições em série da amostra camarão cru e respetivos Cts.

Diluições em série	1:10	1:100	1:1000	1:5000	1:10000
Cts	24,4	28,1	31,3	33,8	33,4

A repetibilidade do ensaio de PCR foi investigada analisando extratos de camarão diluídos em série e foram realizadas cinco corridas de PCR, expressos na Tabela 10 mostram a alta repetibilidade do método.

Tabela 10 – Repetibilidade do método de PCR na concentração de ADN dos crustáceos perto do LOD (diluição 1:10000).

Nº Repetições	Ct	Média ± desvio padrão dos Ct
Ensaio 1	32,6	32,1 ± 1,3
Ensaio 2	31,7	
Ensaio 3	32,7	
Ensaio 4	33,4	
Ensaio 5	30,0	

A análise de extratos de ADN de camarão diluídos em série (concentração de ADN inicial de 51 ng/μL) mostrou linearidade até uma concentração de 5,1 pg/μL (correspondente ao fator de diluição 1:10000) (Figura 6). O coeficiente de correlação (r^2) da curva padrão foi de 0,9557. Considerando que os replicados da amplificação com 25 pg de ADN amplificaram a 100%, o LOD será inferior a 25 pg de ADN de crustáceos.

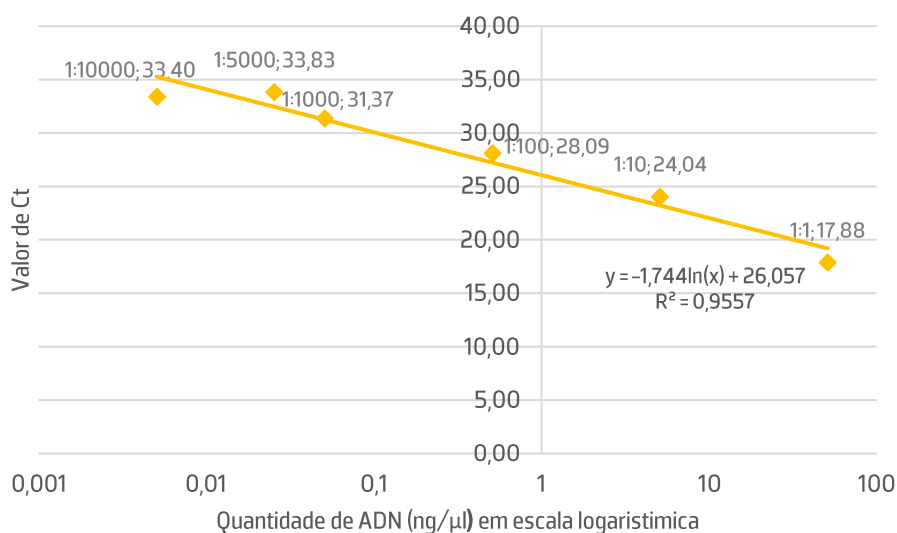


Figura 6 – Curvas padrão obtidas por amplificação de ADN extraído de crustáceos.

De forma a investigar a aplicabilidade do método PCR, foram analisados rissóis de camarão de cinco fornecedores diferentes. Para todas as amostras foram obtidos valores semelhantes de Ct, como se pode observar na Figura 7.

