

U. PORTO



**FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO**

**Desenvolvimento de técnicas de biologia molecular para
a deteção de tremçoço (*Lupinus* spp.) como potencial
alergénio em alimentos**

Cristina Isabel Carvalho Gondar

**Dissertação do 2º Ciclo de Estudos conducente ao Grau de
Mestre em Controlo de Qualidade, Especialidade Água e Alimentos**

Trabalho realizado sob a orientação da Doutora Isabel Maria Sousa Gomes Mafra,
Coorientação da Doutora Maria Beatriz Prior Pinto Oliveira

Porto, 2015

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Doutora Isabel Mafra pela oportunidade que me proporcionou em poder trabalhar com este grupo de investigação, pelos novos conhecimentos adquiridos e preocupação ao longo desta etapa académica. Também agradeço a ajuda prestada quer na parte experimental quer na escrita desta dissertação.

À Doutora Beatriz Oliveira agradeço pela preocupação que demonstrou para comigo, ajuda, disponibilidade e também ter possibilitado a existência de condições na realização deste projeto.

À Joana Costa, que sempre me ajudou, desde o primeiro dia! Obrigada por todos os conhecimentos de Biologia Molecular que me transmitiste, sem os quais este trabalho teria sido praticamente impossível. Obrigada pela disponibilidade que sempre apresentaste e pela ajuda que sempre foi imprescindível ao longo desta etapa.

Aos meus companheiros de laboratório: à Andreia, ao Telmo, à Francisca, à Sónia e à Alexandra, o meu muito obrigada pelos conhecimentos e conselhos partilhados, acima de tudo pela ajuda e pelo que sempre foram para comigo. Obrigada!

À Prof.^a Olívia Pinho, pela disponibilidade em ceder as máquinas para a confeção de pão.

À Zita, pela disponibilidade e amabilidade que sempre demonstrou desde que lhe pedi ajuda na confeção os pães. Obrigada Zita!

À Anabela Costa, Anabela Borges pela simpatia e amizade, que sempre me prestaram.

Às minhas “*Juanitas*” do continente Americano: Lorena e Silvana. Obrigada pelo apoio, pela ajuda que me deram na realização deste trabalho, pelos conhecimentos e momentos que partilharam comigo. Obrigada!

Aos meus Amgos, sem exceções, que são o meu porto de abrigo, em especial à Ângela que muitas vezes me albergou, no Porto, partilhou muitas viagens de comboio e me ajudou a passar muitos “Cabos das Tormentas”. À Cátia, que mesmo não estando presente no meu dia-a-dia fará para sempre parte dele! Todas contribuíram muito para que chegasse até aqui, agradeço-vos imenso Amgas.

E porque os últimos não deixam de ser menos importantes, para além dos amigos, os meus agradecimentos finais são para aqueles que estão sempre prontos para me apoiarem, que me guiam e que me protegem: a minha Mãe, o meu Pai e o Roberto. O meu obrigado pelo apoio familiar que me proporcionaram nos momentos mais complicados ao longo destes meses, eu sei que posso contar convosco para sempre.

Comunicações em encontros científicos no âmbito deste trabalho

Trabalho apresentado sob a forma de comunicação oral:

C. Gondar, J. Costa, T.J.R. Fernandes, M.B.P.P. Oliveira, I Mafra. Development of a polymerase chain reaction assay for the specific detection of *Lupinus* spp. in processed foods. IJUP – 8th Meeting of young researchers of University of Porto, 13-15 Maio 2015, Porto.

RESUMO

O tremço (*Lupinus albus*) tem sido largamente utilizado em todos os tipos de produtos alimentares (padaria, pastelaria, snacks), principalmente devido ao seu valor nutricional e propriedades funcionais/tecnológicas. No entanto, o tremço também é classificado como um ingrediente alergénico, conhecido por causar reações imunes, sendo ligeiras a potencialmente fatais, em indivíduos sensibilizados ou alérgicos. Atualmente, estão identificados 10 alergénios no tremço, estando apenas um (Lup an 1) incluído na base de dados oficial. Na União Europeia, o tremço e outros 13 grupos de alimentos devem ser declarados e destacados do resto da lista de ingredientes, no rótulo dos alimentos pré-embalados, independentemente da sua quantidade. Para verificar a conformidade de rotulagem e para ajudar a indústria alimentar na gestão dos alergénios, salvaguardando a saúde dos indivíduos sensibilizados, o desenvolvimento de novas metodologias para a sua rastreabilidade é de grande importância.

Este estudo teve como objetivo o desenvolvimento de métodos, com base na reação em cadeia da polimerase qualitativa (PCR) e em PCR em tempo real para a deteção de alergénios do tremço em alimentos processados. Para esta finalidade, foram preparadas misturas de referência de farinhas de arroz e trigo com quantidades conhecidas de farinha de tremço (10% a 0,0001%, $n=10$). *Lupinus* spp. (*L. albus*, *L. luteus*, *L. angustifolius* e *L. mutabilis*) e outras espécies vegetais/animais foram testadas quanto à especificidade e reatividade cruzada. Um total de 27 amostras de alimentos processados foram adquiridos em mercados locais. Para o desenvolvimento dos métodos, desenharam-se *primers* com alvo em sequências que codificam proteínas alergénicas para amplificar *Lupinus* spp. A optimização de PCR qualitativa permitiu uma sensibilidade relativa de 5 mg kg⁻¹ de tremço em arroz (farinhas), 100 mg kg⁻¹ de tremço em trigo (farinhas) e respetivos pães, e uma deteção absoluta de 0,2 pg de ADN de tremço. O método de PCR em tempo real permitiu detetar e confirmar 10 mg kg⁻¹ de tremço em arroz, com uma sensibilidade absoluta de 2 pg de ADN de tremço. Das 27 amostras testadas, 15 foram positivas em ensaios de PCR qualitativa para a presença de tremço, mas apenas 5 foram confirmadas por PCR em tempo real, com concentrações estimadas entre 0,02% e 0,77%. Das 14 amostras que mencionavam “podem conter vestígios de tremço”, apenas numa foi confirmada a sua presença vestigial, mostrando a prática da rotulagem de precaução. Os resultados sugerem ainda casos de não conformidade com a rotulagem para a presença de tremço como ingrediente.

Palavras-chave: *Lupinus* spp, alergénios, PCR qualitativa, PCR em tempo real, limite de deteção.

ABSTRACT

Lupine (*Lupinus albus*) has been widely used in all kinds of food products (bakery, confectionery, snacks), mainly owing to its nutritional value and its functional/technological properties. However, lupine is also classified as an allergenic ingredient known to cause immune reactions that vary from mild to potentially life-threatening in sensitized/allergic individuals. Currently, there are 10 identified allergens in lupine, with only one (Lup an 1) included in the official database. In the European Union, lupine and other 13 food groups must be declared and highlighted from the rest of the list of ingredients on the label of prepackaged foods, regardless of their amount. To verify labeling compliance and to help food industry in the management of allergens, thus safeguarding the health of sensitized individuals, the development of new methodologies for allergen traceability is of great importance.

This study aimed at developing methods based on qualitative polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR for detection of lupine allergens in processed foods. For this purpose, rice and wheat flour of reference blends were prepared with known quantities of lupine flour (10% to 0.0001%, $n = 10$). *Lupinus* spp. (*L. albus*, *L. luteus*, *L. angustifolius* and *L. mutabilis*) and other plant species/animals were tested for specificity and cross-reactivity. A total of 27 samples of processed foods were purchased from local markets. For the development of the methods, primers were designed to target sequences encoding allergenic proteins to amplify *Lupinus* spp. Qualitative PCR allowed a relative sensitivity of 5 mg kg⁻¹ of lupine in rice (flours), 100 mg kg⁻¹ of lupine in wheat (flours) and respective breads, and an absolute detection of 0.2 pg of lupine DNA. The real-time PCR method allowed detecting and confirming 10 mg kg⁻¹ of lupine in rice, with an absolute sensitivity of 2 pg of lupine DNA. From the 27 tested samples, 15 were positive by qualitative PCR assay for the presence of lupine, but only 5 were confirmed by real time PCR, with the estimated concentrations of between 0.02% and 0.77%. From the 14 samples that mentioned "may contain traces of lupine", only one confirmed its vestigial presence, showing the common practice of precautionary labeling. The results suggest further cases of non-compliance with labeling for the presence of lupine as an ingredient.

Keywords: *Lupinus* spp, allergens, qualitative PCR, real-time PCR, relative LOD, absolute LOD.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
ÍNDICE	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABELAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XIII
COMPONENTE TEÓRICA	1
1 INTRODUÇÃO	3
2 CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES DE TREMOÇO	4
2.1 Composição química e nutricional da semente do tremoço	6
2.2 Compostos bioativos	7
2.3 Tremoço como alimento	8
3 ALERGIA ALIMENTAR	9
3.1 Classificação das proteínas alergénicas	11
3.2 O tremoço como potencial alergénio	13
4 MÉTODOS DE DETEÇÃO DE ALERGÉNIOS	17
4.1 Métodos baseados em proteínas	18
4.1.1 ELISA	18
4.1.2 Métodos cromatográficos	19
4.2 Métodos baseados em ADN	20
4.2.1 PCR qualitativa	21
4.2.2 PCR em tempo real	23
4.3 Aplicação das técnicas de PCR na deteção de tremoço em alimentos	26
5 OBJETIVOS E ÂMBITO DO TRABALHO	29
COMPONENTE EXPERIMENTAL	31
6 METODOLOGIA	33
6.1 Descrição das amostras	33
6.2 Preparação das amostras	35
6.3 Preparação das misturas de referência	36
6.4 Extração de ADN	38
6.4.1 Reagentes e soluções	38
6.4.2 Método Wizard	39
6.4.3 Método Nucleospin Food	40
6.5 Quantificação e avaliação do ADN extraído	41
6.6 Amplificação por PCR	41
6.6.1 Primers	41
6.6.2 PCR qualitativa	44
6.6.3 PCR em tempo real	46

7	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
7.1	Extração e avaliação da qualidade do ADN extraído	47
7.2	Desenvolvimento do método de PCR específica de espécies	51
7.2.1	Avaliação da capacidade de amplificação	51
7.2.2	Otimização do método	53
7.2.3	Avaliação da especificidade	56
7.2.4	Aplicação na análise qualitativa das amostras comerciais	59
7.3	Amplificação por PCR em tempo real	60
7.3.1	Identificação das espécies de tremçoço	61
7.3.2	Determinação do limite de deteção absoluto	62
7.3.3	Determinação do limite de deteção relativo	64
7.3.4	Avaliação quantitativa das amostras comerciais	66
8	CONCLUSÃO	69
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Tremoço branco (<i>Lupinus albus</i>).....	5
Figura 2 - Tremoço azul ou tremoço de folhas estreitas (<i>Lupinus angustifolius</i>).	5
Figura 3 - Flor do tremoço amarelo (<i>Lupinus luteus</i>).....	5
Figura 4 - Flor do tremoço pérola (<i>Lupinus mutabilis</i>).	6
Figura 5 - Perfil nutricional do tremoço (Adaptado de Lup'ingredients, 2015).....	6
Figura 6 - Representação esquemática das três etapas de amplificação por PCR (1 – desnaturação, 2 – hibridação e 3 – extensão).....	22
Figura 7 - Princípio de detecção por PCR em tempo real utilizando o corante SYBR Green I. Adaptado de Rodriguez-Lazaro <i>et al.</i> (2013).....	24
Figura 8 - Princípio de detecção por PCR em tempo real utilizando sondas de TaqMan. TAQ – Taq Polimerase. R – Fluoróforo; Q – <i>quencher</i> . Adaptado de Rodriguez-Lazaro <i>et al.</i> (2013).	24
Figura 9 - Fases da curva de amplificação por PCR em tempo real. Linha vermelha: curva de amplificação de uma amostra positiva. Linha azul: <i>Threshold</i> . Linha preta: linha de base dos ciclos. Adaptado de Rodriguez-Lazaro <i>et al.</i> (2013).....	26
Figura 10 - Algumas amostras comerciais testadas neste trabalho.	33
Figura 11 - Pães confeccionados a partir das misturas de farinha de tremoço e farinha de trigo. ..	38
Figura 12 - Alinhamento das sequências de genes de delta-conglutinas disponíveis na base de dados do NCBI para as espécies <i>L. albus</i> e <i>L. angustifolius</i> . As setas indicam as regiões dos <i>primers</i>	42
Figura 13 - Alinhamento das sequências de genes de proteínas PR-10 disponíveis na base de dados do NCBI para as espécies <i>L. albus</i> e <i>L. luteus</i> . As setas indicam as regiões dos <i>primers</i>	43
Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose de ADN genómico das misturas de referência de farinha de tremoço com farinha de arroz extraídas pelo método <i>Wizard</i> . Linhas 1 a 18 – 0%, 50, 10%, 5%, 2, 1%, 0,8 %, 0,5%, 0,2%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, 0,05%, 0,01%, 0,005%, 0,001%, 0,0005%, 0,0001% de tremoço, respetivamente. M – marcador molecular HyperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido).	49
Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose de ADN genómico das misturas de referência de farinha de tremoço com farinha de arroz extraídas pelo método <i>Nucleospin Food</i> , utilizando ARNse nas concentrações de 2 ng μL^{-1} (Linhas 1 a 4) e 5 ng μL^{-1} (Linhas 5 a 8). Linhas 1 a 8 – 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,005%, 0,001%, 0,0005% e 0,0001% de tremoço, respetivamente. M – marcador molecular HyperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido).	49
Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose de ADN genómico das misturas de referência de farinha de tremoço com farinha de trigo cruas (A) e processadas (B). Linhas 1 a 10 – 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001% e 0,0001% de tremoço, respetivamente. M – marcador molecular HyperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido).	51
Figura 17 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das amostras comerciais, utilizando os <i>primers</i> 18SRG-F/18SRG-R. Linhas 1 a 6 – TR01 a TR06, respetivamente; Linhas 7 e 8 – TR07 (diferentes extrações); Linhas 9 e 10 – TR08 (diferentes extrações); Linha 11 – TR09; Linhas 12 e 13 – TR10 (diferentes extrações); Linha 14 – TR11; Linha 15 – TR12; Linha 16 – TR13; Linha 17 – TR14;	

Linha 18 – Controlo positivo. CN – Controlo negativo; M – Marcador molecular 100 bp ADN Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). 52

Figura 18 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das amostras comerciais, utilizando os *primers* 18SRG-F/18SRG-R. Linhas 1 a 16 - TR15 a TR30, respetivamente. Linha 17 – Controlo positivo. CN – Controlo negativo; M – Marcador molecular 100 bp ADN Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha)..... 52

Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das diferentes variedades de sementes de tremço utilizadas neste estudo, utilizando os *primers* 18SRG-F/18SRG-R. Linha 1 – *L. albus*; Linha 2 – *L. luteus*; Linha 3 – *L. albus*; Linha 4 – *L. angustifolius*; Linha 5 – *L. mutabilis*; Linha 6 – *L. mutabilis*; Linha 7 – *L. albus*; Linha 8 – *L. albus*; Linha 9 – *L. luteus*; Linha 10 – *L. luteus*; CN – Controlo negativo; M – Marcador molecular 100 bp ADN Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). 53

Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das misturas de referência de tremço em arroz, utilizando os *primers* Ladc-F1/Ladc-R1. Linhas 1 a 8 – 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,005%, 0,001%, 0,0005%, 0,0001%, respetivamente, e extratos na concentração de 5 ng μL^{-1} ; Linhas 10 a 17 – 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,005%, 0,001%, 0,0005%, 0,0001%, respetivamente e extratos na concentração de 10 ng μL^{-1} ; Linhas 9 e 18 – farinha de arroz; CN – Controlo negativo; M – Marcador molecular 100 bp ADN Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). 54

Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das misturas de referência de tremço em arroz, utilizando os *primers* La4-F1/La4-R1. Linhas 1 a 5 – 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001%, 0,0001% de tremço, respetivamente; Linha 6 – farinha de arroz; CN – Controlo negativo; M – Marcador molecular 100 bp ADN Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). 54

Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR de diluições seriadas a partir da mistura de referência de 10% de tremço em arroz, utilizando os *primers* La4-F2/La4-R2. Linhas 1 a 6 – 2 ng, 0,2 ng, 0,02 ng, 0,002 ng, 0,0002 ng, 0,00002 ng de ADN, respetivamente; Linha 7 – 0 farinha de arroz; CN – Controlo negativo; M – Marcador molecular 100 bp ADN Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). 55

Figura 23 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das misturas de referência de tremço em arroz, com os *primers* La4-F2/La4-R2. Linhas 1 a 8 – 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,005%, 0,001%, 0,0005%, 0,0001%, respetivamente. Linha 9 – arroz; CN – Controlo negativo; M – Marcador molecular 100 bp ADN Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). 55

Figura 24 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das misturas de referência de farinha de tremço em trigo e dos respetivos pães processados, utilizando os *primers* La4-F2/La4-R2. Linhas 1 a 7 – 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001% e 0,0001% de farinha de tremço em pão, respetivamente. Linhas 14 a 9 – 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001% e 0,0001% de farinha de tremço em farinha de trigo, respetivamente. Linhas 7 e 8 – trigo; CN – Controlo negativo; M – Marcador molecular 100 bp ADN Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). 56

Figura 25 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação por PCR qualitativa (*primers* La4-F2/La4-R2) dos extratos de várias espécies vegetais e animais. Linhas 1 a 8 – vaca, borrego, cabrito, caju, farinha de trigo, cevada, amêndoa, tremço cozido, respetivamente; CP – Controlo positivo (1% tremço); CN – Controlo negativo; M – Marcador molecular 100 bp ADN Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). 57

Figura 26 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação por PCR qualitativa (<i>primers</i> La4-F2/La-R2) dos extratos de várias espécies vegetais e animais. Linhas 1 a 17 – Tomate cereja, sementes de abóbora, amora liofilizada, favas fritas, folha de morango, miolo de noz, sementes de girassol, milho, bacalhau (<i>Gadus morhua</i>), paloco (<i>Theragra chalcogramma</i>), salmão (<i>Salmo salar</i>), camarão cozido, castanheiro-da-índia, videira, oliveira, figueira e alcachofra, respetivamente. CP – Controlo positivo (1% tremçoço); CN – Controlo negativo; M – Marcador molecular 100 bp ADN Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha).....	57
Figura 27 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação por PCR qualitativa (<i>primers</i> La4-F2/La4-R2) dos extratos de várias espécies vegetais. Linhas 1 a 17 – noz macadâmia, noz, noz do Brasil, noz pecan, castanha, avelã, amendoim, amêndoa, pistacho, pinhão, caju, colza, aveia, cevada, centeio, soja, tremçoço cozido, respetivamente. CP – Controlo positivo (1% tremçoço); CN – Controlo negativo; M – Marcador molecular 100 bp ADN Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha).....	58
Figura 28 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação por PCR qualitativa (<i>primers</i> La4-F2/La4-R2) dos extratos das diferentes variedades de sementes de tremçoço utilizadas neste estudo. Linhas 1, 3, 7 e 8 – <i>Lupinus albus</i> ; Linhas 2, 9 e 10 – <i>Lupinus luteus</i> ; Linha 4 – <i>Lupinus angustifolius</i> ; Linhas 5 e 6 – <i>Lupinus mutabilis</i> ; CN – Controlo negativo; M – Marcador molecular 100 bp ADN Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha).....	58
Figura 29 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das amostras comerciais, utilizando os <i>primers</i> La4-F2/R2. Linhas 1 a 27- Amostras comerciais TR03 a TR29, respetivamente. Linhas 28 a 30, <i>Lupinus albus</i> , <i>Lupinus luteus</i> e <i>Lupinus albus</i> , respetivamente. Extratos na concentração de 10 ng μL^{-1} . CN – Controlo negativo; M – Marcador molecular 100 bp ADN Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha).....	59
Figura 30 - Curvas de amplificação obtidas por PCR em tempo utilizando extratos de ADN de diferentes espécies de tremçoço.	61
Figura 31 - Curvas de amplificação obtidas por PCR em tempo real resultantes da amplificação da diluição seriada do extrato de ADN de farinha de <i>Lupinus albus</i> (100% tremçoço), para a determinação do limite de deteção absoluto.	63
Figura 32 - Curva de calibração obtida por PCR em tempo real resultantes da amplificação da diluição seriada do extrato de ADN de farinha de <i>Lupinus albus</i> (100% tremçoço), para a determinação do limite absoluto.	63
Figura 33 - Curvas de amplificação obtidas por PCR em tempo real utilizando misturas de referência contendo 10%, 1%, 0,1%, 0,01% e 0,001% de farinha de tremçoço em farinha de arroz para a determinação do limite de deteção relativo.	65
Figura 34 - Curva de calibração obtida por PCR em tempo real utilizando misturas de referência contendo 10%, 1%, 0,1%, 0,01% e 0,001% de farinha de tremçoço em farinha de arroz para a determinação do limite de deteção relativo.	65

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Principais características das congulinas do tremço branco (Duranti <i>et al.</i> , 2008).....	12
Tabela 2 - Identificação dos alérgenos do tremço de acordo com a função biológica e respectivos números de acesso nas bases de dados UNIPROT e NCBI.	15
Tabela 3 - Metodologias de ELISA para a deteção e quantificação de alérgenos do tremço.	19
Tabela 4 - Metodologias baseadas na análise de ADN reportadas para a deteção e quantificação de tremço em alimentos.	27
Tabela 5 – Descrição dos alimentos adquiridos comercialmente para o presente trabalho.	34
Tabela 6 - Diferentes espécies de tremço utilizadas neste estudo.	35
Tabela 7 - Misturas binárias de farinha de tremço com farinha de arroz utilizadas como materiais de referência.	36
Tabela 8 - Misturas binárias de farinha de tremço com farinha de arroz utilizadas como materiais de referência (TT00-TT16) e em preparação de pão (PTT00-PTT16).....	37
Tabela 9 - Ingredientes utilizados na preparação dos pães.	37
Tabela 10 - Oligonucleótidos utilizados na identificação de <i>Lupinus</i> spp. e amplificação de gene universal.	44
Tabela 11 - Componentes das misturas de PCR qualitativa utilizados com os diferentes <i>primers</i> (volumes em µL).	45
Tabela 12 - Condições utilizadas nas amplificações por PCR qualitativa com diferentes <i>primers</i>	45
Tabela 13 - Componentes das misturas de PCR em tempo real.	46
Tabela 14 - Concentrações e purezas do ADN extraído de amostras comerciais pelo método <i>Wizard</i>	48
Tabela 15 - Concentrações e purezas do ADN extraído das misturas de referência das farinhas de tremço com arroz pelos métodos <i>Wizard</i> e <i>Nucleospin Food</i>	48
Tabela 16 - Concentrações e purezas do ADN extraído em sementes de tremço pelo método <i>Nucleospin Food</i>	50
Tabela 17 - Concentrações e purezas do ADN extraído das misturas de referência das farinhas de tremço com trigo (TT) e respectivos pães (PTT).	50
Tabela 18 - Resultados obtidos por PCR qualitativa e PCR em tempo real de ADN aplicadas a diferentes espécies de tremço.	62
Tabela 19 - Resultados obtidos para a determinação do LOD absoluto por PCR em tempo real de ADN de tremço.	64
Tabela 20 - Resultados obtidos para a determinação do LOD relativo por PCR em tempo real para as misturas de referência de tremço em arroz.	66
Tabela 21 - Resumo dos resultados obtidos por PCR convencional e PCR em tempo real para a deteção e quantificação de tremço em amostras comerciais.	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ARN – Ácido ribonucleico

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

Ct – Cycle Threshold

dNTP – Desoxirribonucleótido trifosfato

ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay

FRET – Fluorescence Resonance Energy Transfer

IgE – Imunoglobulina E

IgG – Imunoglobulina G

IgY – Imunoglobulina Y

IUIS – International Union of Immunological Societies

LC-MS – Liquid Chromatography Mass Spectroscopy (Cromatografia Líquida com Espectrometria de massa)

LFD – Dispositivo de fluxo lateral

LOD – Limite de detecção

LOQ – Limite de quantificação

LTP – Proteína de transferência de lípidos

MS – Espectrometria de massa

NCBI – National Center for Biotechnology Information

nsLTP – Proteína não específica de transferência de lípidos

pb – Pares de bases

PCR – Reação em cadeia de polimerase

PR – Proteína relacionada com a patogénese

T_m – Temperatura de desnaturação

UE – União Europeia

UNIPROT – Universal Protein Resource

WHO – World Health Organization

COMPONENTE TEÓRICA

1 INTRODUÇÃO

As leguminosas fazem parte da dieta de milhões de pessoas em todo mundo, sendo em muitos países a principal fonte proteica da alimentação humana. Desta forma, a escassez no fornecimento de proteínas de origem animal em algumas partes do mundo tem feito aumentar a necessidade do desenvolvimento de novos processos de suplementação de diversos alimentos com proteínas de origem vegetal. Hoje em dia, a grande maioria dos estudos nessa área está direcionada principalmente para o uso da proteína da soja. Enquanto isso, o tremçoço é um possível substituto da soja em alimentos para o consumo humano por possuir um elevado valor nutricional, sendo uma ótima opção para a suplementação de alimentos, mas que não tem recebido a devida atenção (Jiménez-Martínez *et al.*, 2003a).

Desde o início da década de 90 que o tremçoço é cada vez mais consumido como ingrediente em diversos alimentos processados em toda a Europa, EUA e Austrália. Desta forma, tem vindo a refletir-se um aumento de casos de alergia induzida pelo tremçoço (Gayraud *et al.*, 2009). As alergias alimentares são consideradas um problema de saúde pública emergente, especialmente nos países desenvolvidos. Torna-se preocupante pois, mesmo a ingestão de pequenas quantidades de alergénios pode desencadear reações alérgicas em consumidores sensibilizados. Deste modo, a única forma eficaz de prevenção consiste em evitar o alergénio presente nos alimentos associados à dieta. Assim, o aumento do conhecimento por parte dos consumidores sobre a composição dos alimentos levou à necessidade de verificar a rotulagem associada aos alimentos. Uma rotulagem incorreta de alimentos poderá representar apenas uma fraude comercial, mas também colocar em risco a saúde de consumidores sensibilizados quando se trata de potenciais alergénios não declarados.

O Codex Alimentarius da FAO, a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Comissão Europeia são responsáveis pela legislação da rotulagem dos alimentos, tendo proposto uma lista de alimentos e ingredientes que podem causar reações de hipersensibilidade severas, com base na prevalência e gravidade dos alergénios, que devem ser rotulados em alimentos pré-embalados (Mafra *et al.*, 2008a). De acordo com a legislação mais recente da UE, o tremçoço deverá ser incluído na lista de potenciais alergénios alimentares, cuja presença deve ser declarada de forma realçada na lista de ingredientes. Atualmente, a Diretiva 2007/68/CE e o Regulamento (UE) N.º 1169/2011 incluem uma lista que contém um total de 14 grupos de alimentos (ovos, leite, soja, trigo (glúten), crustáceos, peixe, amendoim, frutos de casca rija, aipo, mostarda, sésamo, tremçoço,

moluscos e sulfitos em concentrações superiores a 10 mg kg⁻¹ ou 10 mg L⁻¹ em termos de SO₂ total) suscetíveis de induzir reações alérgicas em indivíduos sensibilizados. Estes 14 grupos de alimentos, potencialmente alergénicos, deverão ser mencionados e destacados na rotulagem, independentemente da quantidade, mesmo quando não incluídos intencionalmente ou como resultados de contaminação cruzada.

Além de questões relacionadas com a saúde, é importante que a informação encontrada nos rótulos venha descrita de forma adequada, uma vez que a escolha de um produto alimentar por parte do consumidor pode refletir aspetos do seu estilo de vida. Assim, por razões éticas (por exemplo, o vegetarianismo), religiosas (judeus e muçulmanos não podem consumir carne de porco) ou por problemas de saúde (intolerâncias ou alergias), os consumidores deverão ser alertados para o conteúdo do produto que adquirem.

O perigo da existência de alergénios ocultos nos alimentos tem gerado uma grande procura de métodos sensíveis de forma a rastrear a sua presença em diferentes alimentos e a serem implementadas pelas indústrias de alimentos. Assim, têm sido desenvolvidas metodologias baseadas na análise de ADN e de proteínas, ao longo da última década, para a identificação e quantificação de compostos alergénicos nos alimentos (Hengel, 2007).

2 CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES DE TREMOÇO

O tremoço (*Lupinus spp.*) é uma leguminosa, ou seja, uma planta com vagens, onde se formam as sementes. É uma planta herbácea, sendo de crescimento anual e adaptada a climas temperados e subtropicais. As flores formam-se acima das folhas, podem ter cores variadas e possuem um cheiro a mel. As raízes podem possuir um comprimento relativamente longo, sendo normalmente noduladas e capazes de fixar azoto.

Apenas algumas espécies de tremoço são cultivadas, usadas e consumidas pelo homem, das quais quatro possuem interesse agronómico e nutricional: *Lupinus albus*, *Lupinus angustifolius*, *Lupinus luteus* e *Lupinus mutabilis* (Reinhard *et al.*, 2006). O tremoço branco ou *Lupinus albus* (Figura 1) possui flores brancas (Hanelt, 2001). É consumido em Portugal e Espanha como aperitivo ou *snack* depois de cozido em salmoura. Além disso, é utilizado como alimento para animais, quer fresco ou seco (Hanelt, 2001).

O tremoço azul (*Lupinus angustifolius*) é usado como grão e como forragem verde, especialmente para ovinos na Austrália (Figura 2). Além disso, também é usado como enriquecimento proteico em alimentos para animais e como uma leguminosa para rotação de culturas (Hanelt, 2001).



Figura 1 - Tremoço branco (*Lupinus albus*).



Figura 2 - Tremoço azul ou tremoço de folhas estreitas (*Lupinus angustifolius*).

A espécie de tremoço amarelo (*Lupinus luteus*) está distribuída pela parte ocidental do Mediterrâneo, principalmente na área oeste da Península Ibérica, na Itália e em locais isolados em Israel (Figura 3). Esta espécie de tremoço é usada como grão ou forragem verde, nos países do norte da Europa, sendo também usada há alguns séculos, como planta ornamental na região norte dos Alpes (Hanelt, 2001).



Figura 3 - Flor do tremoço amarelo (*Lupinus luteus*).

O tremoço pérola (*Lupinus mutabilis*) é cultivado nos Andes, no norte do Chile, principalmente na Bolívia e no Peru, entre os 2000 e 3800 metros de altitude, muitas vezes em rotação com batatas (Figura 4).



Figura 4 - Flor do tremço pérola (*Lupinus mutabilis*).

2.1 Composição química e nutricional da semente do tremço

O tremço é uma fonte de nutrientes, não só de proteínas, mas também de lípidos fibras e vitaminas. O tremço contém, geralmente, cerca de duas vezes mais o conteúdo em proteínas das leguminosas vulgarmente usadas na alimentação humana (Figura 5).

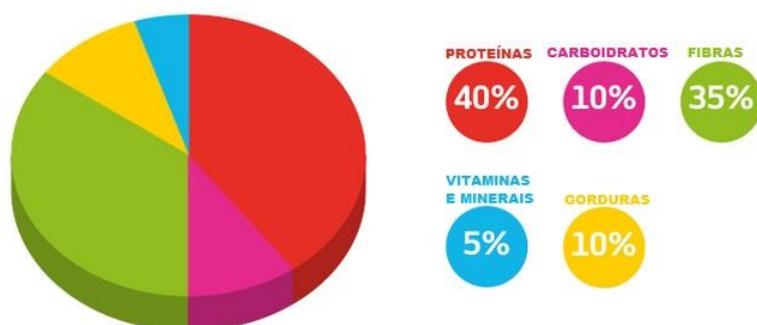


Figura 5 - Perfil nutricional do tremço (Adaptado de Lup'ingredients, 2015).

Existem variações do teor de proteína entre espécies e cultivares, como resultado das características das condições de crescimento e tipos de solo (Martinez-Villaluenga *et al.*, 2006; Capraro *et al.*, 2008).

A semente de tremço também contém fitoquímicos com capacidade antioxidante, tais como polifenóis, principalmente taninos e flavonoides (Oomah *et al.*, 2006; Reinhard *et al.*, 2006; Zielinska *et al.*, 2008; Martinez-Villaluenga *et al.*, 2009). Vários autores afirmam que o tremço possui níveis baixos de compostos indesejáveis, tais como o ácido fítico, oligossacáridos, inibidores de tripsina, lectinas e saponinas, quando comparados com outras leguminosas (Martínez-Villaluenga *et al.*, 2006; Reinhard *et al.*, 2006; Fernandez-Orozco *et al.*, 2008; Pastor-Cavada *et al.*, 2009). Além disso, o tremço possui uma

proporção interessante de ácidos gordos insaturados, essencialmente constituídos pelos ácidos oleico e linoleico (Trugo *et al.*, 2003; Erbaş *et al.*, 2005; Uzun *et al.*, 2007).

2.2 Compostos bioativos

Alguns compostos encontrados nos produtos naturais podem estar relacionados com a sua atividade biológica, mas não com propriedades nutricionais. De facto, alguns deles podem ser indesejáveis na nutrição animal e vegetal. Além da semente de tremoço ser bastante apreciada por possuir elevadas concentrações proteicas e lipídicas, o seu uso como alimento tem sido um pouco limitado devido à presença de fatores antinutricionais (Jiménez-Martinez *et al.*, 2003b). Contudo, o tremoço apresenta geralmente baixas concentrações em antinutrientes, apresentando uma vasta gama de diferentes substâncias, como os alcaloides, os taninos e as saponinas (Glencross, 2001).

Os alcaloides são uma importante classe de compostos com efeitos farmacológicos no corpo humano. Estes compostos têm apresentado um elevado interesse devido à sua variedade e atividade fisiológica nos animais e no Homem. Possuem efeito sedativo no sistema nervoso central, mas também podem ser tóxicos em elevadas concentrações/quantidades, podendo causar também doenças graves ou mesmo a morte em animais e humanos (Maknickienė *et al.*, 2008; Muzquiz *et al.*, 2005; Trugo *et al.*, 2003). A atuação dos alcaloides está relacionada com o sabor amargo, tendo as sementes de tremoço entre 5 e 40 g kg⁻¹ destes compostos (Gladstones *et al.*, 1998). Devido a estas quantidades, o consumo de sementes de tremoço só é possível após o seu cozimento e extração com uma solução aquosa de sal hipertónica (Day, 2013; Jappe *et al.*, 2010).

As saponinas estão presentes em diferentes classes de plantas, particularmente em leguminosas, raízes e algumas ervas medicinais (Trugo *et al.*, 2003). A ingestão de plantas que contêm saponinas pelo homem e pelos animais está associada tanto a efeitos negativos como a efeitos benéficos (Trugo *et al.*, 2003). Os potenciais benefícios das saponinas na alimentação humana estão associados à redução do risco de doenças cardiovasculares, como também podem agir na inibição da replicação viral (Trugo *et al.*, 2003). Muzquiz *et al.* (1993) estudaram o conteúdo em saponinas de seis variedades de tremoço, o qual variou entre 56,7 a 470 mg kg⁻¹ em *L. luteus*, *L. mutabilis* e *L. Angustifolius*, não sendo detetadas em *L. albus* (Muzquiz *et al.*, 1993).

Os taninos são substâncias que interagem com proteínas, formando um complexo com ligações cruzadas que são insolúveis em água, o que pode reduzir a digestibilidade dos alimentos (Ortiz *et al.*, 1993). Além disso, também tem sido descrito que os taninos

possuem propriedades antissépticas, sendo utilizados na medicina (Lampart-Szczapa *et al.*, 2003). Nas sementes de tremoço, os taninos, estão presentes em valores relativamente baixos, entre 0,2 e 0,5%, (massa/massa).

2.3 Tremoço como alimento

Devido a um aumento da utilização da proteína vegetal é necessário apoiar a sua produção. Desta forma, podem-se substituir as proteínas animais na dieta humana, de modo a reduzir a pressão que a pecuária intensiva representa para o meio ambiente. Assim, sob ponto de vista nutricional, as proteínas vegetais podem fornecer quantidades suficientes de aminoácidos essenciais de forma a suprimir as necessidades nutricionais na dieta humana (Day, 2013).

O tremoço não é apenas apreciado pelo seu valor nutricional, é também apreciado devido às suas propriedades funcionais em produtos cárneos, de padaria e confeitaria (Lee *et al.*, 2006a; Martínez-Villaluenga *et al.*, 2006; Drakos *et al.*, 2007). As sementes trituradas são misturadas com farinhas de cereais e usadas para fazer *pizzas*, massas, batatas fritas, pão, bolos, biscoitos, pão ralado (Faeste *et al.*, 2004; De las Marinas *et al.*, 2007), panquecas, *muffins*, *croissants* (Brennecke *et al.*, 2007), iogurte (Jiménez-Martínez *et al.*, 2003), molhos e até mesmo substitutos do leite (Martínez-Villaluenga *et al.*, 2006a; Jape *et al.*, 2010). Devido às suas propriedades emulsificantes, a farinha de tremoço é também utilizada em cubos de caldo de carne, de frango e sopa de frango desidratada (Rojas-Hijazo *et al.*, 2006).

A farinha do tremoço pode ser incorporada em farinha de trigo para melhorar o valor nutricional do produto final, sem efeitos prejudiciais sobre a qualidade (Pollard *et al.*, 2002). Em geral, a adição de até 10% de farinha de tremoço melhora a ligação de água, textura, prazo de validade e aroma (Martínez-Villaluenga *et al.*, 2006). De facto, a maioria dos ingredientes de enriquecimento com fibra baseia-se em trigo, havendo assim algumas limitações no “mercado celíaco” em termos de alimentos sem glúten. Desta forma, estudos demonstraram que a fibra da casca de tremoço pode suprimir essa lacuna neste nicho limitado do mercado (Tucek, 2006).

Devido ao facto das espécies de tremoço ainda não serem geneticamente modificadas, a farinha de tremoço é cada vez mais utilizada como substituto de farinha de soja (Peeters *et al.*, 2009). Além disso, apresentam uma boa solubilidade e capacidades emulsificante e gelificante, tal como a soja (Pozani *et al.*, 2002). As proteínas do tremoço possuem propriedades emulsificantes (Pozani *et al.*, 2002), contribuindo para a estabilização das partículas de gordura, pois protegem as gotículas de óleo de se dispersarem com a

emulsão. A sua capacidade gelificante permite fortalecer a estrutura de um produto processado/cozido (Drakos *et al.*, 2007).

Quanto à propriedade de formação de espuma, Baker *et al.* (1988) definem-na como "uma dispersão coloidal de uma fase gasosa de uma fase líquida" (citado por Jayasena *et al.* (2010)). A clara do ovo é um dos ingredientes mais comumente utilizado na indústria alimentar, com propriedades de formação de espuma, criando uma espuma estável com elevado volume (Jayasena *et al.*, 2010). A farinha do tremçoço apresenta um elevado potencial para ser usada em substituição da albumina do ovo como um agente de formação de espuma em alimentos (Pollard *et al.*, 2002). Raymundo *et al.* (1998) verificou que a espuma do tremçoço, quando cozido em água durante 5 minutos, se tornou muito semelhante em textura e microestrutura à espuma da clara de ovo cru.

3 ALERGIA ALIMENTAR

A alergia alimentar ou distúrbios de hipersensibilidade são definidos como respostas imunológicas adversas a proteínas alimentares. Esta caracterização distingue estes distúrbios de muitas reações adversas alimentares que possuem etiologias não imunes (Sicherer *et al.*, 2006). Cada vez mais se verifica uma alteração da dieta devido a reações adversas que foram provocadas por alimentos. Essas reações podem ser: uma resposta imunológica adversa verificável a uma proteína de alimentos (alergia a alimentos); uma desordem metabólica específica do hospedeiro (quando um indivíduo é intolerante a algum composto); uma resposta a uma substância farmacologicamente ativa (por exemplo, a cafeína) ou componentes tóxicos do alimento (por exemplo, as toxinas libertadas por bactérias); ou reações adversas não-reprodutíveis (aversão a alimentos) (Sampson *et al.*, 1999; Eriksson *et al.*, 2004; Imamura *et al.*, 2008; Cianferoni *et al.*, 2009). Assim, um conjunto de especialistas associados ao Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infeciosas dos EUA referem alergia alimentar como um efeito adverso à saúde decorrente de uma resposta imune específica e reprodutível que ocorre por exposição a um determinado alimento, não sendo dependentes da dose (Boyce *et al.*, 2010). Já a intolerância alimentar é definida como uma reação não imune que pode estar associada a propriedades intrínsecas dos alimentos (compostos tóxicos ou propriedades ativas farmacológicas) ou associada às características dos hospedeiros (distúrbios metabólicos) (Cianferoni *et al.*, 2009).

Com base no mecanismo imunológico envolvido, as alergias alimentares podem ser classificadas em três grupos:

- i. Alergia mediada por imunoglobulinas E (IgE), que ocorre quando a maioria das reações alérgicas aos alimentos se devem ao emparelhamento dos anticorpos IgE específicos do alergénio com o seu recetor de alta afinidade (Lee *et al.*, 2006b; Sicherer *et al.*, 2006; Cianferoni *et al.*, 2009; Verma *et al.*, 2013);
- ii. Sintomas gastrointestinais não mediados por IgE em que as desordens são mediadas por células (sem IgE detetável, o componente celular do sistema imunitário é o responsável da alergia alimentar e envolvem principalmente o trato gastrointestinal) (Sicherer *et al.*, 2006; Cianferoni *et al.*, 2009; Verma *et al.*, 2013);
- iii. Distúrbios com mecanismos mistos (IgE e não-IgE) (Sicherer *et al.*, 2006; Cianferoni *et al.*, 2009; Verma *et al.*, 2013).

As reações não mediadas por IgE são reações alérgicas que se desenvolvem lentamente em 6-8 h, atingindo um pico a cerca de 48 h após a ingestão do alimento (Verma, 2013). No entanto, as alergias aos alimentos mediadas por IgE são imediatas, reprodutíveis e fáceis de serem diagnosticadas por deteção da IgE específica do alimento. Essas reações manifestam-se através de sintomas cutâneos (urticária, eczema, dermatite), síndrome de alergia oral (inchaço dos lábios, palato e laringe), sintomas respiratórios (asma, rinite, espirros), sintomas gastrointestinais (inchaço da cavidade oral, vômitos, cólicas, diarreia), sintomas cardiovasculares (ritmo cardíaco anormal, pressão arterial muito baixa) e, mais gravemente, através de choque anafilático (Besler, 2001). A alergia alimentar mediada pelas IgE pode ainda ser dividida em duas subclassificações com base no padrão de sensibilização de alergénios (Figura 6):

- i. Classe 1: Os alergénios alimentares são estáveis no suco gástrico e não conduzem a uma hipersensibilização através do trato gastrointestinal. A alergia oral ocorre, normalmente, em alimentos cujas proteínas são estáveis à digestão e ocorre em bebés ou crianças durante imaturidade imunológica (Sicherer *et al.*, 2006).
- ii. Classe 2: Os alergénios alimentares são sensíveis ao calor e são suscetíveis à digestão gástrica, desta forma a sensibilização não ocorre por via oral, ou seja, desenvolve-se como consequência de uma sensibilização alérgica a alergénios inalados (Breiteneder *et al.*, 2000).

Nos países industrializados, cerca de 3 a 4% dos adultos e 5% das crianças sofrem de alergias alimentares, tendo estes valores vindo a aumentar. Entre 1997 e 2007, a alergia alimentar na infância aumentou 18% nos EUA (Sicherer *et al.*, 2010). Em crianças jovens, os alimentos que mais causam alergia são o leite de vaca (2,5%), o ovo (1,3%), o amendoim (0,8%), o trigo (aproximadamente 0,4%), a soja (cerca de 0,4%), os frutos de casca rija (0,2%), o peixe (0,1%) e os crustáceos (0,1%) (Sicherer *et al.*, 2006). Contudo, geralmente, na infância, as alergias alimentares devem-se essencialmente ao leite, ovo e

soja, e normalmente resolvem-se ao longo do crescimento da criança, enquanto alergias a amendoim, frutos de casca rija, peixe e crustáceos são persistentes (Sicherer *et al.*, 2014).

3.1 Classificação das proteínas alergénicas

Os alergénios são antigénios com capacidade de desencadear uma resposta imunológica adversa em indivíduos sensibilizados. Bioquimicamente, os alergénios são maioritariamente glicoproteínas solúveis em água e resistentes à digestão (Sicherer *et al.*, 2009). As proteínas alergénicas provêm de uma grande variedade de fontes (pólen, ácaros, fungos, produtos de origem animal, veneno, alimentos e látex). São capazes de induzir o sistema imunitário a produzir anticorpos do tipo IgE, levando ao aparecimento de sintomas alérgicos num indivíduo sensibilizado (Ferreira *et al.*, 2004).

Até à data, apenas algumas características bioquímicas distintas podem ser associadas às proteínas que se sabe serem alergénicas. Estas características incluem a abundância de proteína no alimento, a existência de múltiplos epítomos lineares, a resistência da proteína à digestão e ao processamento, e a estrutura molecular (Bannon, 2004).

A maior parte dos alergénios dos alimentos de origem vegetal pertencem a um pequeno número de famílias de proteínas (Breiteneder *et al.*, 2004): superfamília das prolaminas, a superfamília das cupinas, as profilinas e as proteínas relacionadas com a patogénese (PR) da planta (Breiteneder *et al.*, 2004; Breiteneder *et al.*, 2005; Radauer *et al.*, 2007; Hauser *et al.*, 2008). As prolaminas encontram-se em alimentos, tais como leguminosas, cereais, frutos de casca rija e outros frutos/legumes, estando relacionadas com o sistema de reserva de nutrientes nas plantas (Shewry *et al.*, 2002; Shewry *et al.*, 2004). A superfamília das cupinas engloba uma grande variedade de proteínas multifuncionais que se pensa ser originária de uma evolução divergente de um ancestral comum, cuja presença é transversal a diferentes reinos (bactérias, plantas e animais) (Hauser *et al.*, 2008). A alergenicidade dentro das cupinas está confinada, fundamentalmente, às proteínas de reserva (vicilinas ou globulinas 7S e leguminas ou globulinas 11S) (Breiteneder *et al.*, 2004; Radauer *et al.*, 2007; Verma, 2013).

As sementes do tremço branco contêm uma razão de albuminas e globulinas numa proporção de aproximadamente 1/9 (Guillamón *et al.*, 2010). As globulinas são o principal componente proteico de reserva do tremço. Os dois tipos principais de proteína são a β -conglutina (vicilina ou globulina 7S, 44-45%) e a α -conglutina (legumina ou globulina 11S, 35-37%), e dois componentes menores são a δ -conglutina (albumina 2S, 10-12%) e a γ -conglutina (globulina 7S, 4-5%) (Duranti *et al.*, 2008) (Tabela 1).

Tabela 1 - Principais características das conglutinas do tremçoço branco (Duranti *et al.*, 2008).

Conglutina	Família de proteínas	% Total de globulinas	Proteína nativa		Composição do monômero	
			Massa molecular (kDa)	Estrutura Quaternária	Nome da Subunidade	Massa molecular (kDa)
α	11S (legumina)	35-37	330-430	Hexâmero	Ácidas*	42-52
					Básicas*	20-22
β	7S (vicilina)	44-45	143-260	Trímero	HMW	53-44
					IMW	25-46
					LMW	17-20
γ	7S	4-5	200	Tetrâmero	Grande*	29
					Pequeno*	17
δ	2S (albumina)	10-12	13	-	Grande*	9
					Pequeno*	4

*Covalentemente ligados por ligações dissulfureto

As profilinas representam uma família de alergénios, que se encontram no citoplasma de células nucleadas, contendo sequências altamente conservadas com 70% a 85% de resíduos idênticos em diferentes espécies (Breiteneder, 2004; Hauser *et al.*, 2008; Verma *et al.*, 2013; Witke, 2004). O principal papel das profilinas nas células vegetais relaciona-se com a rápida reorganização dos microfilamentos durante processos como a citocinese, o alongamento celular e o crescimento de tubos polínicos e pelos radiculares (Ramachandran *et al.*, 2000). Por estarem envolvidas em processos celulares essenciais, estas proteínas podem ser encontradas em todos os seres vivos estudados até agora, por conseguinte, podem ser consideradas como *panallergens*, que são responsáveis por muitas reações cruzadas entre alergénios ingeridos ou inalados (Witke, 2004).

Os alergénios de origem vegetal também estão encontrados entre os vários grupos de proteínas de defesa (PR) que permitem às plantas resistirem ao *stress* biótico e abiótico. Não são consideradas uma superfamília, mas representam uma coleção de famílias de proteínas não relacionadas compostas por 14 famílias de proteínas que funcionam como parte de defesa da planta (Breiteneder *et al.*, 2004; 2005b; Verma, 2013).

As proteínas Bet v 1 (*Betula verrucosa*), que estão relacionadas com a patogénese da planta, pertencem à família PR-10 e são alergénios associados ao pólen (Jappe *et al.*, 2010). Estas proteínas são, na sua maioria, resistentes às proteases, mostrando também grande estabilidade à acidez, o que as torna bons candidatos para provocar uma resposta imune em indivíduos sensibilizados (Hoffmann-Sommergrube, 2002; Hauser, 2008; Verma, 2013; Sinha *et al.*, 2014). Na sua maioria, estão associadas a uma elevada

reatividade cruzada devido à semelhança estrutural entre algumas das principais proteínas (Sinha *et al.*, 2014).

3.2 O tremço como potencial alergénio

Desde o início da década de 90 que o tremço é cada vez mais consumido como ingrediente em diversos alimentos processados em toda a Europa, EUA e Austrália. Em 1994, foi reportado o primeiro caso de alergia ao tremço após a ingestão de massa enriquecida com farinha de tremço, o qual foi referenciado numa criança de 5 anos de idade sensível ao amendoim (Hefle *et al.*, 1994; Jappe *et al.*, 2010). Desde então, o número de incidentes tem vindo a aumentar após a ingestão ou inalação de farinha de tremço, tais como asma brônquica (Holden *et al.*, 2005), rinoconjuntivite (Holden *et al.*, 2005; Campbell *et al.*, 2007), síndrome da alergia oral (Holden *et al.*, 2005; Quaresma *et al.*, 2007; Shaw *et al.*, 2008), dor abdominal, (Wüthrich *et al.*, 2004; Holden *et al.*, 2005); urticária, angioedema (Smith *et al.*, 2004; Shaw *et al.*, 2008), edema (Wüthrich *et al.*, 2004), tosse (Smith *et al.*, 2004) e anafilaxia (Brennecke *et al.*, 2007).

A inclusão de tremço na farinha de trigo foi autorizada pela primeira vez no Reino Unido, em 1996, e em França, no final de 1997, para adicionar proteínas e fibras e melhorar a textura dos alimentos (Peeters *et al.*, 2007). Desde então, a semente de tremço, respetiva farinha ou pó são conhecidos como sendo responsáveis por sintomas alérgicos, de diferentes graus de gravidade, levando a alergias alimentares ou respiratórias (Jappe *et al.*, 2010)

Os alergénios do tremço ainda não foram completamente caracterizados, embora, as α - e γ -conglutinas do tremço tenham sido identificadas como sendo candidatos a alergénios (Magni *et al.*, 2005). Até à data, apenas um alergénio foi incluído na lista da WHO-IUIS, sendo designado por Lup an 1. Além deste alergénio, outros 9 alergénios, pertencentes ao género *Lupinus*, estão documentados na base de dados do Allergome (Tabela 2). Os alergénios de *Lupinus* foram identificados em três espécies diferentes: *Lupinus angustifolius*, *L. luteus* e *L. albus*. Dentro das referidas espécies, três grupos de proteínas alergénicas foram identificados no tremço, nomeadamente PR-10 (Lup a 4 e Lup I 4), prolaminas (Lup an δ -conglutina e Lup a δ -conglutina) e cupinas (Lup a 1, Lup an 1, Lup a α -conglutina, Lup an α -conglutina, Lup a γ -conglutina e Lup an γ -conglutina) (Tabela 2).

Uma alimentação à base de leguminosas pode envolver o risco de reações alérgicas cruzadas. A reatividade cruzada é um fenómeno imunológico cuja manifestação clínica, quando ocorre, consiste na associação de duas ou mais alergias (García *et al.*, 2011).

Estes fenômenos são verificáveis quando existe de homologia nas sequências. Desta forma, proteínas homólogas podem partilhar a mesma função, epítomos comuns, sequências similares ou características estruturais, resultando numa possível reação cruzada (Aalberse *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2004; Aalberse, 2007; García *et al.*, 2011). Além disso, já foram descritos casos de reatividade cruzada entre espécies filogeneticamente próximas como também entre espécies filogeneticamente distantes. No entanto, quanto menor a distância taxonômica, maior a probabilidade de reatividade cruzada. (García *et al.*, 2011).

O tremçoço, o amendoim e a soja são membros da família das leguminosas, a segunda maior família de plantas com sementes. A farinha de tremçoço é uma fonte de alergénios e, potencialmente, suscetível de reação cruzada com os alergénios do amendoim, soja, lentilha, feijão, ervilha e amêndoa (Peeters *et al.*, 2007; Holden *et al.*, 2007; Hoffmann-Sommergruber *et al.*, 2009; Jappe *et al.*, 2010). A alergia ao tremçoço pode surgir pela reação cruzada em pessoas que já são alérgicas a outra espécie da família das leguminosas, em particular o amendoim pode provocar efeitos adversos de sensibilização primária (Moneret-Vautrin *et al.*, 1999; Radcliffe *et al.*, 2005; Moneret-Vautrin, 2006). Além disso, também existe um risco acentuado do paciente desenvolver asma devido à farinha de tremçoço, sendo um risco relacionado com a alergia ao amendoim (Kanny *et al.*, 2000).

Segundo Guarneri *et al.* (2005), o alergénio Lup an 1 do tremçoço possui homologia na sequência com o alergénio Ara h 1 do amendoim. Além disso, foi encontrada uma homologia muito significativa e uma similaridade molecular entre o alergénio Ara h 8, do amendoim, com as PR-10 do tremçoço (Guarneri *et al.*, 2005). Além do amendoim, também foi demonstrada a reatividade cruzada do tremçoço com a soja por Berkner *et al.* (2009). O alergénio Gly m 4 da soja (*Glycine max*), que pertence à família de proteínas homólogas de Bet v 1 (PR-10), assemelha-se a proteínas de tremçoço amarelo (Berkner *et al.*, 2009).

A maioria dos estudos acerca da alergia ao tremçoço varia no que diz respeito à população, origem geográfica, entre outros aspetos. Dependendo da seleção da população em estudo, a percentagem de indivíduos sensibilizados ao tremçoço difere em termos clínicos uma vez que alguns indivíduos apresentam sintomas relevantes, enquanto outros não. No entanto, apesar de existir reatividade cruzada entre o tremçoço e a soja, a lentilha, o feijão e a ervilha, raramente parece apresentar relevância clínica. Contrariamente, a reatividade cruzada entre o tremçoço e o amendoim aparece com maior frequência e apresenta extrema importância clínica (Jappe *et al.*, 2010).

Tabela 2 - Identificação dos alergénios do tremço de acordo com a função biológica e respetivos números de acesso nas bases de dados UNIPROT e NCBI.

Nome	Designação Bioquímica	Massa molecular (kDa)	Proteína (UnitProt)	Proteína (NCBI)	Nucleótido (NCBI)	Isoalergénio	Isoformas ou Variantes	Função Biológica
Lup a 1	Vicilina (Superfamília das cupinas)	~ 62,1 (533 aa)	Q53HY0	CAI84850.2	AJ966470.2			Proteínas de armazenamento da semente
		~ 62,1 (531 aa)	Q6EBC1	AAS97865.1	AY500372.1			
Lup a 4	PR-10 (Família Bet v1)	~ 16,9 (158 aa)	O24010	CAA03926.1	AJ000108.1			Proteínas relacionadas com a defesa da planta
		~ 16,9 (158 aa)	Q93XI0	BAB63949.1	AB070618.1			
Lup a α-conglutina	Legumina (Superfamília das cupinas)	~ 58,4 (512 aa)	Q53I54	CAI83773.2	AJ938034.2			Proteínas de armazenamento da semente
		~27,8 (245 aa)	Q53I55	CAI83770.1	AJ938033.1			
Lup a δ-conglutina	Albumina (Superfamília das prolaminas)	~17,1 (148 aa)	Q333K7	CAJ42100.1	AM156845.1			Proteínas de armazenamento da semente
				CAJ43922.1	AM160790.1			
Lup a γ-conglutina	Vicilina (Superfamília das cupinas)	~ 4,4 (40 aa)	Q7M1N2	Desconhecido	Desconhecido			Atividade da endopeptidase do tipo aspártico
		~49,5 (448 aa)	Q9FEX1	CAC17729.2	AJ297568.2			
		~49,2 (452 aa)	Q9FSH9	CAC16394.1	AJ297490.1			
		~3,4 (31 aa)	Q9S8M6	Desconhecido	Desconhecido			
Lup an 1	Vicilina (Superfamília das cupinas)	~71,9 (611 aa)	B8Q5G0	ACB05815.1	EU352876.1	Lup an 1.01	Lup an 1.0101	Proteínas de armazenamento da semente
Lup an α-conglutina	Legumina (Superfamília das cupinas)	~15,5 (131 aa)	Q96475	AAC49787.1	U74384.1			Proteínas de armazenamento da semente
Lup an δ-onglutina	Albumina (Superfamília das prolaminas)	~4,6 (37 aa)	P09930	Desconhecido	Desconhecido			Reservatório de nutrientes na semente
		~9,4 (80 aa)	P09931	Desconhecido	Desconhecido			
		~17,8 (153 aa)	Q99235	AEB33722.1	HQ670419.1			
				CAA37598.1	X53523.1			
Lup an γ-conglutina	Vicilina (Superfamília das cupinas)	~48,9 (449 aa)	Q42369	AAB53771.1	L39786.1			Atividade da endopeptidase do tipo aspártico
				AEB33719.1	HQ670416.1			
				CAA46552.1	X65601.1			

Tabela 2 - Identificação dos alergénios do tremço de acordo com a função biológica e respetivos números de acesso nas bases de dados UNIPROT e NCBI (Continuação).