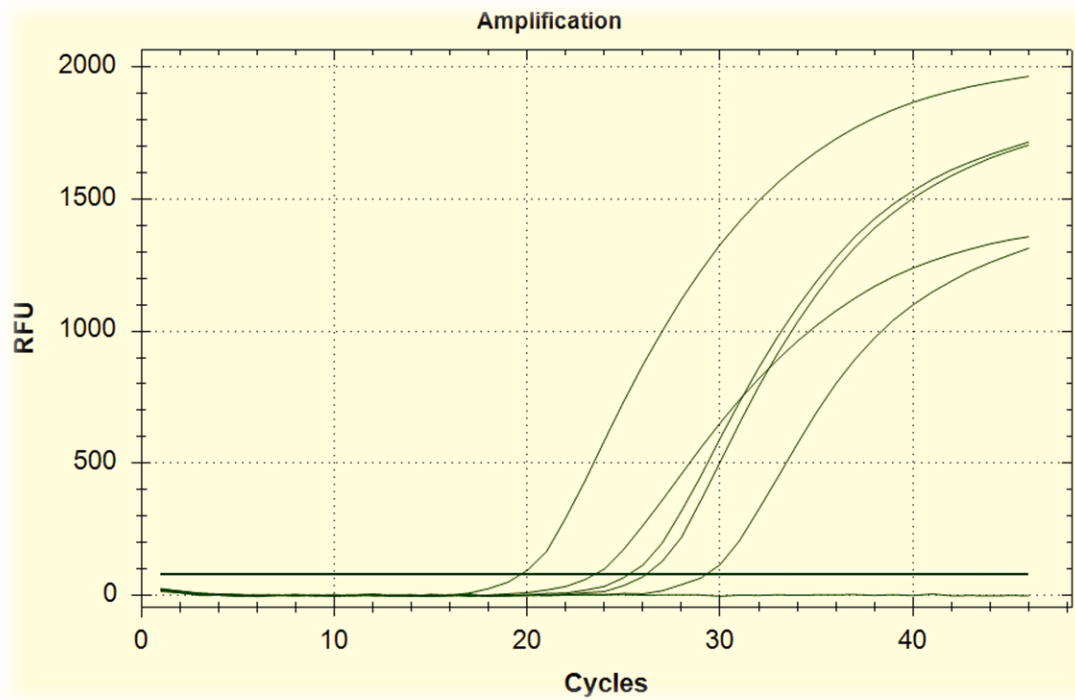


Figura 7 - Curvas de amplificação obtidas com os rissóis dos vários fornecedores.

2.7. Discussão

O processamento dos alimentos é algo bastante complexo e pode influenciar, de várias formas, o carácter alergénio do produto final (30, 34). Estas alterações do carácter alergénio podem ser explicadas devido a alterações na estrutura e propriedades das proteínas alimentares (30) ou, ainda, devido a contaminações cruzadas decorrentes das produções em massa de produtos finais (35).

Com o desenvolvimento, cada vez mais industrial, de alimentos processados e, por consequência, com matrizes mais complexas, torna-se, por vezes, desafiante a deteção dos alergénios, quer seja com a finalidade de combater fraudes nas rotulagens quer para evitar reação de hipersensibilidade devido a um consumo não informado. Foi com o objetivo de colmatar estas questões que os métodos de deteção de alergénios, quer seja os baseados no ADN, quer os não-baseados no ADN, foram desenvolvidos. E, como já vimos anteriormente, a escolha do método está diretamente ligada ao alergénio em estudo e à matriz onde o mesmo se encontra (6).

Neste estudo foi utilizado um método baseado no ADN para deteção dos alergénios, uma vez que se trata de um método mais sensível, ainda que seja uma análise indireta pelo facto de detetar o ADN do alimento que contém o alergénio e não o alergénio em si (38).

Para que haja a deteção do alergénio, com recurso a métodos baseados no ADN, é necessário, primeiramente, realizar a extração do ADN o mais intacto e puro possível, de forma que este possa ser posteriormente detetado e quantificado (2).

O grau de pureza do ADN extraído está relacionado, fundamentalmente, com a incapacidade que o método de extração tem de eliminar estas proteínas, lípidos e outros contaminantes presentes na amostra.