Nome	Designação Bioquímica	Massa molecular (kDa)	Proteína (UnitProt)	Proteína (NCBI)	Nucleótido (NCBI)	Isoalergénio	Isoformas ou Variantes	Função Biológica
Lup I 4	PR-10 (Família Bet v1)	~ 16,9 (156 aa)	P52778	CAA56298.1	X79974.1			Proteínas relacionadas com a defesa da planta
				AAC12790.1	AF002277.1			
		~16,7 (156 aa)	P52779	CAA56299.1	X79975.1			
				AAC12791.1	AF002278.1			
		~16,8 (157 aa)	Q7XZT8	AAP57943.1	AY303549.1			
		~ 16,9 (157 aa)	Q7Y1W5	AAP37978.1	AY288355.1			
		~16,8 (158 aa)	Q9AXK1	AAK09429.1	AF322226.1			
		~16,8 (158 aa)	Q9AXK2	AAK09428.1	AF322225.1			
		~16,8 (158 aa)	Q9LLQ2	AAF77634.1	AF170092.1			
				AAQ83586.1	AY377535.1			
		~16,9 (158 aa)	Q9LLQ3	AAF77633.1	AF170091.1			
				AAU43882.1	AY729802.1			
		~16,8 (156 aa)	Q9SPB2	AAD55099.1	AF180941.1			

A maior parte dos alimentos provenientes de plantas, antes do consumo, são cozidos ou por ebulição, em forno, por fritura, podendo ser consideradas como formas de tratamento térmico. Além disso, o processamento térmico pode também incluir autoclavagem, aquecimento por micro-ondas, branqueamento, pasteurização ou vapor (Álvarez-Álvarez *et al.*, 2005; Verma *et al.*, 2012).

O tratamento térmico é um aspeto bastante importante a considerar na alergenicidade de uma alimento, pois pode reduzir, eliminar ou melhorar o potencial alergénico, neste caso particular, das leguminosas (Verma *et al.*, 2012). Assim, o processamento térmico pode influenciar a alergenicidade das proteínas da planta em diferentes graus, quer aumentando ou diminuindo a imunorreatividade das IgE (Maleki *et al.*, 2000). O processamento pode ter impacte na estrutura da proteína, ou seja, nas características intrínsecas da proteína, dependendo da severidade do tratamento aplicado e do ambiente em que ocorre (por exemplo, a presença de outros ingredientes, o pH, etc.). Os tratamentos térmicos podem induzir à perda de estrutura terciária, afetando a ligação da IgE a epítomos conformacionais, ou induzindo o aparecimento de epítomos alergénicos escondidos, ou em outros casos, fomentar a criação de novos alergénios (Hengel, 2007). Segundo estudos efetuados por Álvarez-Álvarez *et al.* (2005), chegou-se à conclusão que os alergénios do tremço são relativamente estáveis ao tratamento por calor. Foram investigadas as características dos alergénios das sementes de tremço, após ebulição (até 60 minutos), autoclavagem (121°C a uma pressão de 1,18 atmosferas durante 20 minutos e 138°C a uma pressão de 2,56 atmosferas durante 30 minutos), bem como o aquecimento em micro-ondas durante 30 min e o cozimento por extrusão (Álvarez-Álvarez *et al.*, 2005). Nem o aquecimento por micro-ondas, nem o cozimento reduziram a capacidade de ligação das IgE. Apenas se verificou uma redução importante na imunorreatividade observada unicamente quando os extratos de tremço foram autoclavados a 138°C durante 20 minutos, podendo também reduzir a alergenicidade do tremço. (Álvarez-Álvarez *et al.*, 2005).

Um outro estudo teve por objetivo a deteção de alergénios de tremço em bolachas, cubos de caldo de galinha e sopa de frango desidratada (Rojas-Hijazo *et al.*, 2006). Sendo que o processamento térmico destes derivados de tremço não alterou a sua alergenicidade.

4 MÉTODOS DE DETEÇÃO DE ALERGÉNIOS

A rotulagem de produtos alimentares devido à presença de alergénios alimentares é atualmente a forma mais eficaz para evitar a ingestão acidental de alergénios ocultos em

indivíduos alérgicos. Desta forma, há claramente uma necessidade da existência de métodos analíticos de detecção e quantificação que sejam altamente específicos e sensíveis, detetando até mesmo quantidades vestigiais de alergénios, sendo rápidos, robustos, confiáveis e de baixo custo.

4.1 Métodos baseados em proteínas

Associados aos métodos baseados em proteínas, existem dois principais grupos de técnicas que podem ser distinguidos: um grupo relacionado com interações anticorpo/alergénios, tais como ELISA; e um segundo grupo baseado em cromatografia líquida (LC) com detecção por espectrometria de massa (MS). Até agora, os métodos baseados em imunoenaios estão entre os mais utilizados, embora recentemente os métodos de MS também têm conquistado um papel especial na detecção e quantificação de alergénios em alimentos (Costa *et al.*, 2014).

4.1.1 ELISA

Os ensaios ELISA são amplamente utilizados em estudos bioquímicos, baseando-se na interação específica entre o anticorpo e o antigénio. No caso da detecção de alergénios alimentares, o antigénio é o alergénio em estudo. O sucesso destes ensaios depende dos anticorpos utilizados. Os anticorpos monoclonais reconhecem antigénios específicos, enquanto anticorpos policlonais reconhecem múltiplos epítomos espalhados sobre as proteínas e requerem um custo de produção mais baixo (Schubert-Ullrich *et al.*, 2009; Monaci *et al.*, 2010).

Os ensaios ELISA têm como base a imobilização de um antigénio ou anticorpo a uma superfície sólida (Montowska *et al.*, 2010). Esta técnica envolve uma enzima (uma proteína que catalisa uma reação bioquímica) para detetar a presença de um anticorpo ou um antigénio numa amostra. O anticorpo marcado está, geralmente, ligado a uma enzima, que em presença do substrato origina um produto corado (Asensio *et al.*, 2008).

Os ensaios ELISA podem fornecer uma avaliação qualitativa ou quantitativa, caracterizam-se por serem baratos, rápidos e sensíveis, mas podem ser afetados pela reatividade cruzada e matriz alimentar (Hengel, 2007; Costa *et al.*, 2014). Além disso, a propensão de proteínas alvo sofrerem alterações conformacionais aquando do processamento dos alimentos, pode levar, conseqüentemente, a resultados falso-negativos (Hengel, 2007). Portanto, os resultados de ELISA devem ser interpretados com cuidado, tendo em consideração o tipo de matriz e processamento de alimentos.

Os kits ELISA disponíveis no mercado são direcionados para a amêndoa, crustáceos, ovo, avelã, leite, amendoim, soja, gergelim, mostarda, trigo mourisco, trigo e tremoço, e são atualmente utilizados pela indústria alimentar para fins de rastreio (Monaci *et al.*, 2010). Na Tabela 3 estão resumidas algumas aplicações de ELISA descritas na bibliografia para a detecção e quantificação de alergénios o tremoço.

Tabela 3 - Metodologias de ELISA para a detecção e quantificação de alergénios do tremoço.

Método	Anticorpo/ proteína alvo	Matriz alimentar	LOD	LOQ	Referência
			(mg proteína kg ⁻¹)		
ELISA-Sandwich	Anticorpos de coelho	Pão de cachorro-quente, salsicha vegetariana, massas, chocolate.	0,1	0,4	Holden <i>et al.</i> (2005)
ELISA-Sandwich	Anticorpos de coelho	Bolos, pão, massa, pasta de chocolate, biscoitos, farinha e batatas fritas.	1		Holden <i>et al.</i> (2007)
ELISA-Sandwich	Anticorpos de coelho e ovelha	Muffins de milho e salsichas.		1	Kaw <i>et al.</i> (2008)
ELISA-Sandwich	Anticorpos de coelho e galinha	Pão, macarrão, biscoitos integrais, tostas, rissóis vegetarianos e tofu.	0,1 - 0,6	0,5 - 1,7	Ecker <i>et al.</i> (2012)
ELISA-competivo (IgG)	Anticorpos de coelho e galinha	Pão, macarrão, biscoitos integrais, biscoitos, rissóis vegetarianos e tofu.	5 - 20	26 - 68	Ecker <i>et al.</i> (2013)
ELISA-competivo (IgY)			3 - 34	4 - 79	

4.1.2 Métodos cromatográficos

A análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa tem sido amplamente utilizada para identificação e caracterização inequívoca de proteínas ou peptídeos alergénicos em alimentos, com potencial para a análise quantitativa (Poms *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2012a; Costa *et al.*, 2014). A identificação das proteínas por tecnologia MS é normalmente realizada com base na sua digestão com uma protease específica, vulgarmente tripsina. Os espectros de massa são registados após a separação dos fragmentos proteolíticos por cromatografia líquida de fase inversa (Harrer *et al.*, 2010). Considerando a diversidade de moléculas alergénicas, o processo de purificação é desenvolvido especificamente para garantir o reconhecimento inequívoco

da molécula através da geração de uma impressão digital de massa do péptido (Costa *et al.*, 2012a).

As tecnologias de MS apresentam várias vantagens que destacam a sua potencial aplicação para a deteção de alergénios, tais como a possibilidade de analisar analitos alvo com elevada sensibilidade, precisão, especificidade e reprodutibilidade (Picariello *et al.*, 2011). Além disso, possuem um potencial para a análise simultânea de múltiplos alergénios (Monaci *et al.*, 2009; Costa, 2012a). Apesar de todas as vantagens, o elevado custo do equipamento e a exigência de conhecimentos especializados são suscetíveis de restringir a ampla aplicação desta tecnologia.

Recentemente, foi efetuado um estudo sobre o desenvolvimento de métodos de MS para a deteção do tremço em alimentos. Mattarozzi *et al.* (2012) utilizaram a metodologia de espectrometria de massa por ionização por *electrospray* (LC-ESI-MS) para determinar os principais alergénios de tremço em massas e biscoitos. As concentrações detetadas foram em torno de 1 mg de tremço por kg.

4.2 Métodos baseados em ADN

Os métodos baseados na análise de ADN surgiram como alternativas eficazes na avaliação da autenticidade, permitindo ultrapassar algumas das dificuldades apresentadas pelas técnicas já existentes. Atualmente, as técnicas biomoleculares têm sido amplamente aplicadas no controlo de alimentos para consumo humano e animal, tanto a nível de deteção inequívoca de qualquer adulterante biológico como na identificação de espécies geneticamente relacionadas.

Os métodos de ADN aplicados na deteção de alergénios baseiam-se sobretudo na amplificação de sequências específicas por PCR, em que a especificidade e seletividade são conseguidas através da utilização de *primers* e sondas especificamente desenhados para um gene que codifica uma proteína alergénica ou outro marcador da espécie (Hengel, 2007; Costa *et al.*, 2012a). Os métodos baseados na técnica de PCR, que têm como alvo sequências de ADN específicas da espécie, oferecem alternativas adequadas para a deteção sensível de alergénios alimentares, permitindo a deteção de quantidades muito pequenas de ADN em matérias-primas e alimentos processados (Poms *et al.*, 2004; Mafra *et al.*, 2008a). Ultimamente, os métodos baseados em ADN têm sido cada vez mais utilizados como abordagens altamente sensíveis e específicas para a deteção e autenticação alimentos alérgenicos (Costa *et al.*, 2012a, Costa *et al.*, 2012b; Mafra *et al.*, 2008a; Galan *et al.*, 2010), tirando como vantagem a elevada estabilidade térmica de moléculas de ADN em comparação com proteínas. Além disso, cada vez mais se verifica

o desenvolvimento de métodos baseados na detecção de sequências de ADN que codificam proteínas alergénicas (Galan *et al.*, 2010).

4.2.1 PCR qualitativa

A descoberta e desenvolvimento da PCR são atribuídos a Kary Mullis, que em 1983, criou a técnica que veio revolucionar a Biologia Molecular. O seu impacto em diversas áreas como a medicina, biotecnologia, genética ou ciências forenses tem merecido um elevado destaque, essencialmente devido à sua versatilidade, especificidade e sensibilidade. Esta técnica tem sido utilizada com sucesso na identificação de microrganismos, na detecção de componentes em produtos alimentares e na identificação de espécies de vários animais e plantas (Rodríguez-Lazaro *et al.*, 2013).

A amplificação por PCR necessita essencialmente da presença de ADN que se pretende amplificar, um par de *primers*, nucleótidos (dNTP), Mg^{2+} (cofator da enzima), uma polimerase de ADN termoestável, como a *Taq* polimerase e o respetivo tampão. Os *primers* são os elementos que conferem a especificidade à técnica de PCR, quando desenhados de forma correta. A presença de dNTP é fundamental para a construção da nova cadeia dupla sintetizada pela ADN polimerase, e os iões Mg^{2+} estimulam a atividade da enzima polimerase e formam um complexo solúvel com os dNTP, para facilitar a síntese da nova cadeia de ADN.

Esta técnica consiste na amplificação exponencial de um fragmento de ADN específico, tendo como princípio a hibridação de oligonucleótidos específicos (*primers*) desenhados de forma a hibridarem em zonas opostas de cada uma das cadeias da sequência alvo (Mafrá *et al.*, 2008b, Rodríguez-Lazaro *et al.*, 2013). Para o desenho dos *primers*, é necessário obter alguma informação acerca da sequência de ADN a amplificar, de forma a permitirem a especificidade necessária à reação.

A técnica de PCR baseia-se em três etapas, envolvendo três temperaturas diferentes, ao longo das quais o número de sequências alvo cresce de forma exponencial, atendendo ao número de ciclos predefinidos (Figura 6) (Videira, 2001):

- i. **Desnaturação** – a uma temperatura de cerca de 94-95°C, favorecendo a separação do ADN alvo de cadeia dupla em cadeias simples;
- ii. **Hibridação** – a temperatura da reação baixa para 48-65°C durante 15 a 45 segundos, levando à ligação dos *primers* às moléculas de ADN de cadeia simples;
- iii. **Extensão** – a temperatura volta a subir até aos 72°C, favorecendo a ligação da *Taq* polimerase, que irá sintetizar as cadeias complementares a partir dos

primers. Esta etapa dura entre 30 segundos a alguns minutos, dependendo do comprimento dos fragmentos a amplificar.

O número de ciclos, composto pelas três etapas, repete-se geralmente entre 25 a 40 vezes, sendo possível aumentar em cada ciclo, duas vezes a concentração de ADN pré-existente (Lima *et al.*, 2003). A amplificação de uma sequência alvo e a verificação do seu tamanho por eletroforese em gel de agarose é a forma mais simples e rápida para efetuar uma análise qualitativa por PCR.

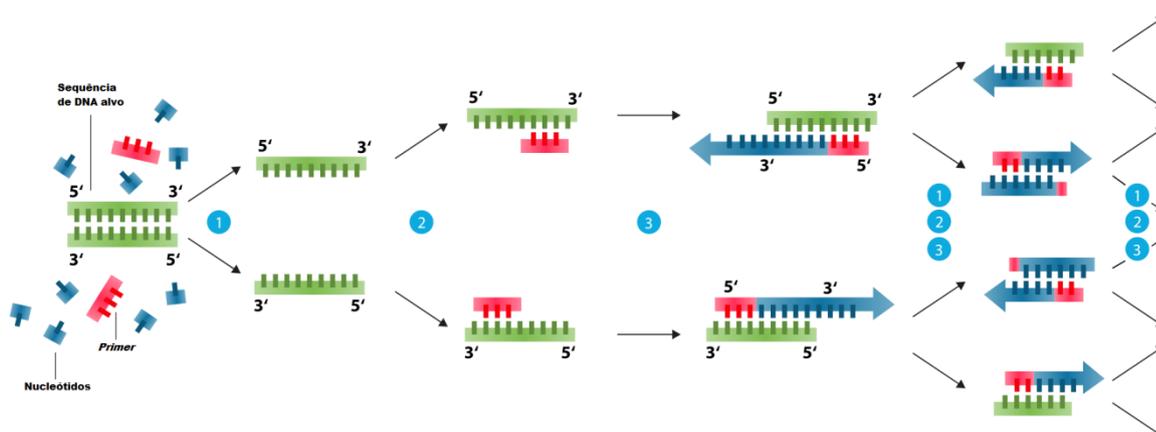


Figura 6 - Representação esquemática das três etapas de amplificação por PCR (1 – desnaturação, 2 – hibridação e 3 – extensão).

O uso de *primers*, desenhados especificamente, tornou possível o desenvolvimento de métodos de PCR adequados para avaliar a autenticidade dos alimentos de forma simples e direta, podendo assim ser aplicados no controlo e autenticidade de alimentos, mesmo em matrizes complexas (Fajardo *et al.*, 2010). Um fator limitante relacionado com esta técnica relaciona-se com o desenho adequado dos *primers*, e posterior avaliação da sua especificidade para testar a possibilidade de reação cruzada. Para além disso, o desenvolvimento da PCR com *primers* específicos permitiu a identificação de espécies, sem recorrer à sequenciação ou à digestão dos produtos da PCR com enzimas de restrição (Martín, 2007).

Os métodos de PCR multiplex também se podem apresentar como sendo ferramentas valiosas para indicar a presença de alergénios, quando necessário o rastreio de vários alvos de diversos alimentos alergénicos, como por exemplo tremçoço e soja (Galan *et al.*, 2010). Baseia-se no mesmo princípio da PCR com *primers* específicos, em que a diferença reside no facto de poder amplificar múltiplas sequências em simultâneo, conferida pela presença de mais do que um par de *primers* específicos na reação. Assim, a técnica torna-se vantajosa quando o objetivo do estudo consiste na identificação de

várias espécies (Schöringhumer *et al.*, 2009). Esta técnica, utilizada em autenticidade, é executada muito rapidamente, uma vez que todas as análises são feitas em simultâneo, sendo menos dispendiosa, produzindo menos erros e permitindo uma melhor análise de resultados (Schöringhumer *et al.*, 2009; Zha *et al.* 2011).

4.2.2 PCR em tempo real

A PCR em tempo real surgiu de forma a ultrapassar as dificuldades e limitações inerentes à PCR convencional, sendo amplamente aceite como um ensaio robusto, devido à sua maior sensibilidade e especificidade, maior gama de deteção, menor risco de contaminação, com menor probabilidade de reatividade cruzada, fácil execução e rapidez (Monaci *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2012b). O procedimento segue o princípio geral da PCR, mas a sua principal característica consiste na capacidade de monitorizar o progresso de amplificação à medida que este decorre. Elimina-se assim a necessidade de manipulação pós-PCR, nomeadamente a eletroforese, reduzindo assim o risco de contaminação, a coloração e revelação do gel de agarose, o que contribui para a diminuição do tempo de análise (Fajardo *et al.*, 2008, Rodriguez-Lazaro *et al.*, 2013).

Atualmente, existem dois formatos para correlacionar a quantidade dos produtos da PCR com o sinal de fluorescência: sondas e corantes fluorescentes (Fajardo *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2013). As sondas podem ser de hidrólise (TaqMan™), de hibridação ou FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) e de interação específica (Molecular Beacons™) (Yan *et al.*, 2013). Já o corante mais comum é o fluoróforo SYBR Green I, não sendo tão dispendioso como o uso das sondas (Yan *et al.*, 2013). A forma mais simples de efetuar a PCR em tempo real consiste na utilização de um corante universal como o SYBR Green I, uma vez que os produtos da PCR são detetados pela sua ligação à cadeia dupla de ADN (Yan *et al.*, 2013) (Figura 7). Recentemente, surgiram os chamados corantes de nova geração, como o EvaGreen, com maior potencial de fluorescência, maior estabilidade e maior especificidade para as cadeias duplas de ADN (Mohamad, *et al.* 2013).

A especificidade da fluorescência emitida em PCR em tempo real é, no entanto, superior quando se opta pelo uso de sondas específicas para o fragmento alvo, uma vez que a sonda funciona como um “terceiro primer”, alinhado com os primers forward e reverse (Mohamad *et al.* 2013). A especificidade adicional proporcionada pela presença da sonda do tipo TaqMan™ (Figura 8) assegura que o sinal fluorescente gerado durante o ensaio seja apenas resultante da amplificação da sequência alvo (Smith *et al.*, 2009). A sonda consiste num oligonucleótido complementar à sequência alvo que contém

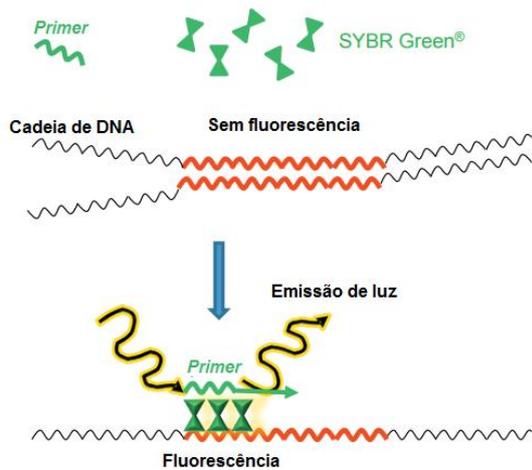


Figura 7 - Princípio de detecção por PCR em tempo real utilizando o corante SYBR Green I. Adaptado de Rodriguez-Lazaro *et al.* (2013).

simultaneamente um fluoróforo, que imite fluorescência quando excitado, e um *quencher*, que anula esta emissão quando está perto do fluoróforo (Smith *et al.*, 2009). No caso das sondas de hidrólise TaqMan™, a atividade 5'-exonucleotídica da *Taq* polimerase provoca a separação física entre o fluoróforo e o *quencher*, havendo por isso aumento da emissão de fluorescência à medida que vai havendo amplificação e aumento da quantidade de produto de PCR (Smith *et al.*, 2009) (Figura 8).

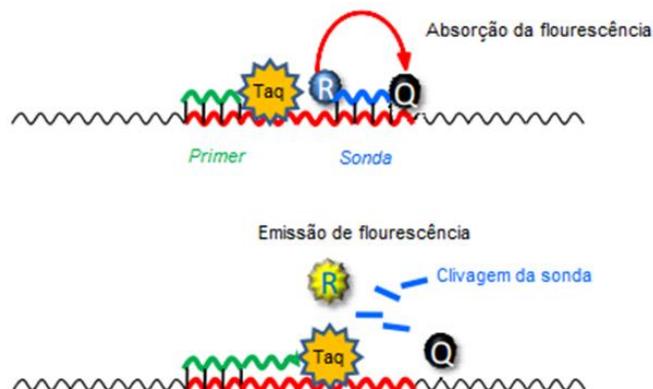


Figura 8 - Princípio de detecção por PCR em tempo real utilizando sondas de TaqMan. TAQ – Taq Polimerase. R – Fluoróforo; Q – *quencher*. Adaptado de Rodriguez-Lazaro *et al.* (2013).

As sondas Molecular Beacons ou primers Scorpion exploram interações específicas entre o amplicão e a sonda. Quando ocorre a separação entre o fluoróforo e o quencher, existe a emissão de um sinal de fluorescência e a sua detecção. Um aumento de produtos amplificados ao longo de cada ciclo leva, assim, a um aumento proporcional da fluorescência (Yan *et al.*, 2013).

Existem ainda outras estratégias, como é o caso da tecnologia FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), em que são usadas duas sondas, cada uma com um fluoróforo. O princípio desta tecnologia é a transferência de energia de um fluoróforo doador para um receptor. Quando os dois fluoróforos estão próximos um do outro ocorre, então, a transferência de energia e a consequente emissão de fluorescência (Garcia-Canas *et al.*, 2010).

À medida que a amplificação ocorre, a emissão de fluorescência é proporcional à quantidade de ADN sintetizado, resumindo-se num gráfico semi-logarítmico em que se representa o aumento do sinal em função do número de ciclos. Na Figura 9 encontra-se representada uma curva de amplificação obtida durante a reação. Esta é composta por três fases (Smith *et al.*, 2009):

- i. Fase *lag* – Corresponde aos primeiros ciclos em que não existe produto detetado, uma vez que o sinal de fluorescência está abaixo do limite de deteção do aparelho e a emissão de fluorescência é camuflada pelo ruído do aparelho;
- ii. Fase exponencial – Aumento acentuado de fluorescência, proporcional à quantidade de ADN que está a ser amplificado;
- iii. Fase “*plateau*” – Nesta fase os reagentes estão esgotados e não se observa aumento da fluorescência.

É durante a fase exponencial que a quantidade de ADN pode ser determinada recorrendo ao parâmetro Ct (*Cycle threshold*), ou seja, quando a amplificação atinge a eficiência máxima, sendo a quantificação menos afetada por condições limitantes da reação (Rodriguez-Lazaro *et al.*, 2013). Considera-se que o Ct seja o número de ciclos a partir dos quais a acumulação de fluorescência é significativamente superior ao ruído (Smith *et al.*, 2009). Este valor está inversamente relacionado com a concentração inicial de ADN alvo, no início da reação. Assim, o valor de Ct corresponde ao número de ciclos necessários para que seja detetado pela primeira vez o sinal de fluorescência, sendo determinado pela interseção da curva de amplificação com a linha *threshold* (Figura 9). À medida que o número de ciclos aumenta, a eficiência da amplificação diminui, resultando no efeito *plateau* (Rodriguez-Lazaro *et al.*, 2013).

A quantificação de uma amostra desconhecida pode efetuar-se tanto a nível absoluto como relativo. A quantificação absoluta pode ser realizada por interpolação dos valores de Ct numa curva de calibração de uma série de diluições de uma concentração conhecida de ADN. Posteriormente, uma curva de calibração é construída através dos valores de Ct obtidos para cada diluição em função do logaritmo da quantidade de ADN, ou seja, a quantificação é feita por interpolação dos valores de Ct obtidos nas diferentes diluições (Mohamad *et al.*, 2013).

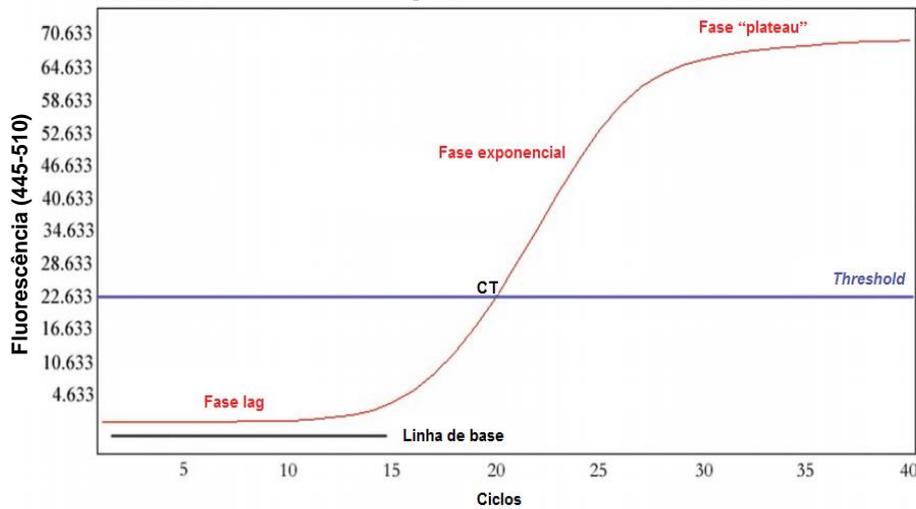


Figura 9 - Fases da curva de amplificação por PCR em tempo real. Linha vermelha: curva de amplificação de uma amostra positiva. Linha azul: *Threshold*. Linha preta: linha de base dos ciclos. Adaptado de Rodriguez-Lazaro *et al.* (2013).