Em relação ao grau de pureza das amostras de mostarda preta, podemos afirmar que obtemos um ADN da mostarda em grão puro ($A_{260}/A_{280}=1,89$), já o ADN obtido do molho de mostarda Dijon encontra-se acima do recomendado para amostras consideradas puras ($A_{260}/A_{280}=2,27$) (3). Este resultado pode ser justificado pela presença de lípidos na composição da amostra que são de difícil remoção durante o processo de extração do ADN. Para além disso é de realçar que nesta amostra a quantidade de ADN extraído foi mais baixo ($4,3 \text{ ng}/\mu\text{l}$) o que pode ser explicado pelo facto de se tratar de uma amostra com uma matriz complexa e a própria amostra (molho de mostarda Dijon) conter apenas 26% de mostarda na sua composição.

Em relação ao ADN extraído das amostras dos crustáceos podemos afirmar que todas elas apresentam um grau de pureza aproximado ao indicado como puro ($A_{260}/A_{280}\approx 1,8$) (3). Pequenas variações podem ser justificadas, à semelhança da mostarda preta, com a presença de algumas impurezas na amostra de difícil remoção, como é o caso das proteínas/lípidos.

Podemos ainda refletir sobre o grau de pureza do ADN extraído das amostras das diferentes espécies de peixes que foram utilizadas para testar a especificidade do método. O ADN resultante destas amostras apresenta um grau de pureza inferior. Isto pode ser devido ao facto de estas amostras apresentarem um alto teor proteico, não completamente eliminado com o processo de extração.

Os resultados deste estudo em relação à mostarda preta, sugerem que este método permite detetar e quantificar esta espécie de mostarda, mesmo em matrizes mais complexas, como o caso do molho de mostarda Dijon (Figura 3). Podemos também afirmar que se trata de um método sensível, já que conseguimos detetar com 100% de eficiência uma quantidade inferior a 20,8pg de ADN.

Relativamente aos crustáceos, podemos afirmar que este método permite uma deteção dos mesmos, dado que foram estudadas mais do que uma espécie e todas elas foram detetadas (Figura 4). Para além disso, estudamos ainda outros peixes e não obtivemos qualquer resultado de PCR o que prova a especificidade do método. Podemos, ainda, afirmar que se trata de um método sensível, uma vez que, conseguimos detetar com 100% de eficiência uma quantidade inferior a 25pg de ADN.

A principal limitação deste estudo encontra-se relacionada com a extração do ADN o mais intacto e puro possível, uma vez que um ADN livre de impurezas e contaminantes permite uma melhor amplificação sem que haja inibição da reação de PCR. Este facto é particularmente importante quando se analisam amostras processadas, onde a quantidade de interferentes/contaminantes pode ser relevante e condicionar a detetabilidade do método.

As técnicas implementadas foram adaptadas de artigos publicados (8, 57, 58) onde se encontra testada a especificidade dos primers/sondas utilizados. Neste trabalho, a especificidade da deteção de crustáceos foi verificada através do teste de várias outras espécies (Figura 5) comprovando o descrito no artigo (57).

No que diz respeito ao limite de deteção, foram efetuadas diluições sucessivas das amostras, tendo-se verificado que os replicados (cinco) efetuados para quantidades de 20,8pg de ADN e 25pg de ADN de mostarda preta e crustáceos, respetivamente, tiveram uma eficiência de amplificação de 100%. Estas quantidades estão adequadas às necessidades práticas de deteção do método. Assim sendo, o limite de deteção poderá ser considerado, para efeitos práticos, como inferior a estes valores.

O presente estudo poderá ter interesse no âmbito da Saúde Pública, uma vez que os alergénios estudados são dos mais prevalentes no que diz respeito a reações hipersensibilidade, sendo que, tanto a mostarda preta como os crustáceos, na maioria das vezes, provocam reações de hipersensibilidade severas colocando em risco a própria vida do consumidor (11). Com o aumento crescente das reações de hipersensibilidade, torna-se impreterível a deteção e quantificação destes alergénios nas mais variáveis matrizes de alimentos. Importa ainda realçar que a indústria alimentar aliada às novas tecnologias e formulações torna esta deteção e quantificação cada vez mais desafiante, quer do ponto de vista da

segurança alimentar, quer da fraude alimentar associada a rotulagens erradas que, muitas vezes, em prol de um benefício económico pode colocar em risco a vida do consumidor.