4.3 Aplicação das técnicas de PCR na detecção de tremço em alimentos

Das técnicas referidas na literatura para a detecção de tremço como alergénio em alimentos, destaca-se a técnica de PCR em tempo real. Demmel *et al.* (2008) desenvolveram um método de PCR em tempo real com alvo na região do ITS1 de *L. angustifolius* para a detecção de tremço em alimentos, com uma sensibilidade absoluta de 0,01 pg de ADN de tremço e sensibilidade relativa de 0,1 mg kg⁻¹ (Tabela 4). O ensaio mostrou-se adequado para a análise de uma diversidade de matrizes alimentares e foi suficientemente sensível para detetar com êxito a presença ou ausência de ADN do tremço (Demmel *et al.*, 2008). Mais tarde, Demmel *et al.* (2011) verificaram o efeito do processamento na detecção de tremço utilizando a mesma técnica. Para tal, confeccionaram massas de *pizza* contendo entre 0,01 e 10 mg kg⁻¹ de farinha de tremço, tendo congelado e cozido parte dessas massas. A análise das massas permitiu-lhes concluir que o limite de detecção aumenta com o tratamento térmico (Tabela 4) (Demmel *et al.*, 2011). Dada a importância da quantificação de alergénios do tremço, o mesmo grupo de investigadores (Demmel *et al.*, 2012) demonstrou a aplicabilidade da técnica de PCR em tempo real na quantificação de tremço entre 1 e 10 mg kg⁻¹, que considerou a gama relevante para os consumidores alérgicos.

Tabela 4 - Metodologias baseadas na análise de ADN reportadas para a deteção e quantificação de tremço em alimentos.

Método	Gene/região alvo	Especificidade	Material de referência	Sensibilidade	Aplicação	Referência
PCR em tempo real com sondas TaqMan	ITS1 (<i>L. angustifolius</i>) (Z72202)*	<i>Lupinus</i> spp.	Gelado comercial com farinha do tremço (0,1-100 mg kg ⁻¹)	0,1 mg kg ⁻¹ .	Diversos alimentos processados (pão, gelado, gomas, bolos, etc.)	Demmel <i>et al.</i> (2008)
			Base de pizza produzida com farinha de trigo contendo 0,01-10 mg kg ⁻¹ de farinha de tremço	0,1 mg kg ⁻¹ (pizza crua) 1 mg kg ⁻¹ (pizza cozida)	Massa de pizza crua, congelada e cozida	Demmel <i>et al.</i> (2011)
			Farinha de trigo contendo 1-5 mg kg ⁻¹ de farinha de tremço	Quantificação entre 1-10 mg kg ⁻¹	Misturas de farinhas de tremço e trigo	Demmel <i>et al.</i> (2012)
PCR em tempo real com SYBR Green	CyA32 que codifica Lup a γ -conglutina (CAC16394)*	<i>Lupinus</i> spp.	Farinha de tremço em alimentos 0,1-100%	7 pg de ADN de tremço <0,1% (farinha de tremço em alimentos)	Biscoitos, pão, <i>snacks</i> , flocos de cereais	Scarafoni <i>et al.</i> (2009)
PCR qualitativa	Lup an α -conglutina (U74384)*	<i>L. albus</i> , <i>L. angustifolius</i>	Biscoitos produzidos com farinha de trigo contendo 1-50 mg kg ⁻¹ de farinha de tremço	1 pg de ADN de tremço	Biscoitos crus e tostados	Galan <i>et al.</i> (2010)
PCR em tempo real com sondas TaqMan	Lup an δ -conglutina (X53523)*			10 mg kg ⁻¹	Biscoitos crus e tostados, alimentos vegetarianos, pão biscoitos	
PCR em tempo real com sondas TaqMan	tARN-MET mitocondrial (X04377)*	<i>L. angustifolius</i>	Biscoitos produzidos com farinha de trigo contendo 1-50 mg kg ⁻¹ de farinha de tremço	1 pg de ADN de tremço 2,5 mg kg ⁻¹	Pão, produtos de pastelaria, alimentos vegetarianos	Galan <i>et al.</i> (2011)
PCR em tempo real com sondas TaqMan	Lup an 1 β -conglutina (HQ670415.1, EF455724.1, DQ142920.1)*	<i>L. albus</i> , <i>L. angustifolius</i> , <i>L. luteus</i>	Sementes de <i>L. albus</i> , <i>L. angustifolius</i> , <i>L. luteus</i>	1 mg kg ⁻¹ (obtido por equivalente de diluição seriada)	Não aplicado	Röder <i>et al.</i> (2013)

Scarafoni et al. (2009) desenvolveram um método de PCR em tempo real com alvo no gene CyA32 que codifica uma γ -conglutina de *L. albus* e utilização do corante universal SYBR Green. O ensaio permitiu a detecção de 7 pg de ADN do tremço e 0,1% de farinha de tremço em alimentos (Tabela 4). Galan et al., (2010) desenvolveram dois métodos de PCR em tempo real baseados em sondas de hidrólise do tipo TaqMan de forma a detetar as sequências α - e β -conglutina de *L. angustifolius*, tendo determinado uma sensibilidade relativa de 10 mg kg⁻¹ numa matriz de biscoitos para ambos os casos. Por PCR qualitativa com alvo nos dois genes, os mesmos autores conseguiram detetar 1 pg de ADN de tremço em matrizes cruas e processadas (Tabela 4). (Galan et al., 2010). Mais recentemente, o mesmo grupo de investigadores (Galan et al., 2011) desenvolveu um terceiro método de PCR em tempo real com alvo no gene iniciador tARN-MET mitocondrial que lhe permitiu melhorar a sensibilidade relativa para 2,5 mg kg⁻¹.

Röder et al. (2013) desenvolveram um novo ensaio de PCR em tempo real com alvo no gene da β -conglutina de *L. angustifolius* para a detecção de tremço e compararam a sua aplicação em 14 cultivares das três espécies *L. angustifolius*, *L. luteus* e *L. albus*. Estes autores compararam ainda a aplicação dos métodos propostos por Demmel et al. (2008), Galan et al. (2011) e Scarafoni et al. (2009) na amplificação das referidas cultivares de *Lupinus* spp. e demonstraram que, dependendo do método, podem-se observar grandes diferenças nas respostas quantitativas, pelo que a otimização dos métodos de detecção de alergénios de plantas deverá incluir várias cultivares.

Além disso, existem métodos que combinam as metodologias PCR e ELISA e que foram desenvolvidos para a detecção de alergénios alimentares de forma a atender aos requisitos de rotulagem impostos pela legislação (Holzhauser et al., 2002). A metodologia PCR-ELISA combina a elevada especificidade baseada na análise de ADN com a sensibilidade de ELISA, como abordagem bastante simples e económica para análise semi-quantitativa.

5 OBJETIVOS E ÂMBITO DO TRABALHO

Devido ao elevado valor comercial do tremço que, comparativamente à soja, é um dos alimentos mais nutritivos do mundo, e com a sua crescente utilização como alimento e até mesmo como ingrediente em diversos alimentos processados em toda a Europa, EUA e Austrália, tem vindo a refletir-se num aumento de casos de origem alérgica induzida pelo tremço. Desta forma, a ingestão de quantidades muito baixas deste alimento pode provocar reações imunológicas adversas, variando em grau de intensidade (leves a potencialmente fatais). De modo a proteger a saúde dos consumidores sensibilizados, ou até mesmo o direito de escolha de um produto alimentar em detrimento de outro, a informação da rotulagem e verificação da sua conformidade são de especial relevância. Assim, torna-se essencial o desenvolvimento de métodos que permitam a avaliação da autenticidade de alimentos e a deteção de potenciais alérgicos, como o caso do tremço.

Pretendeu-se com este trabalho desenvolver metodologias de PCR e PCR em tempo real para a deteção específica e sensível de espécies de tremço (*Lupinus spp.*) em alimentos. Para o desenvolvimento das metodologias e na ausência de materiais de referência foi necessário, numa primeira fase, preparar misturas binárias contendo farinhas de tremço e arroz e farinhas de tremço e trigo. A etapa subsequente consistiu em extrair o ADN das misturas de referência e amostras comerciais em estudo. Dado o objetivo deste trabalho centrar-se no desenvolvimento de novas metodologias com base na PCR, foi necessário proceder ao desenho de novos *primers* e sonda; no caso de PCR em tempo real, com alvo em genes que codificam proteínas alérgicas e só posteriormente se passou à etapa de otimização das condições experimentais de modo a obter a sensibilidade e especificidade adequadas.

Por fim, procedeu-se à aplicação das metodologias qualitativa (PCR com *primers* específicos) e quantitativa (PCR em tempo real) com alvo na deteção de espécies de tremço (*Lupinus spp.*) nas amostras comerciais adquiridas.

COMPONENTE EXPERIMENTAL

6 METODOLOGIA

6.1 Descrição das amostras

Neste estudo, foram utilizadas 27 amostras de alimentos comerciais adquiridos em Novembro de 2014. Tentou-se abranger uma larga variedade de produtos à base de tremço. Contudo, dada a ainda recente introdução desta leguminosa na dieta alimentar, em substituição de outros ingredientes, a escolha dos produtos foi um pouco limitada. Atualmente o tremço, como ingrediente, está associado, geralmente, a produtos dietéticos e sem glúten. Na Tabela 5 estão descritas as amostras e respetivas informações disponíveis nos rótulos de todos os produtos adquiridos comercialmente (Figura 10).



Figura 10 - Algumas amostras comerciais testadas neste trabalho.

Neste estudo, também foram utilizadas sementes de tremço de diferentes espécies e variedades, gentilmente cedidas pelo Banco de Germoplasma da Universidade de Arizona (Boyce Thompson Arboretum, Az, USA) e pela empresa Germisem (Tabela 6). Estas sementes foram particularmente importantes na otimização dos métodos de deteção desenvolvidos, sendo utilizadas como controlos positivos nas PCR, tanto a nível qualitativo como quantitativo.

Tabela 5 – Descrição dos alimentos adquiridos comercialmente para o presente trabalho.

Cod.	Descrição	Marca	Presença de tremçoço	Notas
TR03	Bolachas de alperce (Aprokosen Kekes)	3 PAULY	Sem adição de tremçoço.	Iseto de lactose.
TR04	Pão clássico del mastro panettiere	Schär	Pode conter vestígios de tremçoço.	Iseto de glúten e lactose.
TR05	Pão de cereais fatiado (Cereale del mastro panettiere du maître boulanger)	Schär	Pode conter vestígios de tremçoço.	Iseto de glúten e lactose.
TR06	Pão rústico com cereais	Schär	Pode conter vestígios de tremçoço.	Iseto de glúten e lactose.
TR07	Bolo (Marble cake)	Schär	Pode conter vestígios de tremçoço	Iseto de glúten e lactose
TR08	Queques (Plum cake Yogo Cake)	Schär	Pode conter vestígios de tremçoço	Iseto de glúten.
TR09	Bolachas frollini	Schär	Pode conter vestígios de tremçoço.	Iseto de glúten e lactose.
TR10	Bolachas Petit biscotto classico	Schär	Pode conter vestígios de tremçoço.	Iseto de glúten.
TR11	Bolachas Biscotti con cioccolato	Schär	Pode conter vestígios de tremçoço.	Iseto de glúten.
TR12	Bolachas Sorrisi	Schär	Pode conter vestígios de tremçoço.	Iseto de glúten.
TR13	Biscoitos de Tremçoço.	CEM PORCENTO	Farinha de tremçoço.	Produto dietético.
TR14	Sortido de bolachas Noblesse	HF – HANS FREITAG	Farinha de tremçoço doce.	
TR15	Pão de forma (Pan Carré)	Schär	Proteína de tremçoço.	Iseto de glúten e lactose.
TR16	Pão torrado (Crostini)	Schär	Proteína de tremçoço.	Iseto de glúten e lactose.
TR17	Bolachas de tremçoço integrais com sabor a limão	CEM PORCENTO	Farinha de tremçoço	Produto dietético.
TR18	Bolachas (Spekulatius)	Schär	Farinha de tremçoço	Iseto de glúten e lactose.
TR19	Bolachas delícias com chocolate	Beiker	Pode conter vestígios de tremçoço.	Iseto de glúten.
TR20	Bolacha Maria (Plain biscuits)	Schär	Pode conter vestígios de tremçoço	Iseto de glúten.
TR21	Pão ralado (Pan gratí)	Schär	Pode conter vestígios de tremçoço.	Iseto de glúten e lactose.
TR22	Bolachas (Fior di Sole)	Schär	Pode conter vestígios de tremçoço.	Iseto de glúten e lactose.
TR23	Farinha (Mix Pan – Mix B)	Schär	Proteína de tremçoço.	Iseto de glúten e lactose.
TR24	Sortido de bolachas Day dreams	HF – HANS FREITAG	Farinha de tremçoço doce.	
TR25	Sortido de bolachas Desiree	HF – HANS FREITAG	Farinha de tremçoço doce.	
TR26	Panados recheados com tomate e queijo congelados (Panzerottini)	Schär	Proteína de tremçoço.	Iseto de glúten.
TR27	Rolos de Waffers	HF – HANS FREITAG	Pode conter vestígios de tremçoço.	
TR28	Waffers recheados com chocolate	HF – HANS FREITAG	Farinha de tremçoço doce.	
TR29	Waffers com creme	HF – HANS FREITAG	Farinha de tremçoço doce.	
TR30	Farinha de tremçoço branco (<i>Lupinus albus</i>)	Biosagesse	100%.Farinha de tremçoço	Iseto de glúten.

Tabela 6 - Diferentes espécies de tremço utilizadas neste estudo.

Código da amostra	Espécie	Código do Banco de Germoplasma
TR01	<i>Lupinus albus</i>	a
TR02	<i>Lupinus luteus</i>	a
TR31	<i>Lupinus angustifolius</i>	0078690
TR32	<i>Lupinus mutabilis</i>	90-0580D
TR33	<i>Lupinus mutabilis</i>	90-0581D
TR34	<i>Lupinus albus</i>	91-0035D
TR35	<i>Lupinus albus</i>	91-0023D
TR36	<i>Lupinus luteus</i>	90-0578D
TR37	<i>Lupinus luteus</i>	90-0579D

a – Sementes cedidas pela empresa Germisem.

6.2 Preparação das amostras

A preparação das amostras incluiu uma etapa prévia de descontaminação de todos os materiais. Esta etapa teve como principal objetivo evitar contaminações cruzadas entre as amostras analisadas. Nesse sentido, preparou-se uma solução de hipoclorito de sódio de forma a esterilizar quimicamente todo o material utilizado, durante cerca de 30 minutos.

De forma a minimizar possíveis contaminações, as amostras e misturas de referência foram homogeneizadas num moinho de laboratório (Grindomix, GM200, Retsch, Haan, Alemanha), com acessórios independentes e esterilizados. Devido às baixas quantidades de grãos de tremço as amostras TR31, TR32, TR33, TR34, TR35, TR36 e TR37 foram trituradas num almofariz, utilizando também material descontaminado entre cada uma das sementes. Devido à elevada dureza, as sementes TR01 e TR02 foram trituradas num moinho adequado para farinha com granulometria 0,1 mm (MFC-90D MicroHammer Mill (Culatti, Zurique, Suíça)). Todas as amostras/sementes/misturas de referência foram armazenadas em recipientes esterilizados e devidamente identificados a uma temperatura de -20°C.

As extrações de ADN e as misturas de PCR foram realizadas em locais diferentes. As misturas para PCR foram efetuadas numa sala equipada com luz UV para esterilização/descontaminação do ambiente e do material da sala. Os tubos utilizados na extração de ADN e preparação de PCR (ADNse/ARNse free) foram esterilizados por autoclavagem a 121°C e as pontas com filtro foram adquiridas esterilizadas e “ADNse/ARNse free”. Os reagentes aquosos, exceto os *primers*, dNTP e enzimas, foram sujeitos a autoclavagem a 121°C, com o objetivo de degradar possíveis nucleases e ADN

presentes. Além disso, todas as soluções foram preparadas com reagentes aptos para a utilização em biologia molecular, sendo as destinadas a PCR armazenadas em pequenas alíquotas, de forma a evitar contaminações do reagente. O uso constante e a mudança periódica de luvas também foram imprescindíveis.

6.3 Preparação das misturas de referência

De forma a desenvolver e otimizar o método de detecção de tremoço, foi necessário preparar uma série de misturas de referência que consistiram em homogeneizar quantidades conhecidas de farinha de tremoço em farinha de arroz através do moinho de lâmina dupla, de acordo com as quantidades da Tabela 7.

Tabela 7 - Misturas binárias de farinha de tremoço com farinha de arroz utilizadas como materiais de referência.

Padrões	Concentração de tremoço	Massas usadas
TA00	0%	100 g Arroz
TA01	50% (500 g kg ⁻¹)	50 g Tremoço + 50 g de Arroz
TA02	10% (100 g kg ⁻¹)	20 g TA01 + 80 g Arroz
TA03	5% (50 g kg ⁻¹)	60 g TA02 + 60 g Arroz
TA04	2% (20 g kg ⁻¹)	50 g TA03 + 75 g Arroz
TA05	1% (10 g kg ⁻¹)	60 g TA04 + 60 g Arroz
TA06	0,8% (8 g kg ⁻¹)	80 g TA05 + 20 g Arroz
TA07	0,5% (5 g kg ⁻¹)	50 g TA06 + 30 g Arroz
TA08	0,2% (2 g kg ⁻¹)	40 g TA07 + 60 g Arroz
TA09	0,1% (1 g kg ⁻¹)	50 g TA08 + 50 g Arroz
TA10	0,05% (500 g kg ⁻¹)	50 g TA09 + 50 g Arroz
TA11	0,02% (200 g kg ⁻¹)	40 g TA10 + 60 g Arroz
TA12	0,01% (100 g kg ⁻¹)	40 g TA11 + 40 g Arroz
TA13	0,005% (50 g kg ⁻¹)	40 g TA12 + 40 g Arroz
TA14	0,001% (10 g kg ⁻¹)	20 g TA13 + 80 g Arroz
TA15	0,0005% (5 g kg ⁻¹)	30 g TA14 + 30 g Arroz
TA16	0,0001% (1 g kg ⁻¹)	10 g TA15 + 30 g Arroz
TA17	100%	100 g Tremoço

Além das misturas binárias de referência de farinha de tremoço em farinha de arroz, também foram preparadas misturas de referência utilizando farinha de tremoço em farinha de trigo. Estas misturas de farinhas foram efetuadas de forma a poderem ser utilizadas na preparação de produtos de padaria e avaliar-se assim o efeito do

processamento na matriz (Tabela 8). Entre cada mistura foram pesados 300 g do respectivo padrão de referência e o restante foi armazenado em recipientes esterilizados. Seguidamente foram pesados e misturados os ingredientes necessários para a cozedura das misturas de farinha para a confeção de pão de acordo com a Tabela 9.

A cozedura da massa foi efetuada numa máquina para pão Moulinex OW6101, durante 3 horas (Figura 11). Após arrefecimento, cortaram-se os pães ao meio e fatiou-se uma tira, no centro do pão, de forma a uniformizar a amostragem, que foi triturada no moinho de lâmina dupla e armazenada em recipientes esterilizados a -20°C.

Tabela 8 - Misturas binárias de farinha de tremço com farinha de arroz utilizadas como materiais de referência (TT00-TT16) e em preparação de pão (PTT00-PTT16)

Padrões	Concentração de tremço	Massas usadas
TT00 / PTT00	0%	100 g Trigo
TT01 / PTT01	50% (500 g kg ⁻¹)	200 g Tremço + 200 g de Trigo
TT02 / PTT02	10% (100 g kg ⁻¹)	80 g TT01 + 400 g Trigo
TT03 / PTT03	5% (50 g kg ⁻¹)	160 g TT02 + 320 g Trigo
TT04 / PTT04	2% (20 g kg ⁻¹)	150 g TT03 + 375 g Trigo
TT05 / PTT05	1% (10 g kg ⁻¹)	180 g TT04 + 360 g Trigo
TT06 / PTT06	0,8% (8 g kg ⁻¹)	220 g TT05 + 275 g Trigo
TT07 / PTT07	0,5% (5 g kg ⁻¹)	175 g TT06 + 280 g Trigo
TT08 / PTT08	0,2% (2 g kg ⁻¹)	140 g TT07 + 350 g Trigo
TT09 / PTT09	0,1% (1 g kg ⁻¹)	160 g TT08 + 320 g Trigo
TT10 / PTT10	0,05% (500 g kg ⁻¹)	155 g TT09 + 310 g Trigo
TT11 / PTT11	0,02% (200 g kg ⁻¹)	140 g TT10 + 350 g Trigo
TT12 / PTT12	0,01% (100 g kg ⁻¹)	150 g TT11 + 300 g Trigo
TT13 / PTT13	0,005% (50 g kg ⁻¹)	130 g TT12 + 260 g Trigo
TT14 / PTT14	0,001% (10 g kg ⁻¹)	75 g TT13 + 375 g Trigo
TT15 / PTT15	0,0005% (5 g kg ⁻¹)	125 g TT14 + 250 g Trigo
TT16 / PTT16	0,0001% (1 g kg ⁻¹)	55 g TT15 + 275 g Trigo

Tabela 9 - Ingredientes utilizados na preparação dos pães.

Ingrediente	Quantidade (g)
Farinha	300
AÁgua	180
Melhorante	3
Sal	4,5
Fermento de padeiro	6



Figura 11 - Pães confeccionados a partir das misturas de farinha de tremçoço e farinha de trigo.

6.4 Extração de ADN

6.4.1 Reagentes e soluções

a) Tampão de extração TNE

Pesou-se 1 g de dodecilsulfato de sódio (SDS) para um gobelé, ao qual foram adicionados 70 mL de água ultrapura. Essa solução foi colocada em agitação magnética onde, seguidamente, foram adicionados 1 mL da solução Tris-HCl (1 M), 3 mL da solução de NaCl (5 M) e 0,4 mL da solução de EDTA (500 mM). Após acertar o pH para 8, com NaOH ou HCl, completou-se o volume até 100 mL, num balão volumétrico, com água ultrapura e autoclavou-se a solução durante 15 minutos a 121°C.

b) Solução de Hidroclorato de Guanidina (GuHCl) 5 M

Dissolveram-se 4,78 g de GuHCl num gobelé e completou-se o volume de 100 mL em balão volumétrico com água ultrapura. Esta solução foi posteriormente autoclavada durante 15 minutos a 121°C.

c) Solução de Proteinase K (20 mg mL⁻¹)

Num tubo de reação (2 mL) dissolveram-se 20 mg de Proteinase K em 1 mL de água ultrapura, que seguidamente armazenou-se a uma temperatura de -20°C.

d) Tampão TE 0,1x

Para obter a solução TE 1x adicionaram-se 0,5 mL de solução Tris (1 M) e 0,1 mL de EDTA (0,5 M), completando-se o volume até 50 mL com água desionizada. A solução TE 0,1x obteve-se por diluição da solução TE 1x em água desionizada. Posteriormente, a solução foi autoclavada a 121°C durante 15 minutos.

e) Tampão SGTB 1x

Adicionaram-se 100 mL de SGTB 20x (GRiSP Research Solutions, Porto, Portugal) até perfazer 2 L com água desionizada.

f) Solução de dNTP (10mM)

Juntaram-se 50 µL de cada dNTP com 1800 µL de água ultrapura. De seguida armazenou-se a solução a -20°C.

g) Tampão de carregamento 6x

Dissolveram-se 10 g de sacarose e 5 mg de azul de bromofenol em cerca de 5 mL de água desionizada. Adicionaram-se 2,4 mL de solução de EDTA (0,5 M) e completou-se o volume até 10 mL. Autoclavou-se e armazenou-se a -20°C.

6.4.2 Método Wizard

A extração de ADN pelo método *Wizard* foi realizada segundo o descrito por Mafra *et al.*, (2008b), que consistiu na utilização parcial do kit de extração *Wizard[®] Plus Minipreps* (Promega, Madison, WI, EUA).

Inicialmente, foram pesados cerca de 100 mg de cada amostra para tubos de reação esterilizados, de 2 mL. Posteriormente foram adicionados 860 µL do tampão de extração TNE, que está relacionado com a lise celular e precipitação das proteínas, 100 µL de solução de GuHCl 5 M, que permite a desnaturação das proteínas e 40 µL de uma solução de proteínase K (20 mg mL⁻¹), utilizada na digestão enzimática. Após agitação vigorosa por vórtex, incubou-se durante 1 h a 65°C num termobloco (Eppendorf Thermomixer Comfort, Hamburg, Alemanha) com uma agitação de 900 rpm. Durante este período, cada tubo de reação sofreu agitação vigorosa periódica, com o objetivo de aumentar o rendimento de extração do ADN. A suspensão obtida foi centrifugada durante 15 min a 4°C a uma velocidade 17.000 x *g*. Após a centrifugação, pipitou-se o máximo de sobrenadante, cerca de 700 µL, para um novo tubo de reação de 1,5 mL estéril, que foi submetido a uma segunda centrifugação durante 5 min, nas condições mencionadas anteriormente. Pipitou-se, novamente, o máximo de sobrenadante para novo tubo de reação esterilizado de 2 mL, adicionou-se 1 mL de resina de purificação de ADN *Wizard[®]* (Promega, Madison, WI, EUA) e misturou-se por inversão. A mistura da resina e amostra foi eluída recorrendo às colunas do Kit *Wizard[®] Plus Minipreps ADN Purification System* e utilizando um êmbolo de uma seringa de 2 mL. Esta coluna foi lavada, com 2 mL de solução de isopropanol (80%, v/v). Posteriormente, de forma a eliminar resíduos de isopropanol na coluna, efetuou-se uma centrifugação a 10.000 x *g* durante 2 minutos,

ficando a repousar cerca de 5 minutos, garantindo a sua secagem. De seguida, as colunas foram colocadas em tubos de reação de 1,5 mL esterilizados e o ADN que ficou retido nas partículas de sílica foi eluído através de 100 μ L de tampão TE 0,1x, previamente aquecido a 70°C. Por último, após 1 min de incubação, o ADN foi eluído por centrifugação durante 1 min a 10.000 x g obtendo-se, assim, o extrato final de ADN.

Em cada extração foi efetuado um branco de forma a controlar eventuais contaminações durante o processo. Todos os extratos de ADN foram armazenados a -20°C.

6.4.3 Método Nucleospin Food

Inicialmente foram pesados cerca de 100 mg de cada amostra para tubos de reação esterilizados, de 2 mL, aos quais se adicionaram 600 μ L do tampão de lise CF pré-aquecido a 65°C e 10 μ L de solução de proteinase K, de forma a promover a lise celular. Seguidamente os tubos foram incubados a 65°C, num termobloco pré-aquecido, durante 60 minutos, a uma rotação de 900 rpm. A cada 15 min efetuou-se uma agitação vigorosa, num vortex, com o objetivo de aumentar o rendimento de extração do ADN. Após incubação, adicionaram-se 2 μ L de solução de ARNase (2 ou 5 ng μ L⁻¹), misturou-se por inversão e incubou-se no mesmo termobloco a 37°C durante 5 min. Centrifugou-se de imediato a 17.000 x g durante 15 min (4°C), recolhendo-se o sobrenadante para tubos estéreis de 1,5 mL, seguida de nova centrifugação durante 5 min nas condições anteriores. Ao sobrenadante recolhido adicionou-se um volume idêntico do tampão C4 e de etanol absoluto, para ajustar as condições de ligação do ADN à coluna, e misturou-se por inversão. Montou-se a coluna no tubo de recolha, pipetaram-se 750 μ L de cada amostra e centrifugou-se 1 min a 11.000 x g. Foi rejeitado o líquido eluído e repetiu-se este procedimento com a restante mistura. Para lavagem da coluna, foram adicionados 400 μ L do tampão CQW, centrifugou-se durante 1 min a 11.000 x g e rejeitou-se o líquido eluído. Adicionaram-se 700 μ L do tampão C5 à coluna, realizou-se outra centrifugação durante 1 min a 11.000 x g e rejeitou-se o líquido eluído. Adicionaram-se 200 μ L do tampão C5 e centrifugou-se mais uma vez a 11.000 x g durante 2 min. Seguidamente foi colocada a coluna num novo tubo estéril e foram adicionados 100 μ L do tampão de eluição CE, pré-aquecido a 70°C. Incubou-se 5 min à temperatura ambiente e centrifugou-se a 11.000 x g durante 1 min de forma a eluir o ADN.

Em cada extração foi efetuado um branco de forma a controlar eventuais contaminações durante o processo. Todos os extratos de ADN foram armazenados a -20°C.

6.5 Quantificação e avaliação do ADN extraído

A avaliação e quantificação da pureza dos extratos de ADN foi efetuada recorrendo a um leitor de microplacas Multidetecção Synergy™ HT (Biotek Instruments, Winooski, EUA) e ao seu *software* de análise de dados Gen5™ a partir das leituras de absorvência a 260 nm e 280 nm, pois tanto ácidos nucleicos como as proteínas absorvem parcialmente a 260 nm e a 280 nm, respetivamente. Assim, a razão entre estes dois valores (A260/A280) fornece a pureza dos extratos de ADN. Quando esta razão se encontra entre 1,5 e 2,0 temos a indicação de que o extrato de ADN apresenta uma boa qualidade e valores de aproximadamente 1,8 indicam que os extratos possuem uma elevada pureza. Diluíram-se os extratos a uma concentração de 10 ng μL^{-1} para posterior amplificação por PCR.