2.8. Conclusão

O aumento das reações de hipersensibilidade fez com que meios mais eficazes de deteção de alergénios fossem desenvolvidos, sempre com o objetivo de serem o mais sensíveis e específicos possível. Contudo ainda existem muitas limitações para ultrapassar.

Dado que matrizes mais complexas surgem e uma vez que é, cada vez mais, desafiante detetar o alergénio, torna-se imprescindível uma investigação contínua nesta área, na tentativa de acompanhar o desenvolvimento industrial e, assim, manter a segurança do consumidor.

Concluimos que apesar das limitações já mencionadas, os objetivos deste estudo, propostos inicialmente, foram cumpridos.

Os resultados deste estudo sugerem que é possível a correta deteção dos alergénios, mostarda preta/castanha e crustáceos, mesmo que estes se encontrem em baixas concentrações na matriz em análise. É de realçar que os resultados obtidos estão concordantes com a rotulagem das amostras estudadas pois, só desta forma, é garantida a segurança do consumidor. Assim, este estudo permitiu implementar este método de deteção de alergénios da mostarda preta e de crustáceos.

Este trabalho tem importância para a Saúde Pública dado que é através da segurança alimentar que asseguramos que existe uma redução do consumo de alergénios, por parte de indivíduos hipersensibilizados, contribuindo, desta forma, para uma melhor qualidade de vida. Como perspetivas futuras pretende-se aumentar o número de alergénios em estudo, testar amostras de mostarda branca, dado que apenas implementamos o método de deteção para a mostarda preta e, adicionalmente, poderá ser aprimorado o método de extração de forma a obter amostras, mais puras, para as matrizes mais complexas. Poderá ainda ser mais aprofundada a correlação que deve existir entre a presença do alergénio na amostra e a sua respetiva menção no rótulo do alimento.

Referências Bibliográficas

1. Biogerm – Laboratórios [Available from: <https://biogerm.pt/>].
2. Sajali N, Wong SC, Hanapi UK, Abu Bakar Jamaluddin S, Tasrip NA, Mohd Desa MN. The Challenges of DNA Extraction in Different Assorted Food Matrices: A Review. *J Food Sci*. 2018;83(10):2409–14.
3. Olson ND, Morrow JB. DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. *BMC Research Notes*. 2012;5(1):668.
4. World Health Organization 2022 [Public health services]. Available from: <https://www.euro.who.int/en/health-topics/Health-systems/public-health-services>.
5. Lehotay SJ. Food safety analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2018;410(22):5329–30.
6. Authority EFS. Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes. *EFSA Journal*. 2014;12(11).
7. Regulamento (UE) Nº 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de Outubro de 2011, (2011).
8. Santaclara FJ, Espineira M. Fast Real-Time PCR for the Detection of Crustacean Allergens in Foods. *Methods Mol Biol*. 2017;1620:163–71.
9. Dispenza MC. Classification of hypersensitivity reactions. *Allergy Asthma Proc*. 2019;40(6):470–3.
10. Allen KJ, Koplin JJ. The epidemiology of IgE-mediated food allergy and anaphylaxis. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2012;32(1):35–50.
11. Authority EFS. Literature searches and reviews related to the prevalence of food allergy in Europe. *EFSA Supporting Publications*. 2013;10(11):343.
12. Wasserman S, Watson W. Food allergy. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2011;7 Suppl 1:S7.
13. Dupont C. Food Allergy: Recent Advances in Pathophysiology and Diagnosis. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2011;59(s1):8–18.
14. Muraro A, Werfel T, Hoffmann-Sommergruber K, Roberts G, Beyer K, Bindslev-Jensen C, et al. EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines: diagnosis and management of food allergy. *Allergy*. 2014;69(8):1008–25.
15. Sampson HA. Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113(5):805–19; quiz 20.
16. Arosa FA, Cardoso EM, Pacheco FC. Resposta imunológica Adaptativa. In: LIDEL, editor. *Fundamentos de Imunologia*. Lousã2012. p. 509–10.
17. Guandalini S, Newland C. Differentiating food allergies from food intolerances. *Curr Gastroenterol Rep*. 2011;13(5):426–34.
18. Arosa FA, Cardoso EM, Pacheco FC. Intolerância Alimentar. In: LIDEL, editor. *Fundamentos de Imunologia*. Lousã2012. p. 511–.
19. Boyce JA, Assa'a A, Burks AW, Jones SM, Sampson HA, Wood RA, et al. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: summary of the NIAID-Sponsored Expert Panel Report. *Nutrition*. 2011;27(2):253–67.
20. Sicherer SH, Leung DY. Advances in allergic skin disease, anaphylaxis, and hypersensitivity reactions to foods, drugs, and insects in 2010. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(2):326–35.
21. Nowak-Węgrzyn A, Sampson HA. Future therapies for food allergies. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(3):558–73; quiz 74–5.