A integridade dos extratos de ADN obtidos foi também avaliada, realizando uma eletroforese do ADN genómico em gel de agarose a 1% em tampão SGTB 1x (GRiSP Research Solutions, Porto, Portugal) e corado com Gel Red 1x (Biotium, Hayward, CA, EUA). Assim, foi possível observar o tamanho e a forma das bandas obtidas por cada extrato.

Na realização deste tipo de eletroforese, aplicaram-se 5 μL de marcador de massa molecular HiperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido), num dos poços do gel de agarose. Juntaram-se 5 μL de extrato de ADN a 4 μL de corante de carregamento (6x) e aplicou-se em cada poço do gel. A eletroforese foi efetuada em tampão SGTB 1x (GRiSP Research Solutions, Porto, Portugal) a uma tensão elétrica de 200 V durante aproximadamente 30 minutos, à temperatura ambiente. O gel foi então visualizado com recurso a um transiluminador de luz UV e a imagem digital foi adquirida utilizando um sistema fotográfico Gel Doc™ EZ Imager (BIO RAD, CA, EUA).

6.6 Amplificação por PCR

6.6.1 Primers

Os *primers* utilizados para este trabalho foram desenhados manualmente após o alinhamento de várias sequências nucleótídicas em função da proteína codificada, delta-conglutinas e PR-10. No caso das delta-conglutinas, as sequências nucleótídicas de *L. albus* (GenBank: AM160790.1 e AM156845.1) e *L. angustifolius* (GenBank: MQ670419.1, HQ670420.1, HQ 670418.1) foram alinhadas (BioEdit V7.1.9 software) e as regiões comuns usadas para o desenho de *primers* que possibilitassem a amplificação das espécies selecionadas (Figura 12, Tabela 10). Relativamente às PR-10, o procedimento

de desenho de *primers* foi o mesmo, mas utilizando sequências nucleótídicas de *L. albus* (Genbank: AJ000108.1, AB070618.1) e *L. luteus* (GenBank: AF170091.1, AF322226.1, AY288355.1, AF322225.1, AF1700092.1) (Figura 13) (Tabela 10).

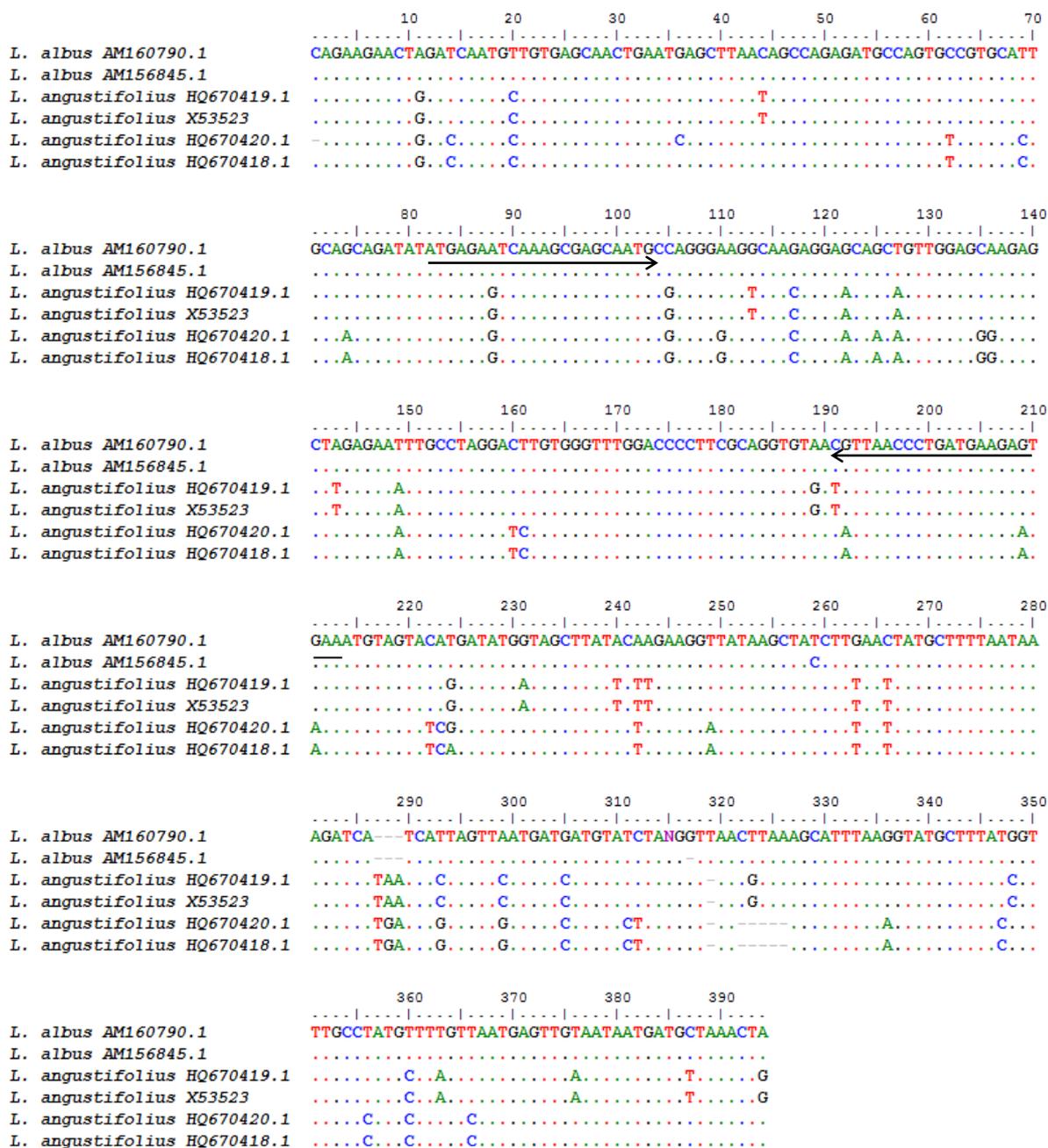


Figura 12 - Alinhamento das sequências de genes de delta-conglutinas disponíveis na base de dados do NCBI para as espécies *L. albus* e *L. angustifolius*. As setas indicam as regiões dos *primers*.

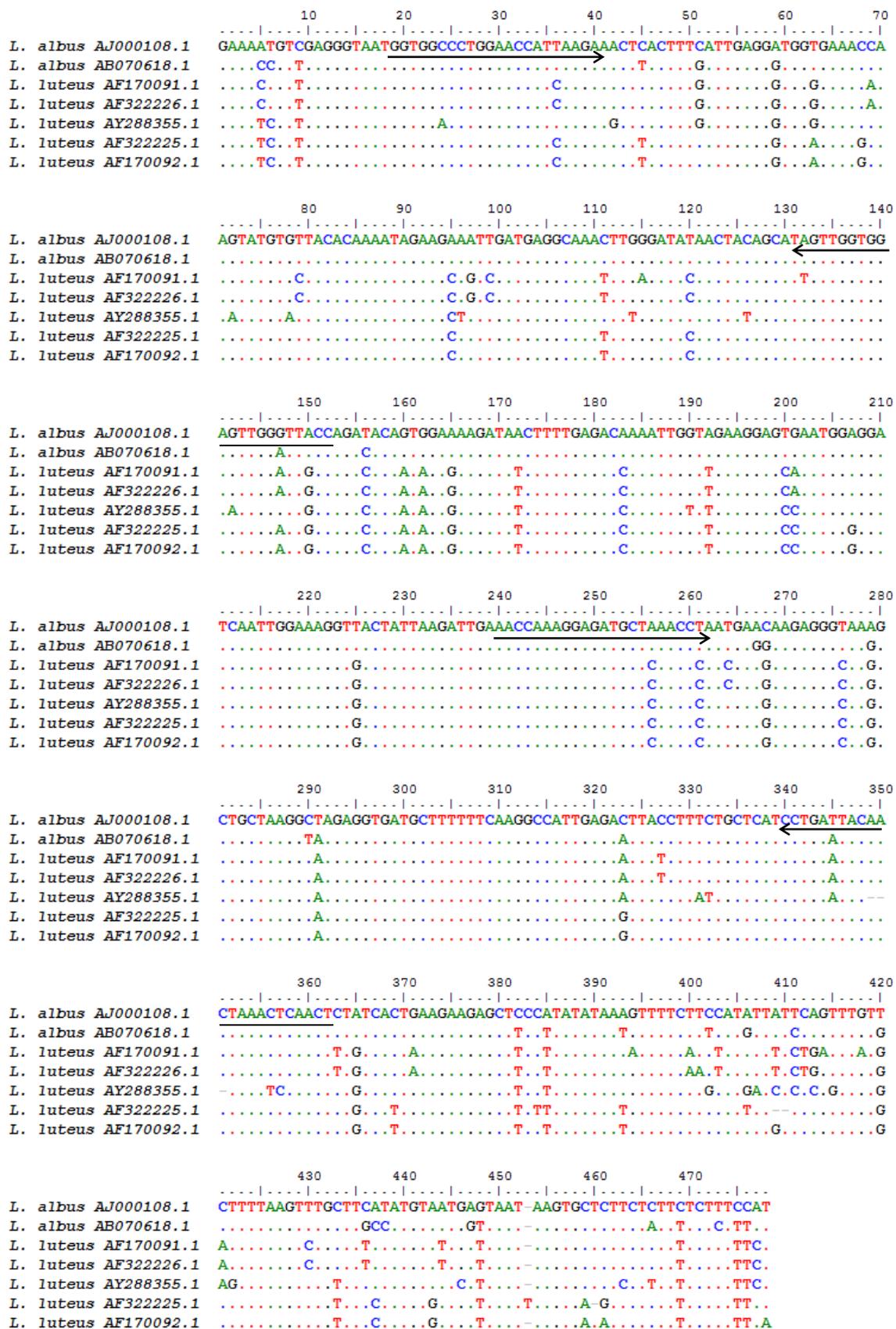


Figura 13 - Alinhamento das sequências de genes de proteínas PR-10 disponíveis na base de dados do NCBI para as espécies *L. albus* e *L. luteus*. As setas indicam as regiões dos primers.

A propriedade dos *primers* e a ausência de formação de *hairspins* ou auto-hibridação também foi estudada utilizando o *software* Oligo Calc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligo.html>). Além disso, também foi estudada a especificidade dos *primers* através da ferramenta *Primer-Blast* que permite revelar as homologias de um par de *primers* relativamente a todas as sequências presentes na base de dados do GenBank. A síntese dos novos *primers* foi efetuada pela empresa STAB Vida (Caparica, Portugal).

Tabela 10 - Oligonucleótidos utilizados na identificação de *Lupinus* spp. e amplificação de gene universal.

Espécie	Primers	Sequência	Gene Alvo	Amplicão	Referência
<i>Lupinus</i> spp.	Ladc-F2 Ladc-R2	atgagaatcaaagcgagcaatgc tcacttcatcagggttaacgt	cdp2	131 pb	AM160790.1 ^b
	La4-F1 La4-R1	ggtggccctggaaccattaaga ggaacccaactccaccaacta	PR-10	134 pb ^a	AJ000108.1 ^b
	La4-F2 La4-R2	aaccaaaggagatgctaaacctaa gagttgagtttagttgtaacagg	PR-10	124 pb	AJ000108.1 ^b
Eucariotas	18SRG-F 18SRG-R	ctgccctatcaactttcgatggta ttgatgtgtagccgtttctca	18S rARN	113 pb	Costa <i>et al.</i> (2013)

^aTamanho esperado; ^bNúmeros de acesso do GenBank.

6.6.2 PCR qualitativa

Para amplificação por PCR qualitativa foi necessária a preparação de uma mistura reacional que teve como volume final 25 µL, com os seguintes componentes: H₂O ultrapura (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), tampão (Tris-HCl 67 mM, pH 8,8, (NH₄)₂SO₄ 16 mM, Tween 20 0,01%), MgCl₂, dNTP (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha), *primers* (Tabela 10), enzima SuperHot Taq Polymerase[®] (Genaxxon Bioscience, Ulm, Alemanha) e extrato de ADN. As quantidades de cada componente encontram-se descritas na Tabela 11. Em cada ensaio, foi incluído um controlo negativo (CN) em que se substituiu o extrato de ADN por água ultrapura.

As reações foram efetuadas num termociclador MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, EUA) com condições de tempo e temperatura diferentes para cada *primer* e indicadas na Tabela 12.

Tabela 11 - Componentes das misturas de PCR qualitativa utilizados com os diferentes *primers* (volumes em μL).

Componente	Primers	Ladc-F2/ Ladc-R2	La4-F1/ La4-R1	La4-F2/ La4-R2	La4-F1/ La4-R3	18SRG-F/ 18SRG-R
Água Ultrapura		15,3	14,3	14,3	14,3	15,6
Tampão (10x)		2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
MgCl₂ (25 mM)		2,0	3,0	3,0	3,0	1,5
dNTP (2,5 mM cada)		2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Primer Forward (10 mM)		0,5	0,5	0,5	0,5	0,6
Primer Reverse (10 mM)		0,5	0,5	0,5	0,5	0,6
Taq Polimarese		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Extrato de ADN		2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Volume Total		25	25	25	25	25

Tabela 12 - Condições utilizadas nas amplificações por PCR qualitativa com diferentes *primers*.

Primers	Ladc-F2/ Ladc-R2		La4-F1/ La4-R1		La4-F2/ La4-R2		La4-F1/ La4-R3		18SRG-F/ 18SRG-R	
Etapas	Temperatura	Duração	Temperatura	Duração	Temperatura	Duração	Temperatura	Duração	Temperatura	Duração
Desnaturação	95°C	5 min	95°C	5 min	95°C	5 min	95°C	5 min	95°C	5 min
	95°C	30 s	95°C	30 s	95°C	30 s	95°C	30 s	95°C	30 s
Amplificação	60°C	30 s	61°C	30 s	59°C	30 s	60°C	45 s	65°C	30 s
	72°C	30 s	72°C	30 s	72°C	30 s	72°C	60 s	72°C	30 s
Nº de ciclos de amplificação	40		40		40		38		33	
Extensão	72°C	5 min	72°C	5 min	72°C	5 min	72°C	5 min	72°C	5 min

Os fragmentos de PCR foram depois visualizados após eletroforese em gel de agarose a 1,5% e em tampão SGTB 1x (GRiSP Research Solutions, Porto, Portugal), corado com Gel Red 1x (Biotium, Hayward, CA, EUA), durante 25 min a uma tensão elétrica de 200 V. Em cada poço da eletroforese misturaram-se 20 μL de cada produto da reação com 4 μL de corante de carregamento azul de bromofenol. No caso do marcador de ADN (100 pb) (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha), misturaram-se 2 μL de marcador com 4 μL de corante. Todos estes reagentes e produtos de PCR foram previamente misturados numa placa de 96 poços. No final da eletroforese, procedeu-se à visualização das bandas através de um transluminador com luz UV e a imagem digital foi adquirida utilizando um sistema fotográfico Gel DocTM EZ Imager (Bio-Rad, CA, EUA).

6.6.3 PCR em tempo real

A amplificação por PCR em tempo real foi realizada numa mistura reacional de 20 µL, com os seguintes componentes: H₂O ultrapura (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), SsoFast™ Supermix (Bio-Rad, Laboratories, EUA), extrato de ADN, *primers* (La4-F2/La4-R2, Tabela 10) e sonda TaqMan™ (La4-P, FAM-AAGAGGGTAAAGCTAGGCTAGA-BHQ1). As quantidades de cada componente encontram-se descritas na Tabela 13. Em cada ensaio de PCR em tempo real incluiu-se um controlo negativo dos reagentes, em que se substituiu o extrato de ADN por água ultrapura.

As condições de tempo e temperatura foram as seguintes: 3 min a 95°C, 40 ciclos a 95°C durante 30 s e 59°C durante 35 s, com a deteção do sinal de fluorescência ao fim de cada ciclo. As reações foram efetuadas num termociclador CFX96 Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, EUA), sendo os dados adquiridos e processados pelo *software* Bio-Rad CFX Manager 3.1 (Bio-Rad, Laboratories, EUA). Cada amostra foi amplificada em triplicado.

Tabela 13 - Componentes das misturas de PCR em tempo real.

Componente	Volume (µL)
Água Ultrapura	6,5
SsoFast™ Supermix (2x)	10
<i>Primer</i> La4-F2 (10 mM)	0,6
<i>Primer</i> La4-R2 (10 mM)	0,6
Sonda La4-P (10 mM)	0,3
Extrato de ADN	2,0
Volume Total	20

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Extração e avaliação da qualidade do ADN extraído

No âmbito deste trabalho, foram utilizados dois métodos de extração diferentes uma vez que foram estudadas amostras altamente processadas (amostras comerciais) e amostras não processadas (misturas de referência de farinha de tremço com farinha e arroz e trigo). Desta forma, obtiveram-se extratos de ADN com diferentes concentrações e purezas. Os extratos com níveis de pureza entre 1,7 e 2,1 podem ser considerados como de boa qualidade, sendo que o valor ótimo deverá centrar-se por volta de 1,8. Nesse sentido, o método *Wizard* foi utilizado na extração de ADN em amostras comerciais e nas misturas de referência das farinhas de tremço com arroz. O método *Nucleospin Food* foi utilizado na extração de ADN dos pães, das sementes e das misturas de referência das farinhas de tremço com arroz e trigo.

Os resultados da extração das amostras pelo método *Wizard* mostram que as concentrações de ADN obtidas foram, em muitos casos, elevadas ($>100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) e que apresentaram purezas, em geral, acima de 1,4. No entanto, várias amostras apresentam rendimentos e purezas baixos, provavelmente devido ao elevado grau de processamento que afeta a integridade do ADN de forma diferente (Tabela 14).

A extração de ADN das misturas de referência das farinhas de tremço com arroz foi efetuada pelos métodos *Wizard* e *Nucleospin Food*. Na Tabela 15 é possível observar que as concentrações de ADN dos extratos por *Wizard* são bastante elevadas, contudo, apresentam uma pureza acima do valor máximo desejável (1,9-2,0), que poderá estar relacionada com a presença de ARN. Já os extratos de ADN extraídos pelo método *Nucleospin Food* apresentaram concentrações de ADN mais baixas, mas purezas mais aceitáveis.

A integridade e qualidade do ADN genómico dos extratos provenientes das misturas de farinhas de tremço com arroz obtidas pelos métodos *Wizard* e *Nucleospin Food* foram também avaliadas por eletroforese em gel de agarose (Figuras 14 e 15). Na Figura 14 pode observar-se arrastamentos sem bandas, sugerindo que o método *Wizard* promoveu a degradação do ADN. A maior intensidade dos arrastamentos de baixas massas moleculares sugere a presença de elevadas quantidades de ARN, o que está concordante com o resultado da avaliação da pureza por espectrofotometria.

Tabela 14 - Concentrações e purezas do ADN extraído de amostras comerciais pelo método *Wizard*.

Amostra	Concentração (ng μL^{-1})	Pureza (A260/A280)	Amostra	Concentração (ng μL^{-1})	Pureza (A260/A280)
TR03	424,1	1,9	TR17	447,6	1,6
TR04	82,6	1,8	TR18	108,5	1,8
TR05	106,5	1,8	TR19	42,6	1,5
TR06	148,9	1,8	TR20	16,1	1,2
TR07	60,1	1,3	TR21	249,4	1,9
TR08	32,6	0,8	TR22	44,4	1,7
TR09	51,8	1,4	TR23	179,2	1,8
TR10	27,7	1,2	TR24	274,3	1,8
TR11	32,0	1,4	TR25	106,8	1,7
TR12	42,6	1,5	TR26	18,5	1,4
TR13	16,1	1,2	TR27	168,9	1,8
TR14	249,4	1,9	TR28	90,1	1,7
TR15	44,4	1,7	TR29	47,2	1,8
TR16	179,2	1,8	TR30	103,4	2,0

Tabela 15 - Concentrações e purezas do ADN extraído das misturas de referência das farinhas de tremço com arroz pelos métodos *Wizard* e *Nucleospin Food*.

Amostra	<i>Wizard</i>		<i>Nucleospin Food</i>	
	Concentração (ng μL^{-1})	Pureza (A260/A280)	Concentração (ng μL^{-1})	Pureza (A260/A280)
TA00	827,1	2,2	56,1	2,0
TA02	858,7	2,2	139,6	2,0
TA05	832,5	2,2	64,6	2,0
TA09	930,7	2,2	58,7	2,1
TA12	859,0	2,2	50,5	2,1
TA13	819,4	2,2	43,5	1,9
TA14	791,0	2,2	27,9	2,0
TA15	869,4	2,2	29,4	2,1
TA16	813,4	2,2	25,7	1,9

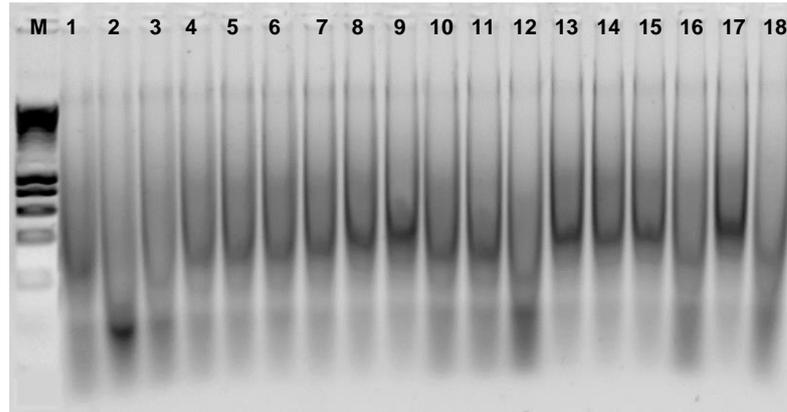


Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose de ADN genómico das misturas de referência de farinha de tremço com farinha de arroz extraídas pelo método *Wizard*. Linhas 1 a 18 – 0%, 50, 10%, 5%, 2, 1%, 0,8 %, 0,5%, 0,2%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, 0,05%, 0,01%, 0,005%, 0,001%, 0,0005%, 0,0001% de tremço, respetivamente. M – marcador molecular HyperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido).

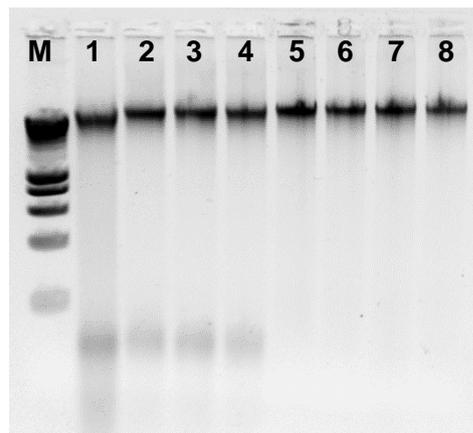


Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose de ADN genómico das misturas de referência de farinha de tremço com farinha de arroz extraídas pelo método *Nucleospin Food*, utilizando ARNse nas concentrações de 2 ng μL^{-1} (Linhas 1 a 4) e 5 ng μL^{-1} (Linhas 5 a 8). Linhas 1 a 8 – 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,005%, 0,001%, 0,0005% e 0,0001% de tremço, respetivamente. M – marcador molecular HyperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido).

Na extração de ADN pelo método *Nucleospin Food*, com a utilização de ARNse, em diferentes concentrações, foram obtidos extratos com melhor integridade, menor contaminação com ARN e com ADN de elevado peso molecular, estando este resultado também concordante com a avaliação da qualidade por espectrofotometria. Na Figura 15, os extratos onde foi utilizada ARNse com a concentração de 5 ng μL^{-1} apresentaram melhor qualidade (Linhas 5-8) do que os extratos com a concentração de 2 ng μL^{-1} (Linhas 1-4), uma vez que se verifica a ausência de ARN nos primeiros extratos com maior concentração.

A extração de ADN das sementes de tremoço foi efetuada pelo método *Nucleospin Food* (Tabela 16), com a utilização de ARNse na concentração de 5 ng μL^{-1} , sendo possível observar que as concentrações de ADN se apresentam relativamente elevadas e as purezas aceitáveis.

Tabela 16 - Concentrações e purezas do ADN extraído em sementes de tremoço pelo método *Nucleospin Food*.

Amostra	Concentração (ng μL^{-1})	Pureza (A260/A280)
TR01	120,0	2,0
TR02	164,2	2,1
TR31	96,0	1,9
TR32	118,1	2,1
TR33	158,0	2,1
TR34	130,0	2,2
TR35	157,0	2,2
TR36	98,6	2,1
TR37	237,9	2,1

Tabela 17 - Concentrações e purezas do ADN extraído das misturas de referência das farinhas de tremoço com trigo (TT) e respetivos pães (PTT).

Amostra	Concentração (ng μL^{-1})	Pureza (A260/A280)	Amostra	Concentração (ng μL^{-1})	Pureza (A260/A280)
TT02	143,2	2,0	PTT02	45,6	2,0
TT05	115,5	1,9	PTT05	35,5	1,9
TT09	76,8	1,9	PTT09	26,0	1,9
TT10	137,6	2,0	PTT12	36,8	1,9
TT12	130,5	1,9	PTT14	26,6	1,9
TT13	94,5	1,9	PTT16	30,1	1,8
TT14	76,4	1,9	PTT00	46,0	1,8
TT15	94,4	1,9			
TT16	121,2	1,9			
TT00	102,6	1,9			

Também as misturas de referência de tremço com trigo e os respectivos pães foram extraídos pelo método *Nucleospin Food*, com a utilização de ARNse na concentração de $5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. De uma forma geral, os extratos das amostras processadas (pães) (PTT) apresentaram menor rendimento de ADN do que os correspondentes às misturas de farinhas não processadas (TT) (Tabela 17). Além disso, tanto as amostras processadas como as respectivas farinhas permitiram obter extratos com uma elevada pureza.

A avaliação da qualidade e integridade do ADN genómico dos extratos de ADN das misturas de farinhas e respetivos pães foi também efetuada por eletroforese em gel de agarose (Figura 16), onde é possível observarem-se bandas de elevada massa molecular ($> 10000 \text{ pb}$) provenientes das misturas de farinhas (Figura 16A), enquanto nos respetivos pães, após cozedura, apenas se observam arrastamentos (Figura 16B), indicando a degradação do ADN resultante do processamento.

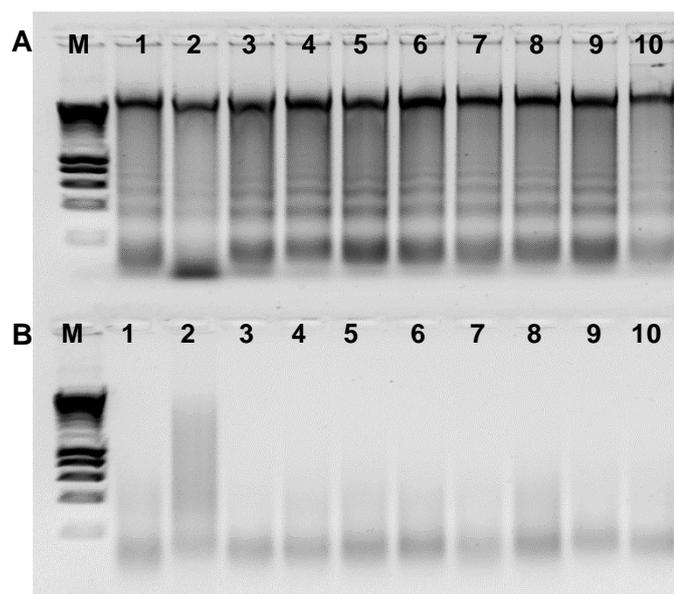


Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose de ADN genómico das misturas de referência de farinha de tremço com farinha de trigo cruas (A) e processadas (B). Linhas 1 a 10 – 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001% e 0,0001% de tremço, respetivamente. M – marcador molecular HyperLadder I (Bioline, Londres, Reino Unido).

7.2 Desenvolvimento do método de PCR específica de espécies

7.2.1 Avaliação da capacidade de amplificação

Inicialmente, todos os extratos de ADN foram submetidos a uma PCR qualitativa com alvo num gene universal presente em todos os organismos eucariotas (*primers* 18SRG-F/18SRG-R), de forma a confirmar a capacidade de amplificação dos mesmos, ou seja,

de forma a comprovar que os extratos possuíam ADN e estavam aptos a serem amplificados. Nesse sentido, pode-se verificar que todas as amostras comerciais amplificaram positivamente com o aparecimento de bandas com o tamanho esperado (113 pb) (Figuras 17 e 18). Contudo, algumas amostras apresentaram bandas de menor intensidade, sendo explicável pelo tipo de processamento associado a cada uma delas. Na Figura 19, podem-se observar os resultados da amplificação do gene universal em sementes de tremoço utilizadas como referência, apresentando bandas intensas com o tamanho esperado (113 pb), para todas as espécies de tremoço utilizadas.