22. Staden U, Rolinck-Werninghaus C, Brewe F, Wahn U, Niggemann B, Beyer K. Specific oral tolerance induction in food allergy in children: efficacy and clinical patterns of reaction. *Allergy*. 2007;62(11):1261-9.
23. Jones SM, Pons L, Roberts JL, Scurlock AM, Perry TT, Kulis M, et al. Clinical efficacy and immune regulation with peanut oral immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;124(2):292-300, e1-97.
24. Burks AW, Jones SM, Wood RA, Fleischer DM, Sicherer SH, Lindblad RW, et al. Oral Immunotherapy for Treatment of Egg Allergy in Children. *New England Journal of Medicine*. 2012;367(3):233-43.
25. Niggemann B, Staden U, Rolinck-Werninghaus C, Beyer K. Specific oral tolerance induction in food allergy. *Allergy*. 2006;61(7):808-11.
26. Alvaro-Lozano M, Akdis CA, Akdis M, Alviani C, Angier E, Arasi S, et al. Allergen Immunotherapy in Children User's Guide. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2020;31(S25):1-101.
27. Larenas-Linnemann D. Sublingual immunotherapy in children: complete and updated review supporting evidence of effect. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2009;9(2):168-76.
28. Eigenmann PA, Beyer K, Wesley Burks A, Lack G, Liacouras CA, Hourihane JO, et al. New visions for food allergy: an iPAC summary and future trends. *Pediatr Allergy Immunol*. 2008;19 Suppl 19:26-39.
29. Isolauri E, Tahvanainen A, Peltola T, Arvola T. Breast-feeding of allergic infants. *J Pediatr*. 1999;134(1):27-32.
30. Mills EN, Mackie AR. The impact of processing on allergenicity of food. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2008;8(3):249-53.
31. Lepski S, Brockmeyer J. Impact of dietary factors and food processing on food allergy. *Mol Nutr Food Res*. 2013;57(1):145-52.
32. Rahaman T, Vasiljevic T, Ramchandran L. Conformational changes of beta-lactoglobulin induced by shear, heat, and pH-Effects on antigenicity. *J Dairy Sci*. 2015;98(7):4255-65.
33. Yuan F, Lv L, Li Z, Mi N, Chen H, Lin H. Effect of transglutaminase-catalyzed glycosylation on the allergenicity and conformational structure of shrimp (*Metapenaeus ensis*) tropomyosin. *Food Chem*. 2017;219:215-22.
34. Khan MU, Ahmed I, Lin H, Li Z, Costa J, Mafra I, et al. Potential efficacy of processing technologies for mitigating crustacean allergenicity. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2019;59(17):2807-30.
35. Herrero B, Vieites JM, Espineira M. Fast real-time PCR for the detection of crustacean allergen in foods. *J Agric Food Chem*. 2012;60(8):1893-7.
36. Kirsch S, Fourdrilis S, Dobson R, Scippo M-L, Maghuin-Rogister G, De Pauw E. Quantitative methods for food allergens: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2009;395(1):57-67.
37. van Hengel AJ. Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. *Anal Bioanal Chem*. 2007;389(1):111-8.
38. Poms RE, Klein CL, Anklam E. Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Addit Contam*. 2004;21(1):1-31.
39. Eischeid AC. A method to detect allergenic fish, specifically cod and pollock, using quantitative real-time PCR and COI DNA barcoding sequences. *J Sci Food Agric*. 2019;99(5):2641-5.
40. Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, Dewaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*. 2003;270(1512):313-21.
41. Zucha D, Kubista M, Valihrač L. Tutorial: Guidelines for Single-Cell RT-qPCR. *Cells*. 2021;10(10):2607.