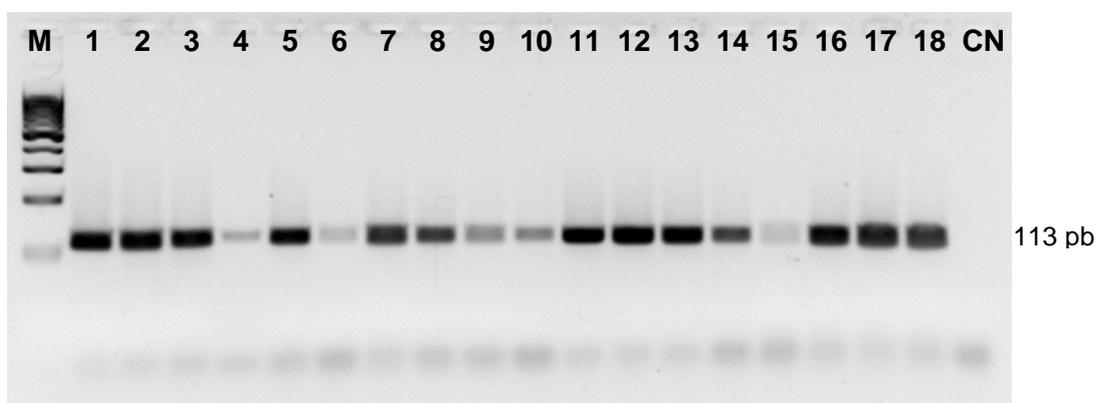


Figura 17 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das amostras comerciais, utilizando os *primers* 18SRG-F/18SRG-R. Linhas 1 a 6 – TR01 a TR06, respetivamente; Linhas 7 e 8 – TR07 (diferentes extrações); Linhas 9 e 10 – TR08 (diferentes extrações); Linha 11 – TR09; Linhas 12 e 13 – TR10 (diferentes extrações); Linha 14 – TR11; Linha 15 – TR12; Linha 16 – TR13; Linha 17 – TR14; Linha 18 – Controlo positivo. CN – Controlo negativo; M – Marcador molecular 100 bp ADN Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha).

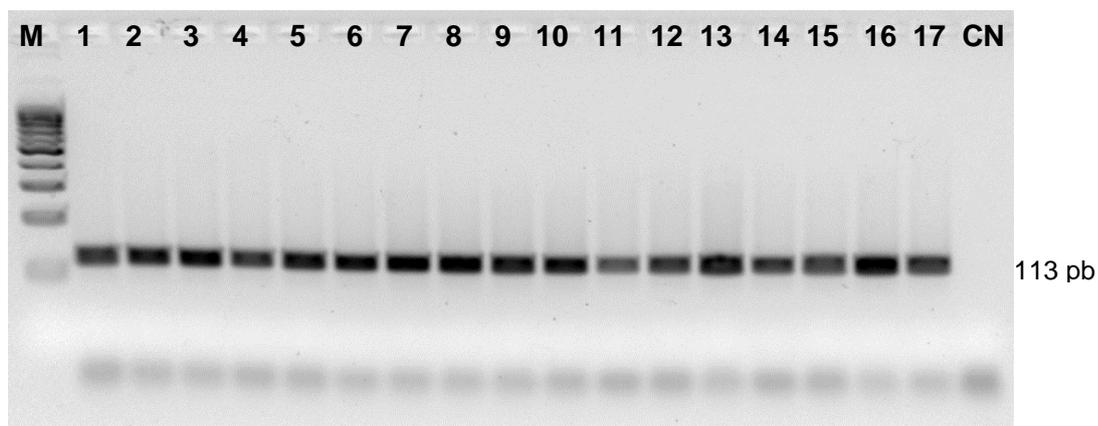


Figura 18 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das amostras comerciais, utilizando os *primers* 18SRG-F/18SRG-R. Linhas 1 a 16 - TR15 a TR30, respetivamente. Linha 17 – Controlo positivo. CN – Controlo negativo; M – Marcador molecular 100 bp ADN Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha).

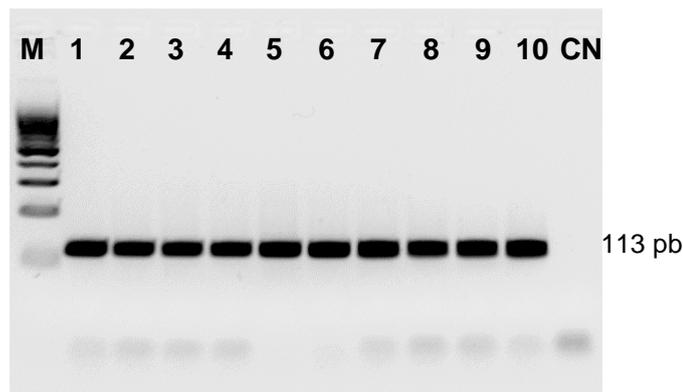


Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das diferentes variedades de sementes de tremço utilizadas neste estudo, utilizando os *primers* 18SRG-F/18SRG-R. Linha 1 – *L. albus*; Linha 2 – *L. luteus*; Linha 3 – *L. albus*; Linha 4 – *L. angustifolius*; Linha 5 – *L. mutabilis*; Linha 6 – *L. mutabilis*; Linha 7 – *L. albus*; Linha 8 – *L. albus*; Linha 9 – *L. luteus*; Linha 10 – *L. luteus*; CN – Controlo negativo; M – Marcador molecular 100 bp ADN Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha).

7.2.2 Otimização do método

O trabalho desenvolvido tinha como principal objetivo a deteção tremço em amostras comerciais. Para tal, e como referido anteriormente, foram escolhidas amostras onde estivesse presente tremço como ingrediente ou como vestígios da sua presença. Desta forma, foram desenvolvidas metodologias baseadas na análise de ADN, nomeadamente PCR qualitativa e PCR em tempo real, a partir do desenho de novos *primers* (Tabela 10). Inicialmente, foram utilizados os *primers* Ladc-F1/Ladc-R1, tendo como região alvo as sequências de ADN que codificam δ -conglutinas. Estes *primers* amplificaram positivamente o arroz, revelando assim a ocorrência de reatividade cruzada com esta espécie (Figura 20, linhas 9 e 18). Desta forma, os referidos *primers* não foram mais utilizados para este estudo, procedendo-se à otimização de um segundo conjunto de *primers*.

Seguidamente foram avaliados os *primers* La4-F1/La4-R1, tendo como região alvo as sequências de ADN que codificam as proteínas PR-10. Estes *primers* amplificaram positivamente o tremço e não houve ocorrência de reatividade cruzada com o arroz (Figura 21, linha 6). No entanto, deram origem a fragmentos de ADN de maior massa molecular do que a esperada (134 pb). Assim, estes *primers* também não foram mais usados na técnica de PCR qualitativa.

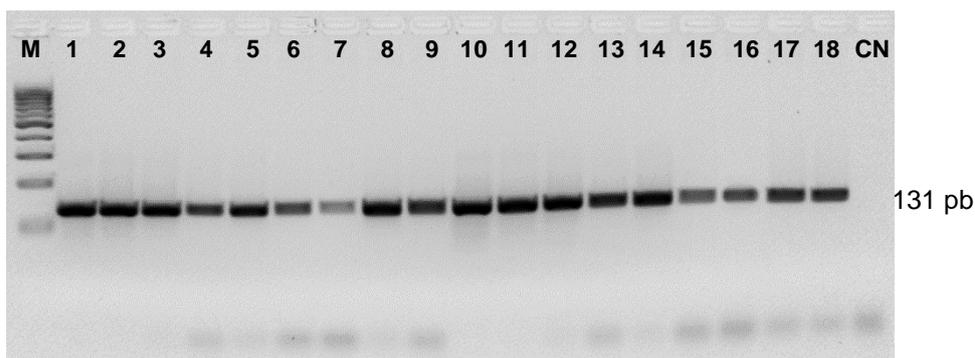


Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das misturas de referência de tremoço em arroz, utilizando os *primers* Ladc-F1/Ladc-R1. Linhas 1 a 8 – 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,005%, 0,001%, 0,0005%, 0,0001%, respetivamente, e extratos na concentração de 5 ng μL^{-1} ; Linhas 10 a 17 – 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,005%, 0,001%, 0,0005%, 0,0001%, respetivamente e extratos na concentração de 10 ng μL^{-1} ; Linhas 9 e 18 – farinha de arroz; CN – Controlo negativo; M – Marcador molecular 100 bp ADN Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha).

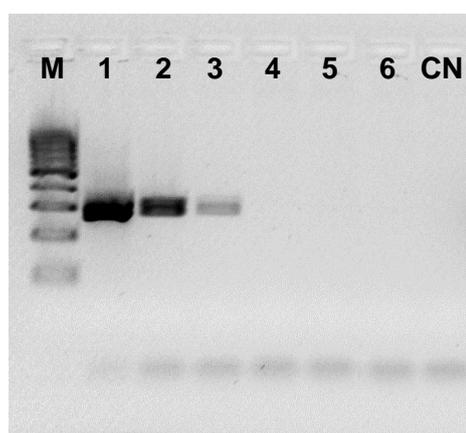


Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das misturas de referência de tremoço em arroz, utilizando os *primers* La4-F1/La4-R1. Linhas 1 a 5 – 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001%, 0,0001% de tremoço, respetivamente; Linha 6 – farinha de arroz; CN – Controlo negativo; M – Marcador molecular 100 bp ADN Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha).

Um novo conjunto de *primers* foi avaliado (La4-F2/La4-R2), também com alvo nas sequências de ADN que codificam as proteínas PR-10 (Figura 22). Pode-se verificar que este par de *primers* permitiu amplificar o tremoço positivamente, sem ocorrência de reatividade cruzada com o arroz, originando um fragmento de cerca de 124 pb (Figura 22, Linha 7).

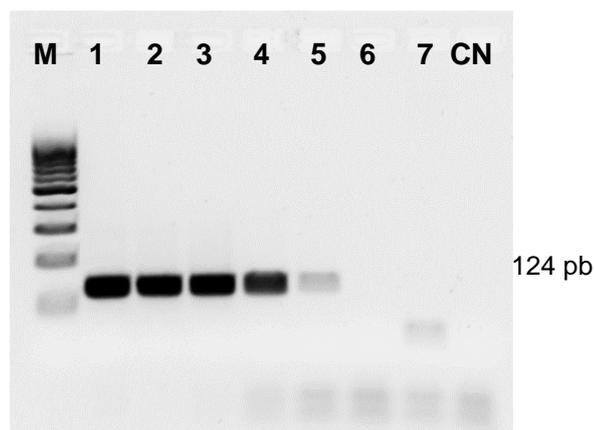


Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR de diluições seriadas a partir da mistura de referência de 10% de tremço em arroz, utilizando os *primers* La4-F2/La4-R2. Linhas 1 a 6 – 2 ng, 0,2 ng, 0,02 ng, 0,002 ng, 0,0002 ng, 0,00002 ng de ADN, respetivamente; Linha 7 – 0 farinha de arroz; CN – Controlo negativo; M – Marcador molecular 100 bp ADN Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha).

Existem dois tipos de limites de deteção associados às técnicas desenvolvidas: o limite de deteção absoluto e o limite de deteção relativo. O limite de deteção absoluto consistiu em efetuar cinco diluições sucessivas de 1/10 de um extrato de ADN, sendo neste caso o de 10% de tremço em arroz, com uma concentração inicial de $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ (Figura 22). Assim, o limite de deteção absoluto associado a esta técnica foi de 0,2 pg (Figura 22, linha 5), sendo bastante inferior ao reportado (1 pg) por Galan *et al.* (2010) por PCR qualitativa com alvo nas sequências α - e δ -conglutina de *L. angustifolius*. Relativamente ao limite de deteção relativo, que se baseou em testar cinco misturas de referência de tremço em arroz, foi atingida a concentração de 5 mg kg^{-1} (0,0005% de tremço) (Figura 23, linha 7).

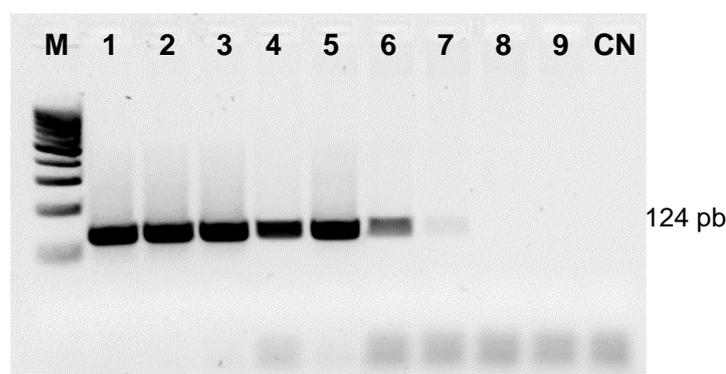


Figura 23 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das misturas de referência de tremço em arroz, com os *primers* La4-F2/La4-R2. Linhas 1 a 8 – 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,005%, 0,001%, 0,0005%, 0,0001%, respetivamente. Linha 9 – arroz; CN – Controlo negativo; M – Marcador molecular 100 bp ADN Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha).

O limite de detecção relativo também foi determinado em misturas de referência de farinha de tremço em trigo e em pão. Como podemos observar na Figura 24, as misturas que sofreram processamento (linhas de 1 a 7), ou seja, os pães, atingiram um limite de detecção relativo de 100 mg kg⁻¹ (0,01% de tremço), o qual foi mais elevado do que nas misturas não processadas, que foi 100 vezes inferior ao atingir o valor ideal de 1 mg kg⁻¹ (0,0001% de tremço). Tal facto seria de esperar, pois, como anteriormente referido, o tratamento térmico leva à degradação do ADN, sendo por isso mais difícil de detetá-lo. No entanto, apesar da aparente elevada sensibilidade do método quando aplicado a misturas de farinhas de tremço em trigo não processadas, os resultados não foram reprodutíveis entre vários ensaios, tendo-se observado grandes diferenças nos LOD. Assim, de acordo com os resultados desses ensaios, não se pode considerar um LOD inferior a 0,01% para misturas de farinhas de tremço em trigo. Comparando com os resultados com as misturas de farinhas de tremço em arroz, pode-se evidenciar que a matriz afetou a sensibilidade do método, uma vez que as misturas de tremço com arroz permitiram obter um LOD mais baixo (0,0005%) (Figura 23), de forma reprodutível nos ensaios realizados.

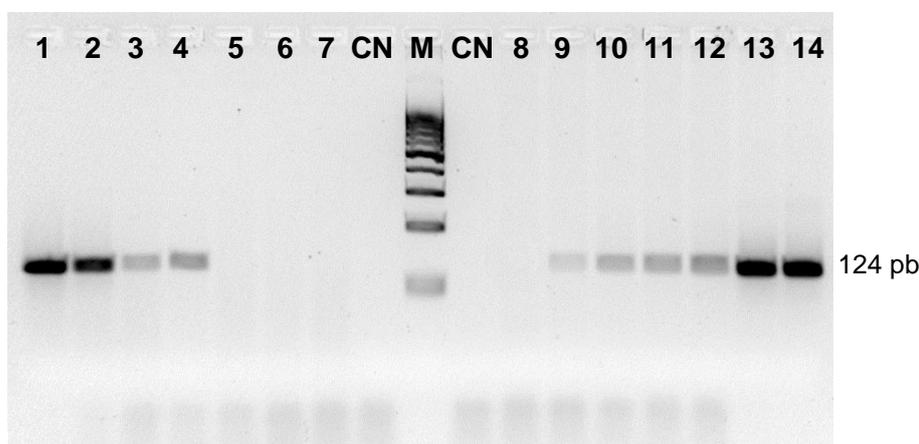


Figura 24 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das misturas de referência de farinha de tremço em trigo e dos respetivos pães processados, utilizando os *primers* La4-F2/La4-R2. Linhas 1 a 7 – 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001% e 0,0001% de farinha de tremço em pão, respetivamente. Linhas 14 a 9 – 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001% e 0,0001% de farinha de tremço em farinha de trigo, respetivamente. Linhas 7 e 8 – trigo; CN – Controlo negativo; M – Marcador molecular 100 bp ADN Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha).

7.2.3 Avaliação da especificidade

Após o desenvolvimento e otimização do método qualitativo, passou-se à avaliação da sua especificidade, ou seja, a testes de reatividade em espécies com forte probabilidade

de surgirem em produtos alimentares. Para tal, utilizaram-se extratos, de espécies de origem animal e vegetal, previamente extraídos no laboratório. Anteriormente, todos estes extratos foram submetidos a uma PCR qualitativa utilizando o par de *primers* com alvo num gene universal para eucariotas (18SRG-F/18SRG-R) (Tabela 10), confirmando sua capacidade de amplificação.

Seguidamente, passou-se à amplificação específica de *Lupinus* spp. com os *primers* La4-F2/La4-R2. Das 40 espécies testadas, sendo 33 de origem vegetal e as restantes de origem animal, nenhuma delas amplificou positivamente com os referidos *primers* (Figuras 25-27), demonstrando a especificidade do método para o género *Lupinus*.

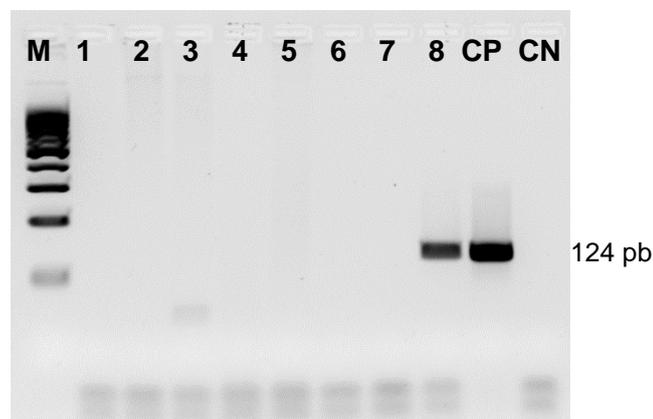


Figura 25 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação por PCR qualitativa (*primers* La4-F2/La4-R2) dos extratos de várias espécies vegetais e animais. Linhas 1 a 8 – vaca, borrego, cabrito, caju, farinha de trigo, cevada, amêndoa, tremço cozido, respetivamente; CP – Controlo positivo (1% tremço); CN – Controlo negativo; M – Marcador molecular 100 bp ADN Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha).

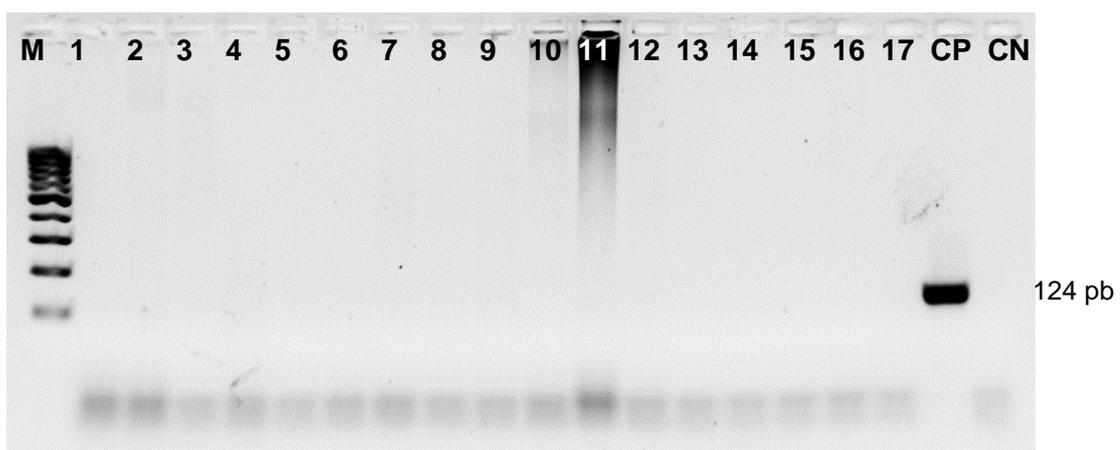


Figura 26 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação por PCR qualitativa (*primers* La4-F2/La4-R2) dos extratos de várias espécies vegetais e animais. Linhas 1 a 17 – Tomate cereja, sementes de abóbora, amora liofilizada, favas fritas, folha de morango, miolo de noz, sementes de girassol, milho, bacalhau (*Gadus morhua*), paloco (*Theragra chalcogramma*), salmão (*Salmo salar*), camarão cozido, castanheiro-da-índia, videira, oliveira, figueira e alcachofra, respetivamente. CP – Controlo positivo (1% tremço); CN – Controlo negativo; M – Marcador molecular 100 bp ADN Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha).

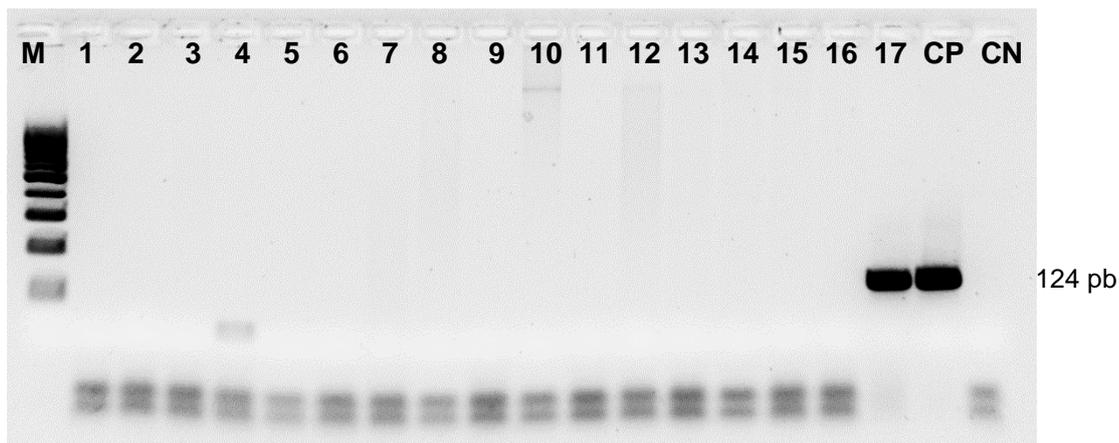


Figura 27 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação por PCR qualitativa (*primers* La4-F2/La4-R2) dos extratos de várias espécies vegetais. Linhas 1 a 17 – noz macadâmia, noz, noz do Brasil, noz pecan, castanha, avelã, amendoim, amêndoa, pistacho, pinhão, caju, colza, aveia, cevada, centeio, soja, tremço cozido, respetivamente. CP – Controlo positivo (1% tremço); CN – Controlo negativo; M – Marcador molecular 100 bp ADN Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha).

Depois de confirmada a ausência de reação com espécies não-alvo, prosseguiu-se para a amplificação em quatro espécies de tremço: *Lupinus albus*, *L. luteus*, *L. mutabilis* e *L. angustifolius*. Os resultados obtidos estão representados na Figura 28, onde se pode verificar que estes *primers* amplificaram todas as espécies testadas, como comprovado pelo aparecimento de bandas no tamanho esperado de 124 pb. No entanto, nas linhas 5 e 6 (Figura 28), que correspondem à amplificação de *L. mutabilis* podemos verificar que as bandas apresentam uma menor intensidade quando comparadas com outras. Este facto pode ser explicado por existirem pequenas diferenças nas sequências nucleóticas desta espécie, implicando assim uma menor eficiência de amplificação desta.

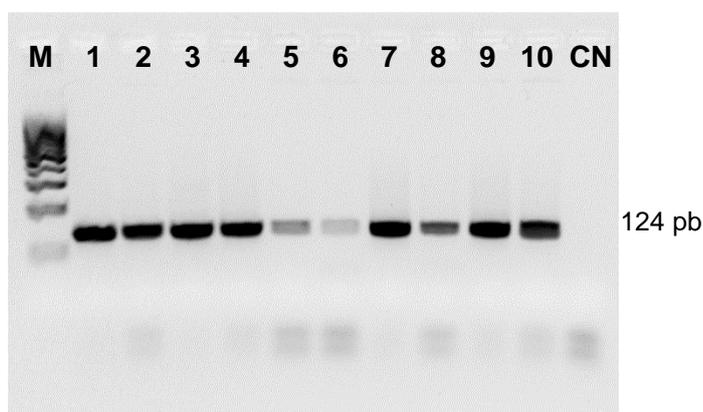


Figura 28 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação por PCR qualitativa (*primers* La4-F2/La4-R2) dos extratos das diferentes variedades de sementes de tremço utilizadas neste estudo. Linhas 1, 3, 7 e 8 – *Lupinus albus*; Linhas 2, 9 e 10 – *Lupinus luteus*; Linha 4 – *Lupinus angustifolius*; Linhas 5 e 6 – *Lupinus mutabilis*; CN – Controlo negativo; M – Marcador molecular 100 bp ADN Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha).

7.2.4 Aplicação na análise qualitativa das amostras comerciais

Depois da otimização do método e confirmação da sua especificidade para a detecção de espécies de tremçoço, procedeu-se à sua aplicação em amostras de alimentos processados disponíveis comercialmente. Por serem amostras complexas, sendo muitas submetidas a elevado nível de processamento, foi fundamental numa primeira etapa avaliar a capacidade de amplificação dos extratos de forma a evitar quaisquer falsos negativos (Figuras 17 e 18). Após amplificação positiva com alvo num gene universal para organismos eucariotas, prosseguiu-se para a detecção específica de espécies de tremçoço utilizando os primers La4-F2/La4-R2.

Como é possível verificar, através da análise da Figura 29, apenas 15 amostras comerciais amplificaram positivamente, pelo aparecimento de bandas com o tamanho esperado (124 pb). As amostras nas linhas 2-10, 17-20 e 25 (14 amostras), estavam rotuladas com a indicação de que “pode conter vestígios de tremçoço”, ou seja, uma rotulagem aparentemente preventiva. Dessas amostras, 4 amplificaram positivamente, ainda que com bandas muito ténues (Linhas 3 e 8, correspondendo a TR05 e TR10, respetivamente) ou quase impercetíveis (Linhas 17 e 18, correspondendo a TR19 e

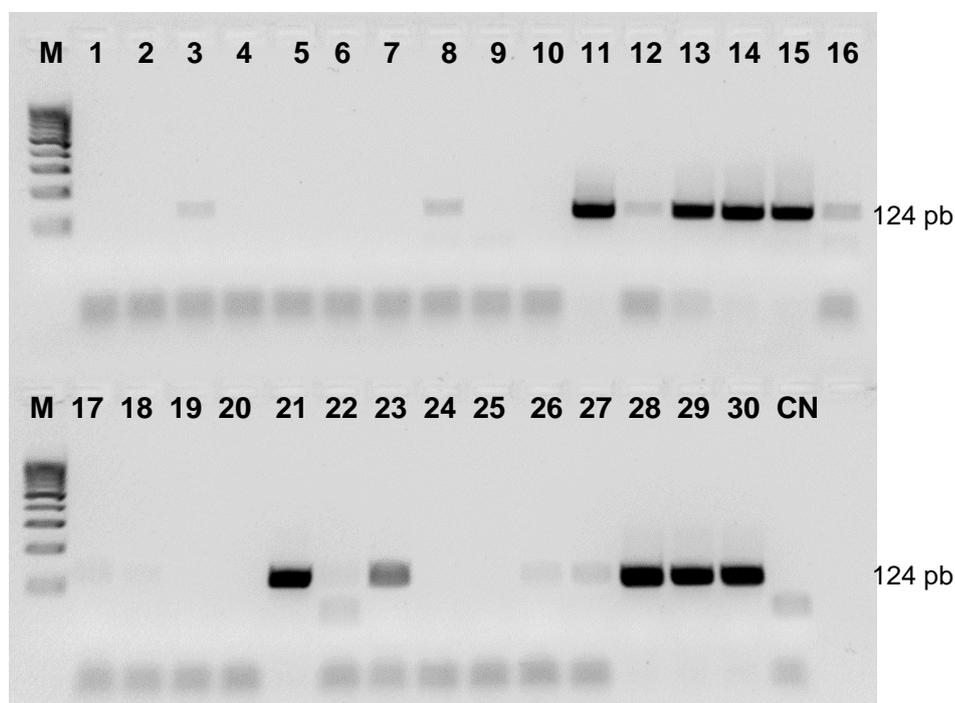


Figura 29 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação dos extratos das amostras comerciais, utilizando os *primers* La4-F2/R2. Linhas 1 a 27- Amostras comerciais TR03 a TR29, respetivamente. Linhas 28 a 30, *Lupinus albus*, *Lupinus luteus* e *Lupinus albus*, respetivamente. Extratos na concentração de 10 ng μL^{-1} . CN – Controlo negativo; M – Marcador molecular 100 bp ADN Ladder (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha).