42. Toohy-Kurth K, Reising MM, Tallmadge RL, Goodman LB, Bai J, Bolin SR, et al. Suggested guidelines for validation of real-time PCR assays in veterinary diagnostic laboratories. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2020;32(6):802-14.
43. Patel G, Saltoun C. Skin testing in allergy. *Allergy Asthma Proc*. 2019;40(6):366-8.
44. Sharma A, Verma AK, Gupta RK, Neelabh, Dwivedi PD. A Comprehensive Review on Mustard-Induced Allergy and Implications for Human Health. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. 2019;57(1):39-54.
45. Paritosh K, Pradhan AK, Pental D. A highly contiguous genome assembly of *Brassica nigra* (BB) and revised nomenclature for the pseudochromosomes. *BMC Genomics*. 2020;21(1).
46. Monsalve RI, Villalba M, Rodriguez R. Allergy to Mustard Seeds: The Importance of 2S Albumins as Food Allergens. *Internet Symposium On Food Allergens*. 2001;2(2):13.
47. Rance F, Dutau G, Abbal M. Mustard allergy in children. *Allergy*. 2000;55(5):496-500.
48. Molkhov P. [The problems of the child with food allergies]. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2003;35(1):7-8.
49. Anibarro B, Seoane FJ, Mugica MV. Involvement of hidden allergens in food allergic reactions. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2007;17(3):168-72.
50. Jyothi TC, Singh SA, Rao AG. Conformation of Napin (*Brassica juncea*) in salts and monohydric alcohols: contribution of electrostatic and hydrophobic interactions. *J Agric Food Chem*. 2007;55(10):4229-36.
51. Monsalve RI, Gonzalez de la Pena MA, Menendez-Arias L, Lopez-Otin C, Villalba M, Rodriguez R. Characterization of a new oriental-mustard (*Brassica juncea*) allergen, Bra j IE: detection of an allergenic epitope. *Biochem J*. 1993;293 (Pt 3):625-32.
52. Thomas K, Aalbers M, Bannon GA, Bartels M, Dearman RJ, Esdaile DJ, et al. A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2004;39(2):87-98.
53. Rance F. Mustard allergy as a new food allergy. *Allergy*. 2003;58(4):287-8.
54. Bock SA, Munoz-Furlong A, Sampson HA. Fatalities due to anaphylactic reactions to foods. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107(1):191-3.
55. Jeebhay MF. Occupational seafood allergy: a review. *Occupational and Environmental Medicine*. 2001;58(9):553-62.
56. Sampson HA. Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;103(5 Pt 1):717-28.
57. Brzezinski JL. Detection of Crustacean DNA and Species Identification Using a PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Method. *Journal of Food Protection*. 2005;68(9):1866-73.
58. Palle-Reisch M, Wolny M, Cichna-Markl M, Hocheegger R. Development and validation of a real-time PCR method for the simultaneous detection of black mustard (*Brassica nigra*) and brown mustard (*Brassica juncea*) in food. *Food Chem*. 2013;138(1):348-55.