TR20, respetivamente). Este tipo de rotulagem, sendo aplicado em salvaguarda dos consumidores sensibilizados e da entidade produtora, acaba, muitas vezes, por diminuir a livre escolha desse tipo de produtos. Ou seja, a informação contida na rotulagem deveria apresentar-se mais objetiva, indo de encontro aos resultados acima discutidos, uma vez que apenas 4 de 14 amostras comerciais que estavam rotuladas com a indicação de que “pode conter vestígios de tremço”, mostraram conter quantidades vestigiais de tremço. Ainda na Figura 29, as linhas 11-16, 21-24 e 26-27 correspondem à amplificação de amostras cuja rotulagem evidencia a presença de tremço com ingrediente. Estes resultados estão de acordo com a rotulagem, à exceção da linha 24, que corresponde à amostra de panados recheados com tomate e queijo congelado (TR26). No rótulo desta amostra comercial estava evidenciada a presença de proteína de tremço, no entanto, esta não foi detetada. Este facto poderá ser explicado pelo elevado nível de processamento da proteína de tremço adicionada ao alimento e/ou baixas quantidades adicionadas, já que a amplificação do gene universal mostrou a presença de uma banda forte (Figura 18). Relativamente às restantes amostras, algumas apresentam bandas menos intensas (Linhas 12, 16, 22, 26 e 27), podendo também estar relacionadas com a degradação do ADN pelo processamento e/ou baixa quantidade de tremço presente nas amostras, uma vez que todas amplificaram positivamente e com bandas intensas com alvo no gene universal de eucariotas (Figura 18).

7.3 Amplificação por PCR em tempo real

Uma vez que o principal objetivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento de metodologias de biologia molecular para a deteção de tremço, após a otimização da PCR qualitativa com os primers La4-F2/La4-R2 e respectiva avaliação da especificidade, procedeu-se ao desenho de uma sonda de hidrólise do tipo TaqMan (La4-P) (Secção 6.6.3) que, em conjunto com os referidos *primers*, permitiu avançar para a técnica de PCR em tempo real. Para tal, esta técnica foi otimizada através de misturas binárias de tremço em arroz, anteriormente descritas, para a realização de curvas de calibração. As misturas de tremço em trigo não foram utilizadas nesta fase, uma vez que os resultados preliminares não se mostraram adequados para PCR em tempo real, o que também foi concordante com os resultados da PCR qualitativa.

A avaliação dos ensaios de PCR em tempo real teve em conta os pré-requisitos exigidos nas guidelines MIQE (Bustin *et al*, 2009) e nas *Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods* (Broeders *et al.*, 2014). Nestes documentos, os critérios de aceitação

exigem que o coeficiente de correlação (R^2) seja igual ou superior 0,98, que a eficiência da PCR varie entre os 90% e os 110% e que o declive varie entre -3,6 e -3,1.

7.3.1 Identificação das espécies de tremçoço

Numa primeira fase, procedeu-se à verificação da amplificação das espécies de tremçoço em estudo (*Lupinus albus*, *L. luteus*, *L. mutabilis* e *L. angustifolius*) por PCR em tempo real. Contudo, através dos resultados da Figura 30, pode verificar-se que apenas as espécies *L. albus* e *L. luteus* amplificaram positivamente, apresentando alguma diferença nos valores de Ct (Tabela 18). Este facto pode ser explicado por existirem pequenas diferenças nas sequências nucleótídicas destas duas espécies, o qual já tinha sido notado anteriormente por PCR qualitativa no caso de *L. mutabilis*. Relativamente às espécies que não amplificaram, uma vez que tinham mostrado um resultado positivo por PCR qualitativa, a ausência de amplificação poderá ser atribuída a diferenças nucleotídicas na região de ligação da sonda. A acrescida especificidade da PCR em tempo real comparativamente ao método qualitativo é neste caso conferida através da sonda especificamente desenhada para o ensaio.

Na Tabela 18 apresentam-se as médias dos valores de Ct e os respetivos desvios padrão para cada espécie testada no ensaio. Tal como na Figura 30, podemos verificar que apenas as espécies *L. albus* e *L. luteus* amplificaram, obtendo apenas diferença de 1 ciclo no valor de Ct.

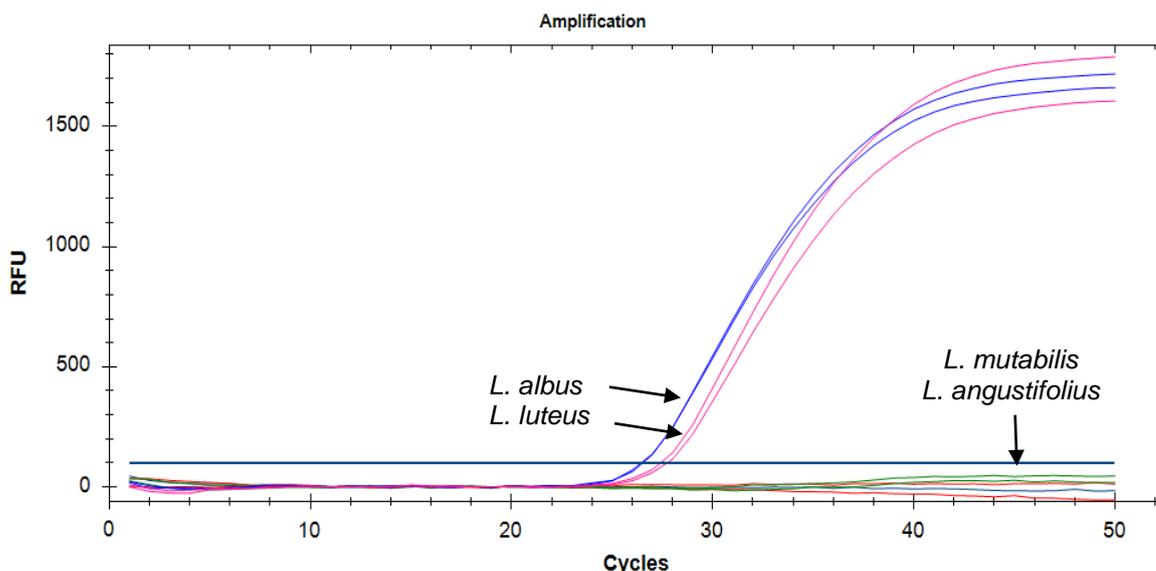


Figura 30 - Curvas de amplificação obtidas por PCR em tempo real utilizando extratos de ADN de diferentes espécies de tremçoço.

Tabela 18 - Resultados obtidos por PCR qualitativa e PCR em tempo real de ADN aplicadas a diferentes espécies de tremço.

Espécie	PCR qualitativa		PCR em tempo real	
	18SRG-F/ 18SRG-R	La4-F2/La4-R2	Ct \pm SD	Concentração (ng)
<i>Lupinus albus</i>	+	+	26,48 \pm 0,05	20
<i>Lupinus luteus</i>	+	+	27,56 \pm 0,23	20
<i>Lupinus mutabilis</i>	+	+	-	20
<i>Lupinus angustifolius</i>	+	+	-	20

7.3.2 Determinação do limite de deteção absoluto

O limite de deteção absoluto foi obtido através da amplificação do extrato de ADN de farinha de tremço, na concentração de 10 ng μL^{-1} , que foi submetido a 5 diluições sucessivas de 20 ng até 0,002 ng. Foi efetuado um ensaio com 3 réplicas para cada nível de concentração de ADN para a determinação do LOD. As Figuras 31 e 32 representam os resultados do ensaio realizado para a determinação do LOD absoluto, relativamente às curvas de amplificação para cada nível de diluição e à curva de calibração resultante, respetivamente. Na Tabela 19 apresentam-se as médias dos valores de Ct e os respetivos desvios padrão para cada nível de concentração do ensaio. Pode-se verificar que, entre níveis de diluições, obtiveram-se diferenças de aproximadamente 3 nos valores de Ct. Esta diferença constante nos valores de Ct afetou a curva de calibração (Figura 32) de forma positiva, uma vez que lhe atribui a linearidade. Também, na Tabela 19, pode confirmar-se um critério exigido, em que para que o valor de sensibilidade seja considerado de LOD é necessário que pelo menos 95% das réplicas amplifiquem (Bustin *et al*, 2009). Neste caso, as réplicas amplificaram em 100%, 3 em 3, podendo considerar-se 2 pg como o LOD absoluto, que foi inferior ao obtido por Scarafoni *et al*. (2009) (7 pg) por PCR em tempo real, com alvo no gene C γ A32 que codifica uma γ -conglutina de *L. albus*. No entanto, um outro estudo desenvolvido por Galan *et al*. (2011) por PCR em tempo real com alvo no gene iniciador tARN-MET mitocondrial permitiu-lhes detetar 1 pg de ADN de tremço em matrizes cruas e processadas, ou seja, inferior ao obtido no presente estudo.

A curva de calibração apresentou o coeficiente de correlação e o declive concordantes com os critérios de aceitação anteriormente mencionados, ou seja, o coeficiente de correlação foi de 0,99, superior a 0,98, e o declive foi -3,378, pertencendo ao intervalo de

-3,6 a -3,1 (Broeders *et al.*, 2014). A eficiência da PCR (97,7 %) também esteve de acordo com os valores recomendados, ou seja, entre os 90% e os 110% (Tabela 19).

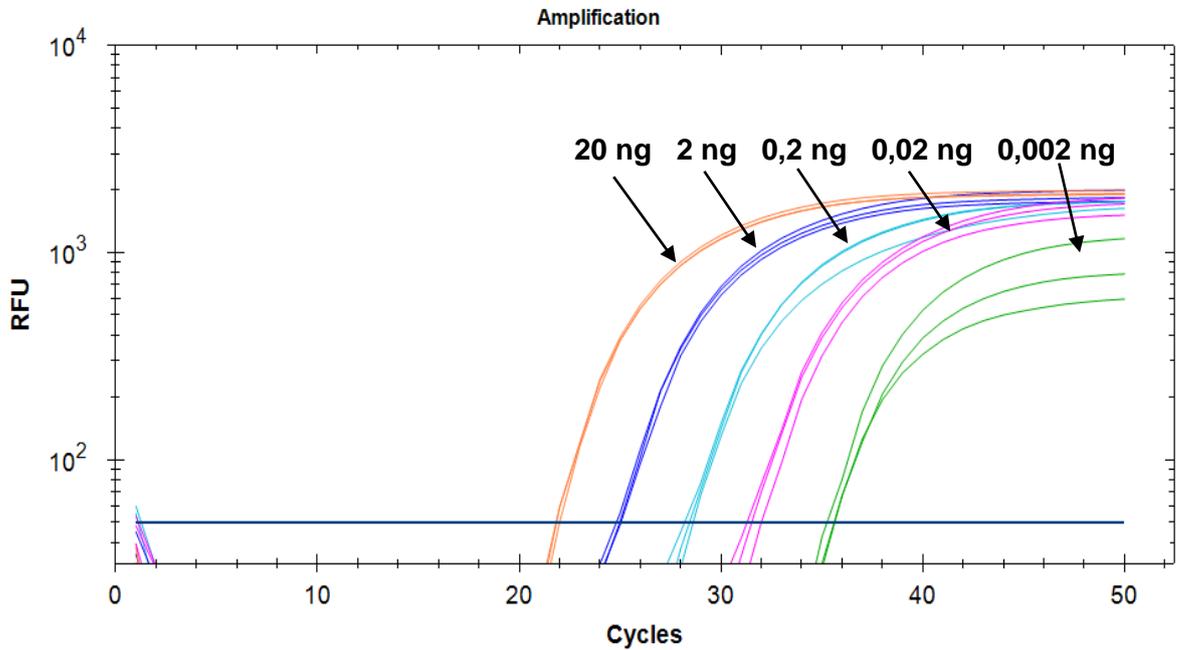


Figura 31 - Curvas de amplificação obtidas por PCR em tempo real resultantes da amplificação da diluição seriada do extrato de ADN de farinha de *Lupinus albus* (100% tremço), para a determinação do limite de detecção absoluto.

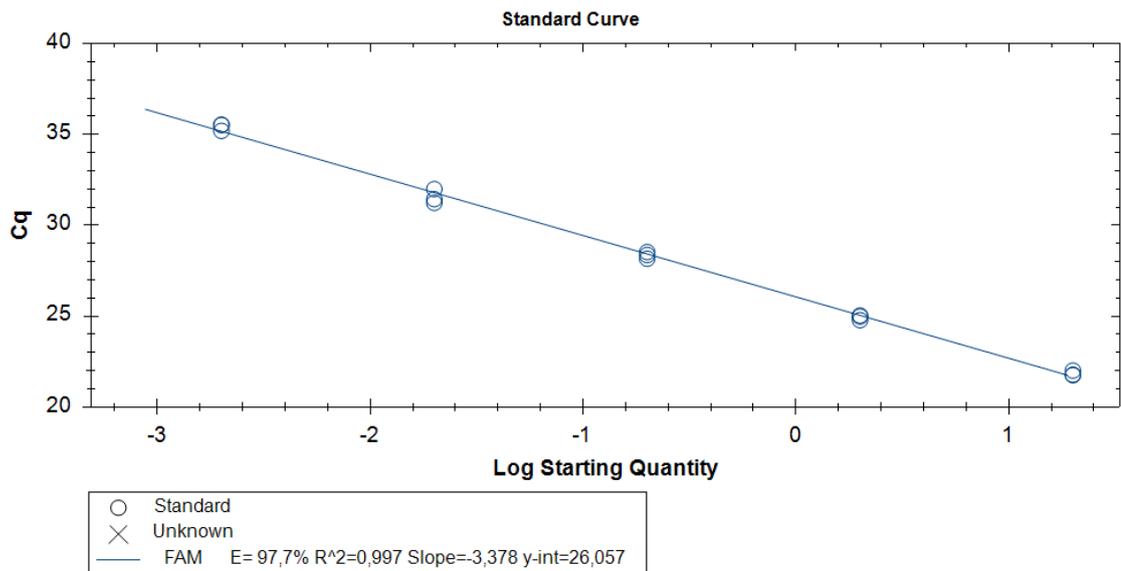


Figura 32 - Curva de calibração obtida por PCR em tempo real resultantes da amplificação da diluição seriada do extrato de ADN de farinha de *Lupinus albus* (100% tremço), para a determinação do limite absoluto.

Tabela 19 - Resultados obtidos para a determinação do LOD absoluto por PCR em tempo real de ADN de tremçoço.

ADN	Ct ± SD*
20 ng	21,84 ± 0,14
2 ng	24,93 ± 0,13
0,2 ng	28,35 ± 0,18
0,02 ng	31,55 ± 0,39
0,002 ng	35,42 ± 0,19
Coeficiente de correlação (R ²)	0,997
Declive	-3,378
Eficiência do PCR	97,7%

*Média do número de ciclos (Ct) ± desvio padrão (SD) (n=3)

7.3.3 Determinação do limite de detecção relativo

Posteriormente, passou-se à etapa da determinação do limite de detecção relativo, onde também foram utilizadas misturas de referência de farinha de tremçoço em farinha de arroz. Este foi obtido através da amplificação dos extratos de ADN das misturas de referência respeitantes a 0%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001% e 0,0001% de tremçoço, na concentração de 10 ng µL⁻¹. Para tal, efetuou-se um ensaio com 2 réplicas para cada nível de concentração e obteve-se uma sensibilidade de 0,001 % (10 mg kg⁻¹) (Figuras 33 e 34), idêntica à reportada pelo grupo de investigadores Galan *et al.* (2010) e Demmel *et al.* (2012) (10 mg kg⁻¹), utilizando alvos e matrizes diferentes. Mais recentemente Galan *et al.* (2011) desenvolveram um outro método de PCR em tempo real com alvo no gene iniciador tARN-MET mitocondrial que lhes permitiu melhorar a sensibilidade relativa para 2,5 mg kg⁻¹, apresentando-se mais baixa do que a sensibilidade obtida no presente estudo. Demmel *et al.* (2008) reportaram um LOD também inferior ao do presente trabalho, por PCR em tempo real (0,1 mg kg⁻¹). No estudo de Scarafoni *et al.* (2009) por PCR em tempo real, utilizando o corante universal SYBR Green, com alvo no gene CyA32 que codifica uma γ-conglutina de *L. albus*, obtiveram uma sensibilidade de 1000 mg kg⁻¹ (0,1%) de farinha de tremçoço em alimentos, ou seja, a qual foi superior à determinada no presente estudo.

Na Figura 34 apresenta-se a curva de calibração relativamente às misturas de referência de farinha de tremçoço em farinha de arroz, onde se pode verificar a linearidade entre os valores de Ct e o logaritmo da concentração, de acordo com os critérios de aceitação para este tipo de método dado o coeficiente de correlação foi 0,98 e a eficiência da PCR

foi de 104%. Na Tabela 20 estão apresentadas as médias dos valores de Ct e os respectivos desvios padrão para cada mistura de referência, podendo-se verificar que, entre cada mistura de referência, se obtiveram diferenças próximas 3 valores de Ct, exceto para o último nível de concentração. Também, na Tabela 20 e nas Figuras 33 e 34, pode verificar-se que o LOD relativo se pode considerar 0,001 % (10 mg kg⁻¹) uma vez que as duas réplicas amplificaram positivamente.

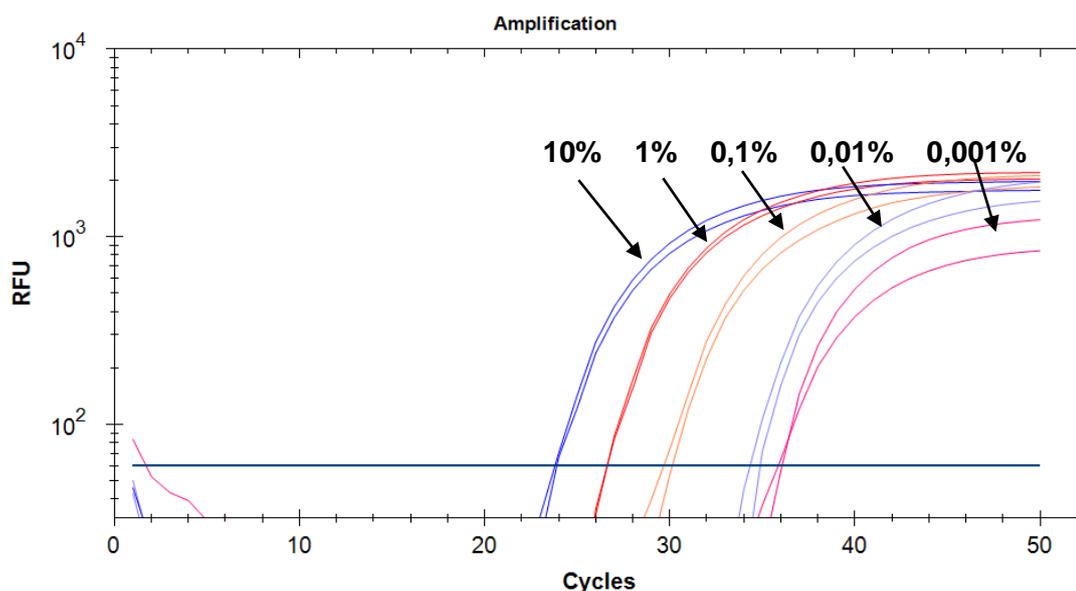


Figura 33 - Curvas de amplificação obtidas por PCR em tempo real utilizando misturas de referência contendo 10%, 1%, 0,1%, 0,01% e 0,001% de farinha de trevoço em farinha de arroz para a determinação do limite de detecção relativo.

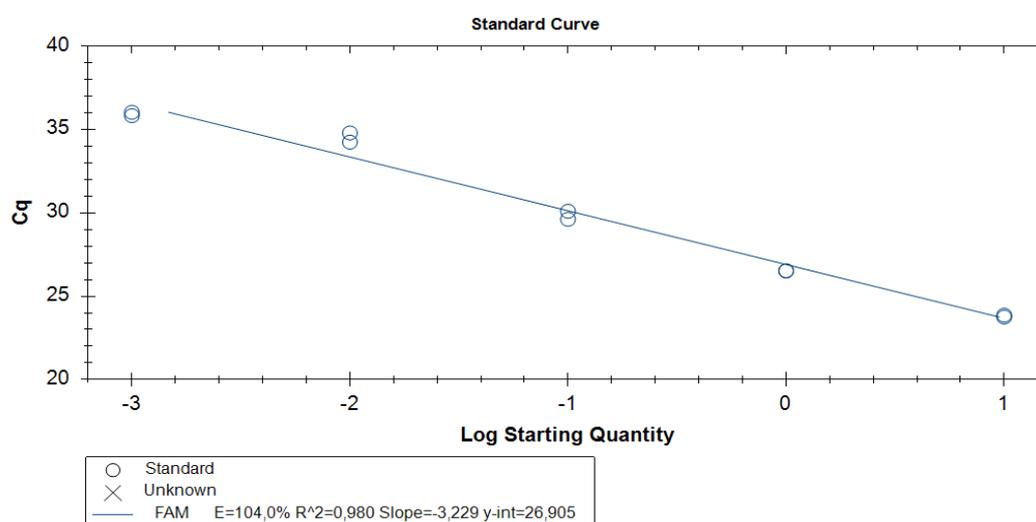


Figura 34 - Curva de calibração obtida por PCR em tempo real utilizando misturas de referência contendo 10%, 1%, 0,1%, 0,01% e 0,001% de farinha de trevoço em farinha de arroz para a determinação do limite de detecção relativo.

Tabela 20 - Resultados obtidos para a determinação do LOD relativo por PCR em tempo real para as misturas de referência de tremoço em arroz.

Tremoço (%)	Ct ± SD*
10%	23,81 ± 0,08
1%	26,53 ± 0,01
0,1%	29,86 ± 0,34
0,01%	34,54 ± 0,39
0,001%	35,95 ± 0,14
Coeficiente de correlação	0,980
Declive	-3,229
Eficiência do PCR	104,0%

*Média do número de ciclos (Ct) ± desvio padrão (SD) (n=2)

7.3.4 Avaliação quantitativa das amostras comerciais

Uma vez construído e otimizado o modelo quantitativo para as misturas de referência de farinha de tremoço com farinha de arroz, passou-se à confirmação e quantificação das amostras comerciais positivas em ensaios de PCR qualitativa para a presença de tremoço. É de realçar que neste estudo os valores apresentados apenas poderão ser considerados como uma semi-quantificação, uma vez que não foi utilizado nenhum procedimento de normalização e validação do modelo de quantificação. Na Tabela 21 estão resumidos os resultados obtidos para a detecção de tremoço por PCR qualitativa e PCR em tempo real, assim como a informação da rotulagem relevante para cada amostra comercial, os valores médios de Ct obtidos por PCR em tempo real, bem como as quantidades de tremoço estimadas em cada amostra.

Nos ensaios de PCR em tempo real foram testadas as 15 amostras comerciais positivas em ensaios de PCR qualitativa para a presença de tremoço. Destas amostras, 5 não amplificaram, outras 5 amplificaram, mas com valores de Ct abaixo do LOD, tendo as restantes sido confirmadas como positivas (Tabela 21). Das amostras negativas (TR14, TR18, TR19, TR24 e TR27) ou amplificadas abaixo do LOD (TR05, TR10, TR25, TR28 e TR29), deve-se realçar que por PCR qualitativa tinham aparecido bandas ténues ou quase inexistentes, ou seja, que os resultados de PCR em tempo real apresentaram-se concordantes com os resultados qualitativos, apesar de não concordantes com a rotulagem. Na rotulagem associada às amostras TR05, TR10, TR19 e TR27 indica que “podem conter vestígios de tremoço”, podendo-se assim considerar os resultados obtidos como concordantes com a rotulagem. Relativamente às amostras TR25 e TR28, cuja

rotulagem evidencia a presença de tremçoço como ingrediente, os valores de Ct foram abaixo do limite de detecção.

Tabela 21 - Resumo dos resultados obtidos por PCR convencional e PCR em tempo real para a detecção e quantificação de tremçoço em amostras comerciais.

Amostra	Informação relevante no rótulo	PCR qualitativa		PCR em tempo real	
		18SRG F/ 18SRG-R	La4-F2/ La4-R2	Ct ± SD	Tremçoço estimado ± SD (%)
TR03	Sem adição de tremçoço	+++	-		NA
TR04	Pode conter vestígios de tremçoço	+	-		NA
TR05	Pode conter vestígios de tremçoço	+++	+		<LOD
TR06	Pode conter vestígios de tremçoço	+	-		NA
TR07	Pode conter vestígios de tremçoço	+++	-		NA
TR08	Pode conter vestígios de tremçoço	+	-		NA
TR09	Pode conter vestígios de tremçoço	+++	-		NA
TR10	Pode conter vestígios de tremçoço	+++	+		<LOD
TR11	Pode conter vestígios de tremçoço	+++	-		NA
TR12	Pode conter vestígios de tremçoço	+	-		NA
TR13	Farinha de tremçoço	+++	+++	28,80 ± 0,16	0,28 ± 0,00
TR14	Farinha de tremçoço doce	+++	+		-
TR15	Proteína de tremçoço	+++	+++	32,68 ± 0,08	0,02 ± 0,00
TR16	Proteína de tremçoço	+++	+++	29,86 ± 0,04	0,14 ± 0,00
TR17	Farinha de tremçoço	+++	+++	29,23 ± 0,07	0,21 ± 0,01
TR18	Farinha de tremçoço	+++	+		-
TR19	Pode conter vestígios de tremçoço	+++	+/-		-
TR20	Pode conter vestígios de tremçoço	+++	+/-	37,05 ± 0,81	0,001 ± 0,000
TR21	Pode conter vestígios de tremçoço	+++	-		NA
TR22	Pode conter vestígios de tremçoço	+++	-		NA
TR23	Proteína de tremçoço	+++	+	27,37 ± 0,14	0,77 ± 0,08
TR24	Farinha de tremçoço doce	+++	+/-		-
TR25	Farinha de tremçoço doce	++	++		<LOD
TR26	Proteína de tremçoço	++	-		NA
TR27	Pode conter vestígios de tremçoço	+++	-		-
TR28	Farinha de tremçoço doce	++	+/-		<LOD
TR29	Farinha de tremçoço doce	++	+/-		<LOD

(+) amplificação positiva com banda ténue; (++) amplificação positiva com banda média; (+++) amplificação positiva com banda forte; (+/-) amplificação duvidosa; (-) amplificação negativa; SD – desvio padrão; NA – Não aplicável.

As restantes amostras comerciais amplificadas positivamente por PCR em tempo real apresentavam na rotulagem a presença de tremçoço como ingrediente (TR13, TR15, TR16, TR17 e TR23), à exceção de uma amostra que mencionava “pode conter vestígios de tremçoço” (TR20). Os resultados das amostras TR13, TR15, TR16, TR17 e TR23 foram concordantes com as bandas fortes obtidas por PCR qualitativa, permitindo estimar as concentrações de tremçoço entre 0,02% e 0,77%, que indica a presença de quantidades relativamente baixas, quando o tremçoço estava presente como ingrediente. Deve-se notar que a estimativa da proporção do tremçoço deveria ter sido efetuada através de uma curva de calibração normalizada que pudesse minimizar o efeito da matriz e do processamento, os quais poderão contribuir para subestimar o valor final. Na amostra TR20, o valor estimado foi de 0,001% de tremçoço, o que confirma a presença de vestígios de tremçoço.

Relativamente às amostras que não amplificaram positivamente por PCR em tempo real (TR14, TR18, TR24, TR28 e TR29), mas indicavam tremçoço como ingrediente, tais resultados demonstram que a rotulagem poderá não estar conforme, uma vez que todas foram fortemente positivas para a PCR com alvo no gene eucariota (Tabela 21). A amostra TR26, que contém proteína de tremçoço no rótulo, não amplificou por PCR qualitativa, tendo a banda com alvo no fragmento eucariota sido média. Neste caso, o efeito do processamento terá afetado a amplificação, tanto do gene eucariota, como do alvo, uma vez que o tremçoço foi adicionado na forma de um ingrediente previamente processado (proteína).

8 CONCLUSÃO

A alergia alimentar, no que diz respeito ao tremço, é um problema de saúde pública importante devido à sua crescente utilização na indústria alimentar. Consequentemente, o tremço é considerado como uma potencial fonte de alérgenos ocultos devido a rotulagem incorreta ou inclusão involuntária resultante da contaminação cruzada durante o processamento industrial. Por outro lado, para dar cumprimento à legislação, existe uma rotulagem excessiva sobre a presença de potenciais alérgenos, restringindo assim a gama de alimentos adequados a pessoas alérgicas. Desta forma, a monitorização da contaminação cruzada na indústria alimentar constitui uma etapa bastante importante, para a salvaguarda da saúde dos consumidores propensos ao desenvolvimento de alergias alimentares provocadas pela ingestão de potenciais alérgenos como o tremço. Para tal, o desenvolvimento de metodologias analíticas capazes de detetarem quantidades vestigiais de alimentos potencialmente alérgicos, como o caso tremço, é fulcral dado não existirem ainda métodos de referência.

As metodologias utilizadas neste trabalho basearam-se na análise de ADN, podendo tirar partido da maior estabilidade destas moléculas em comparação com as proteínas uma vez que os produtos comerciais a ser analisados eram processados. Adicionalmente, a elevada sensibilidade e especificidade da amplificação do ADN por PCR são vantagens a referir. Desta forma, a deteção de tremço foi efetuada com recurso às técnicas de PCR convencional e PCR em tempo real, que constituem opções de elevada fiabilidade e aplicabilidade na deteção de alérgenos alimentares.

Para o desenvolvimento deste trabalho e na ausência de materiais de referência disponíveis, prepararam-se misturas binárias como padrões de referência, contendo farinha de tremço em farinha de arroz e farinha de tremço em farinha de trigo que permitiram o desenvolvimento e otimização dos métodos propostos.

A extração de ADN é uma etapa crucial para a deteção de quantidades vestigiais em matrizes alimentares complexas e processadas, como é o caso da deteção de potenciais alérgenos. Neste trabalho utilizaram-se dois métodos: *Wizard* para se obterem os extratos de ADN das amostras comerciais e o método *Nucleospin Food*, utilizando diferentes concentrações de ARNse, para se obterem os extratos de ADN das misturas de referência e das sementes de tremço. O método *Nucleospin Food* evidenciou um melhor desempenho e reprodutibilidade, tendo como vantagem a sua facilidade e rapidez de execução, permitindo o melhor compromisso entre rendimento e pureza.

Após extração, desenharam-se três conjuntos de *primers* após o alinhamento de várias sequências nucleotídicas que codificam diferentes proteínas (δ -conglutinas e PR-10), de forma a amplificar o género *Lupinus*. As sequências utilizadas para o desenho dos *primers* foram escolhidas por serem diferentes das reportadas pela bibliografia. As PR-10 são um grupo de proteínas homólogas da Bet v 1, ou seja, proteínas que podem induzir uma reação alérgica por sensibilização através do trato respiratório. No entanto, o alergénio Lup an 1, o único alergénio documentado na base de dados oficial, tem merecido um maior destaque. Dos três pares de *primers* desenhados, apenas um deles se revelou específico para a deteção do tremço (La4-F2/La4-F2), com alvo no gene que codifica as proteínas PR-10, não mostrando qualquer reatividade para diversas espécies animais e vegetais não alvo, mas apresentando-se específicos para as espécies de tremço testadas (*L. albus*, *L. luteus*, *L. mutabilis* e *L. angustifolius*) por PCR qualitativa. Depois de otimizado o método de PCR específica de *Lupinus* spp., determinou-se a sua sensibilidade absoluta e relativa, sendo o LOD absoluto foi de 0,0002 ng de ADN de tremço. Relativamente ao LOD relativo, alcançaram-se diferentes níveis para misturas binárias de tremço em arroz e tremço em trigo, com e sem processamento. Nas misturas binárias de tremço em arroz obteve-se um LOD relativo de 5 mg kg⁻¹, enquanto nas misturas binárias de tremço em trigo LOD relativo foi de 100 mg kg⁻¹, em farinhas e em produtos de padaria.

Depois de desenvolvido o método de PCR qualitativa para a deteção do tremço, com base nos mesmos *primers* e numa nova sonda do tipo TaqManTM, procedeu-se à implementação do método de PCR em tempo real. A especificidade do método de PCR em tempo real foi também estada para as quatro espécies de tremço, cujo resultado mostrou que apenas as espécies *L. albus* e *L. luteus* amplificaram positivamente, podendo este facto ser explicado por existirem pequenas diferenças nas sequências nucleotídicas na região de ligação da sonda, a qual confere maior especificidade ao método. Neste método apenas, foram utilizadas as misturas binárias de tremço em arroz, atingindo-se um LOD absoluto de 2 pg de ADN de tremço, e um LOD relativo de 10 mg kg⁻¹ de tremço. Estes valores de LOD apresentaram-se aparentemente inferiores aos da técnica de PCR qualitativa, podendo ser explicados pelo excesso de otimização da técnica de PCR qualitativa para uma sensibilidade demasiado elevada, sendo por isso mais suscetível ao aparecimento de resultados falsos positivos. Por outro lado, seria necessário efetuar mais ensaios de PCR em tempo real com maior número de concentrações no limiar do limite de deteção.

Por fim, passou-se à aplicação da técnica a amostras de alimentos processados de forma a confirmar e quantificar os resultados positivos para tremço por PCR qualitativa, tendo-se considerado como semi-quantificação por não se ter normalizado o método. De uma

maneira geral, os resultados de PCR em tempo real apresentam-se concordantes com os resultados de PCR qualitativa, embora vários casos não concordantes com a presença de tremço na rotulagem.

Apesar de muitas das amostras comerciais serem sujeitas a elevado nível de processamento, foi possível extrair ADN amplificável dos 27 produtos testados, que foram posteriormente avaliados para a presença de tremço. Das amostras testadas, 15 foram positivas em ensaios de PCR qualitativa para a presença de tremço, mas efetivamente apenas 5 foram confirmadas como positivas por PCR em tempo real, com concentrações de tremço estimadas entre 0,02% e 0,77%. Outras 5 amostras apresentaram amplificação positiva por PCR em tempo real, mas abaixo do limite de deteção, não podendo por isso ser consideradas como positivas.

Das 27 amostras testadas, 14 mencionavam “podem conter vestígios de tremço”, mas apenas em uma amostra foi confirmada a presença vestigial de tremço, a qual foi também detetada noutras duas, mas abaixo do limite de deteção, mostrando efetivamente a prática da rotulagem de precaução. Relativamente às 12 amostras que foram negativas para a presença de tremço que estava referido como ingrediente, tais resultados poderão sugerir a não conformidade com a rotulagem, uma vez que todas foram positivas para a PCR com alvo no gene eucariota.

Como perspetiva futura e de forma a complementar os resultados obtidos neste trabalho, é de salientar a necessidade de sequenciação das espécies de tremço em estudo, nomeadamente *L. albus*, *L. angustifolius*, *L. luteus* e *L. mutabilis*. Essa sequenciação necessitaria de amplificar uma zona com cerca de ~400 bp contendo a região de 134 pb amplificada pelos *primers* La4-F1/La4-R1, através do desenho de um novo par de *primers*. Além disso, também seria interessante a realização de novos ensaios permitindo avaliar a reprodutibilidade dos resultados obtidos no presente estudo, nomeadamente em PCR em tempo real, a realização de ensaios com maior número de repetições de forma aumentar a robustez do método.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aalberse, R C. (2007) Assessment of allergen cross-reactivity. *Clinical and Molecular Allergy*. 5:2.
- Aalberse, R C; Akkerdaas, J; Ree, R. (2001) Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens. *Allergy*, 56:478-490.
- Álvarez-Álvarez, J; Guillamoá, E; Crespo, J F; Cuadrado, C; Burbano, C; Rodriáquez, J; Fernández, C; Muzquiz, M. (2005) Effects of Extrusion, Boiling, Autoclaving, and Microwave Heating on Lupine Allergenicity. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 53:1294-298.
- Asensio, L; González, I; García, T; Martín, R. (2008). Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control*, 19 (1): 1-8.
- Bannon, G A. (2004) What Makes a Food Protein an Allergen? *Current Allergy and Asthma Reports*, 4:43-46.
- Berkner, H; Neudecker, P; Mittag, D; Ballmer-Weber, B K; Schweimer, K; Vieths, S; Rösch, P. (2009) Cross-reactivity of pollen and food allergens: soybean Gly m 4 is a member of the Bet v 1 superfamily and closely resembles yellow lupine proteins. *Bioscience Reports*, 29:183-192.
- Besler, M. (2001) Determination of allergens in foods. *Trends in Analytical Chemistry*, 11(20):662-672.
- Boyce, J A; Assa'ad, A; Burks, A W; Jones, S M; Sampson, H A; Wood, R A. (2010) Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126:51-58.
- Breiteneder, H; Ebner, C. (2000) Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106:27-36.
- Breiteneder, H; Mills, E N C. (2005) Plant food allergens-structural and functional aspects of allergenicity. *Biotechnology Advances*, 23:395-399.
- Breiteneder, H; Radauer, C. (2004) A classification of plant food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113: 821-30.
- Brennecke, S; Becker, W M; Lepp, U; Jappe, U. (2007) Anaphylactic reaction to lupine flour. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 5:774-776.
- Broeders, S; Huber, I; Grohmann, L; Berben, G; Taverniers, I; Mazzara, M; Roosens, N; Morisset, D. (2014) Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends in Food Science & Technology*, 37:115-126.
- Bustin, S A; Benes, V; Garson, J A; Hellems, J; Huggett, J; Kubista, M; Mueller, R; Nolan, T; Pfaffl, M W; Shipley, G L; Vandesompele, J; Wittwer, C T. (2009) The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4): 611-622.
- Campbell, C P; Jackson, A S; Johnson, A R; Thomas, P S; Yates, D H. (2007) Occupational sensitization to lupin in the workplace: Occupational asthma, rhinitis, and work-aggravated asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119:1133-1139.
- Capraro, J; Magni, C; Fontanesi, M; Budelli, A; Duranti, M. (2008) Application of two-dimensional electrophoresis to industrial process analysis of proteins in lupin-based pasta. *LWT-Food Science and Technology*, 41:1011-1017.
- Cianferoni, A; Spergel, J M. (2009) Food Allergy: Review, Classification and Diagnosis. *Allergology International*, 58:457-466.
- Costa, J; Carrapatoso, I; Oliveira, M B P P; Mafra, I. (2014) Walnut allergens: molecular characterization, detection and clinical relevance. *Clinical & Experimental Allergy*, 44 (3):319-341.

- Costa, J; Mafra, I; Carrapatoso, I; Oliveira, M B P P. (2012a) Almond Allergens: Molecular Characterization, Detection, and Clinical Relevance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(6):1337–1349.
- Costa, J; Oliveira, M B P P; Mafra, I. (2012b) Alergénios alimentares: o que são, o que provocam e como detetá-los? *Química*, 127:33-38.
- Costa, J; Oliveira, M B P P; Mafra, I. (2013) Effect of thermal processing on the performance of the novel single-tube nested real-time PCR for the detection of walnut allergens in sponge cakes. *Food Research International*, 54(2): 1722–1729.
- Day, L. (2013) Proteins from land plants e potential resources for human nutrition and food security. *Trends in Food Science & Technology*, 32:25-42.
- De las Marinas, D; Cojocariu, Z; Escudero, R; Pardo, N; Sanz, M L. (2007) Anaphylaxis induced by lupine as a hidden allergen. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 17:283-284.
- Demmel, A; Hupfer, C; Busch, U; Engel, K.H (2011) Detection of lupine (*Lupinus* spp.) in processed foods using real-time PCR. *Food Control*, 22:215-220.
- Demmel, A; Hupfer, C; Hampe, E; Busch, U; Engel, K H. (2008) Development of a real-time PCR for the detection of lupine (*Lupinus* species) in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56:4328-4332.
- Demmel, A; Hupfer, C; Hampe, E; Busch, U; Engel, K H. (2012) Quantification of lupine (*Lupinus angustifolius*) in wheat flour using real-time PCR and an internal standard material. *European Food Research and Technology*, 235:61-66.
- Directiva 2007/68/CE da Comissão de 27 de Novembro de 2007 que altera o anexo III A da Directiva 2000/13/CE do Parlamento Europeu e do Conselho no que respeita a determinados ingredientes alimentares. *Jornal Oficial da União Europeia*, 310, 11-14.
- Drakos, A; Doxastakis, G; Kiosseoglou, V. (2007) Functional effects of lupin proteins in comminuted meat and emulsion gels. *Food Chemistry*, 100: 650-655.
- Duranti, M; Consonni, A; Magni, M; Sessa, F; Scarafoni, A. (2008) The major proteins of lupin seed: Characterisation and molecular properties for use as functional and nutraceutical ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, 1919:624- 633.
- Ecker, C; Cichna-Markl, M. (2012) Development and validation of a sandwich ELISA for the determination of potentially allergenic lupine in food. *Food Chemistry*, 130:759-766.
- Ecker, C; Ertl, A; Cichna-Markl, M. (2013a) Development and validation of two competitive ELISAs for the detection of potentially allergenic lupine (*Lupinus* species) in food. *Food Analytical Methods*, 6:248-257.
- Erbaş, M; Certel, M; Uslu, M K. (2005) Some chemical properties of white lupin seeds (*Lupinus albus* L.) *Food Chemistry*, 89:341-345.
- Eriksson, N E; Moller, C; Werner, S; Magnusson, J; Bengtsson, U; Zolubas, M. (2004) Self-reported food hypersensitivity in Sweden, Denmark, Estonia, Lithuania, and Russia. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 14:70-9.
- Faeste, C K; Lovik, M; Wike, H G; Egaas, E. (2004) A case of peanut crossallergy to lupine flour in a hot dog bread. *International Archives of Allergy and Immunology*, 135:36-9.
- Fajardo, V, González, I; Rojas, M; García, T; Martín, R. (2010). A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species. *Trends in Food Science & Technology*, 21(8): 408-421.
- Fernandez-Orozco, R; Frias, J; Muñoz, R; Zielinski, H; Piskula, M K; Kozłowska, H; Vidal-Valverde, C. (2008) Effect of fermentation conditions on the antioxidante compounds and antioxidant capacity of *Lupinus angustifolius* cv. Zapaton. *European Food Research and Technology*, 227:979-988.
- Ferreira, F; Hawranek, T; Gruber, P; Wopfner, N; Mari, A. (2004) Allergic cross-reactivity: from gene to the clinic. *Allergy*, 59:243-267.

- Galan, A M G; Brohée, M; Scaravelli, E; Van Hengel, A J; Chassaingne, H. (2010) Development of real-time PCR assays for the detection of lupin residues in food products. *European Food Research and Technology*, 230:597-608.
- Galan, A M G; Brohée, M; Silva, A E; Hengel, A J; Chassaingne. (2011) Development of a real-time pcr method for the simultaneous detection of soya and lupin mitochondrial ADN as markers for the presence of allergens in processed food. *Food Chemistry*, 127(2):834-841.
- García, B E; Lizaso, M T. (2011) Cross-reactivity Syndromes in Food Allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 21:162-170.
- Garcia-Canas, V; Cifuentes, A; Gonzalez, R. (2004) Detection of genetically modified organisms in foods by ADN amplification techniques. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44 (6): 425-36.
- Gayraud, J; Mairesse, M; Fontaine, J F; Thillay, A; Leduc, V; Rancé, F; Parisot, L; Moneret-Vautrin, D A. (2009) The prevalence of sensitization to lupin flour in France and Belgium: a prospective study in 5366 patients, by the allergy vigilance network, *European annals of allergy and clinical immunology*, 41(1):17-22.
- Gladstones, J S; Atkins, C A; Hamblin, J. (1998) Lupins as crop plants: Biology, production and utilization (CAB International, Wallingford, Oxon, UK).
- Glencross, B D. (2001) Feeding lupins to fish: A review of the nutritional and biological value of lupins in aquaculture feeds. Department of Fisheries – Research Division Government of Western Australia.
- Guarneri, F; Guarneri, C. (2005) Identification of potentially cross-reactive peanut-lupine proteins by computer-assisted search for amino acid sequence homology. *International Archives of Allergy and Immunology*, 138:273-277.
- Guillamón, E; Rodríguez, J; Burbano, C; Muzquiz, M; Pedrosa, M M; Cabanillas, B; Crespo, J F; Sancho, A I; Mills, E N C; Cuadrado, C. (2010) Characterization of lupin major allergens (*Lupinus albus* L.). *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(11):1668-1676.
- Hanelt, P. (2001) Leguminosae: Subfam Papilionoidae (Fabaceae). In Mansfeld's Encyclopedia of Agricultural and Horticultural Crops. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (Eds.), 2:913-921.
- Harrer, A; Egger, M; Gadermaier, G; Erlen, A; Hauser, M; Ferreira, F; Himly, M. (2010) Characterization of plant food allergens: an overview on physicochemical and immunological techniques. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54:93-112.
- Hauser, M; Egger, M; Wallner, M; Wopfner, N; Schmidt, G; Ferreira, F. (2008) Molecular Properties of Plant Food Allergens: A Current classification into Protein Families. *The Open Immunology Journal*, 1:1-12.
- Hefle, S L; Lemanske, R F; Bush, R K. (1994) Adverse reaction to lupine-fortified pasta, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 94, 167.
- Hengel, A. (2007) Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389:111-118.
- Hoffmann-Sommergrube, K. (2002) Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens. *Biochemical Society Transactions*, 30(6):930-935.
- Hoffmann-Sommergruber, K; Mills, E N C. (2009) Food allergen protein families and their structural characteristics and application in component-resolved diagnosis: new data from the EuroPrevall project, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395, 25.
- Holden, L; Faeste, C K; Egaas, E. (2005) Quantitative sandwich ELISA for the determination of lupine (*Lupinus* spp) in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:5866-71.
- Holden, L; Haugland Moen, L; Sletten, G B G; Dooper, M M B W. (2007) Novel polyclonal-mono-clonal-based ELISA utilized to examine lupine (*Lupinus* species) content in food products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:2536-2542.
- Imamura, T; Kanagawa, Y; Ebisawa, M. (2008) A survey of patients with self-reported severe food allergies in Japan. *Pediatric Allergy and Immunology*, 19:270-274.

- Jappe, U; Vieths, S. (2010) Review -Lupine, a source of new as well as hidden food allergens. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54:113-126.
- Jayasena, V; Chih, H J; Nasar-Abbas, S M (2010) Functional properties of sweet lupin protein isolated and tested at various pH levels. *Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 6: 130-137.
- Jiménez-Martínez, C; Hernández-Sánchez, H; Dávila-Ortiz, G. (2003) Production of a yogurt-like product from *Lupinus campestris* seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83:515-522.
- Kanny, G; Guerin, L; Moneret-Vautrin, D A. (2000) Risk of serious asthma due to lupine flour associated with peanut allergy. *Revue de Médecine Interne*, 21:191-194.
- Kaw, C H; Hefle, S L; Taylor, S L. (2008) Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of lupine residues in foods. *Journal of Food Science*, 73:135-140.
- Lampart-Szczapa, E; Korczak, J; Nogala-Kalucka, M; Zawirska-Wojtasiak, R. (2003) Antioxidant properties of lupin seed products. *Food Chemistry*, 83:279-285.
- Lee, A L; Burks, A W. (2006b) Food Allergies: Prevalence, Molecular Characterization, and Treatment/Prevention Strategies. *Annual Review of Nutrition*, 26:539–65.
- Lee, Y P; Mori, T A; Sipsas, S; Barden, A. (2006a) Lupin enriched bread increases satiety and reduces energy intake acutely. *American Journal of Clinical Nutrition*, 84: 975–980.
- Lima, N; Mota, M. (2003) Engenharia Genética. In; Sá-Correia, I; Moreira, L M; Fialho, A M. *Biociencia. Fundamentos e aplicações*. Lidel, 125-161.
- Lup'ingredients (2015) - <http://www.lupin.fr/> (ultimo acesso a 19-02-2015);
- Mafra, I; Ferreira, I M P L V O; Oliveira, M B P P. (2008a) Food authentication by PCR-based methods. *European Food Research and Technology*, 227:649-665.
- Mafra, I; Silva, S; Moreira, E J M O; Silva, C S F; Oliveira, M B P P. (2008b) Comparative study of ADN extraction methods for soybean derived food products. *Food Control* 19 (12): 1183-1190.
- Magni, C; Herndl, A; Sironi, E; Scarafoni, A; Ballabio, C; Restani, P; Roberto, B; Novembre, E; Vierucci, A; Duranti, M. (2005) One- and two-dimensional electrophoretic identification of IgE-binding polypeptides of *Lupinus albus* and other legume seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:4567-4571.
- Maknickienė, Z; Asakavičiūtė, R. (2008) Alkaloid content variations in lupin (*Lupinus L.*) Genotypes and vegetation periods. *Biology*, 54:112-115.
- Maleki, S J; Chung, S Y; Champagne, E T; Raufman, J P. (2000) The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106:763-768.
- Martín, I; García, Z; Fajardo, T V; López-Calleja, I; Rojas, M; Hernández, P E; González, I; Martín, R. (2007). Mitochondrial markers for the detection of four duck species and the specific identification of Muscovy duck in meat mixtures using the polymerase chain reaction. *Meat Science*, 76(4): 721-729.
- Martinez-Villaluenga, C; Frias, J; Vidal-Valverde, C; (2006) Functional lupin seeds (*Lupinus albus L.* and *Lupinus luteus L.*) after extraction of α -galactosides. *Food Chemistry*, 98: 291–299.
- Martinez-Villaluenga, C; Zieliński, H; Frias, J; Piskula, M K; Kozłowska, H; Vidal-Valverde, C. (2009): Antioxidant capacity and polyphenolic content of high-protein lupin products. *Food Chemistry*, 112: 84–88.
- Mattarozzi, M; Bignardi, C; Elviri, L; Careri, M. (2012) Rapid Shotgun Proteomic Liquid Chromatography–Electrospray Ionization–Tandem Mass Spectrometry-Based Method for the Lupin (*Lupinus albus L.*) Multi-allergen Determination in Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(23):5841-5846.

- Mohamad, N A; Sheikha, A F; Mustafa, S; Mokhtar, N K. (2013) Comparison of gene nature used in real-time PCR for porcine identification and quantification: A review." *Food Research International* **50**(1): 330-338.
- Monaci, L; Visconti, A. (2009) Mass spectrometry-based proteomics methods for analysis of food allergens. *Trends in Analytical Chemistry*, **28**(5):581-591
- Monaci, L; Visconti, A. (2010) Immunochemical and -based methods in food allergen analysis and quality assurance perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, **21**(6):272-283.
- Moneret-Vautrin, D A. (2006) The concept of allergy surveillance: action of the allergy surveillance network. *Revue de Médecine Interne*, **27**:570-572.
- Moneret-Vautrin, D A; Guérin, L; Kanny, G; Flabbee, J; Frémont, S; Morisset, M. (1999) Cross-allergenicity of peanut and lupine: the risk of lupine allergy in patients allergic to peanuts. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **4**:883-888.
- Montowska, M; Pospiech, E. (2010). Authenticity Determination of Meat and Meat Products on the Protein and ADN Basis. *Food Reviews International*, **27**(1): 84-100.
- Muzquiz, M; Burbano, C. (2005). Bioactive compounds in *Lupinus* spp. Implications for nutrition and health. In Santen, E; Hill, G D. (eds) *Where old and new world lupins met*. Proceedings of the 11 th International Lupin Conference. International Lupin Association. ISBN 0-86476-165-1.
- Muzquiz, M; Ridout, C L; Price, K R; Fenwick, G R. (1993) The saponin content and composition of sweet and bitter lupin seed. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **63**:47-52.
- Oomah, B D; Tiger, N; Olson, M; Balasubramanian, P. (2006) Phenolics and antioxidative activities in narrowleafed lupins (*Lupinus angustifolius*). *Plant Foods for Human Nutrition*, **61**:91-97.
- Ortiz, L T; Alzueta, C; Trevino, J; Castano, M. (1994) Effects of faba bean tannins on the growth and histological structure of the intestinal tract and liver of chicks and rats. *British Poultry Science*, **35**:743-754.
- Pastor-Cavada, E; Juan, R; Pastor, J E; Alaiz, M; Vioque, J. (2009) Analytical nutritional characteristics of seed proteins in six wild *Lupinus* species from Southern Spain. *Food Chemistry*, **117**:466-469.
- Peeters, K A; Nordlee, J A; Penninks, A H; Chen, L; Goodman, R E; Bruijnzeel-Koomen, C A; Hefle, S L; Taylor, S L; Knulst, A C. (2007) Lupine allergy: Not simply cross-reactivity with peanut or soy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **120**(3):647-653.
- Peeters, K I A; Koopelman, S J; Penninks, A H; Lebens, A; Bruijnzeel-Koomen, C A; Hefle, S L; Taylor, S L; van Hoffen, E; Knulst, A C. (2009) Clinical relevance of sensitization to lupine in peanut sensitized adults. *Allergy*, **64**:549-555.
- Picariello, G; Mamone, G; Addeo, F; Ferranti, P. (2011) The frontiers of mass spectrometry-based techniques in food allergenomics. *Journal of Chromatography A*, **1218**:7386-98.
- Pollard, N J; Stoddard, F L; Popineau, Y; Wrigley, C W; MacRitchie, F. (2002) Lupin flours as additives: Dough mixing, breadmaking, emulsifying and foaming. *Cereal Chemistry*, **79**: 662-669.
- Poms, R E; Klein, C L; Anklam, E. (2004) Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Additives and Contaminants*, **21**:1-31.
- Pozani, S; Doxastakis, G; Kiosseoglou, V. (2002) Functionality of lupin seed protein isolate in relation to its interfacial behavior. *Food Hydrocolloids*, **16**:241-247.
- Quaresma, R R; Viseu, R; Martins, L M; Tomaz, E; Inácio, F. (2007) Allergic primary sensitization to lupine seed. *Allergy*, **62**:1473-1474.
- Radauer, C; Breiteneder, H. (2007) Evolutionary biology of plant food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **120**:518-525.
- Radcliffe, M; Scadding, G; Brown, H M. (2005) Lupin flour anaphylaxis. *Lancet*, **365**:1360.

- Ramachandran, S; Christensen, H E; Ishimaru, Y; Dong, C H; Chao-Ming, W; Cleary A L; Chua, N. (2000) Profilin plays a role in cell elongation, cell shape maintenance, and flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 124:1637-47.
- Raymundo, A; Empis, J; Sousa, I. (1998) White lupin protein isolate as a foaming agent. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 207:91–96.
- Regulamento (UE) N. o 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de Outubro de 2011 relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios, que altera os Regulamentos (CE) n.o 1924/2006 e (CE) n.o 1925/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho e revoga as Directivas 87/250/CEE da Comissão, 90/496/CEE do Conselho, 1999/10/CE da Comissão, 2000/13/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, 2002/67/CE e 2008/5/CE da Comissão e o Regulamento (CE) n.o 608/2004 da Comissão. *Jornal Oficial da União Europeia*, 304, 18-63.
- Reinhard, H; Rupp, H; Sager, F; Streule, M; Zoller, O; (2006) Quinolizidine alkaloids and phomopsins in lupin seeds and lupin containing food. *Journal of Chromatography A*, 1112:353-360.
- Röder, M; Kleiner, K; Sachs, A; Keil, N; Holzhauser, T. (2013) Detectability of lupine seeds by ELISA and PCR may be strongly influenced by potential differences between cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61:5936-5945.
- Rodriguez-Lazaro, D; Hernandez, M. (2013). Real-time PCR in Food Science: Introduction. *Current Issues in Molecular Biology*, 15 (2): 25-38.
- Rojas-hijazo, B; Garcés, M M; Caballero, M. L; Alloza, P; Moneo, I. (2006) Unsuspected lupin allergens hidden in food. *International Archives of Allergy and Immunology*, 141(1):47-50.
- Sampson, H A. (1999) Food allergy. Part 1: Immunopathogenesis and clinical disorders. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 103:717-728.
- Scarafoni, A; Ronchi, A; Duranti, M. (2009) A real-time PCR method for the detection and quantification of lupin flour in wheat flour-based matrices. *Food Chemistry*, 115:1088-1093.
- Schubert-Ullrich, P; Rudolf, J; Ansari, P; Galler, B; Fuhrer, M; Molinelli, A; Baumgartner, S. (2009) Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: an overview. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395:69-81.
- Shaw, J; Roberts, G; Grimshaw, K; White, S; Hourihane, J. (2008) Lupin allergy in peanut-allergic children and teenagers. *Allergy*, 63:370-373.
- Shewry, P R; Beaudoin, F; Jenkins, J; Griffiths-Jones, S; Mills, E N C. (2002) Plant protein families and their relationships to food allergy. *Biochemical Society Transactions*, 0:906-910.
- Shewry, P R; Jenkins, J A; Beaudoin; Mills, E N C. (2004) The Classification, Functions and Evolutionary Relationships of Plant Proteins in Relation to Food Allergies. In Mills, E N C; Shewry; P R. *Plant Food Allergens*. ISBN 0-632-05982-6.
- Sicherer, M D; Sampson H A. (2006) Food allergy. *Journal Allergy Clinical Immunology*, 117:470-475.
- Sicherer, M D; Sampson, H A. (2009) Food Allergy: Recent Advances in Pathophysiology and Treatment. *Medicine-Annual Review of Medicine*, 60:261-77.
- Sicherer, M D; Sampson, H A. (2010) Food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125:116-25.
- Sicherer, M D; Sampson, H A. (2014) Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133 (2), 291-307.
- Sinha, M; Singh, R p; Kushwaha, G S; Iqbal, N; Singh, A; Kaushik, S; Kaur, P; Sharma, S; Singh, T P. (2014) Current Overview of Allergens of Plant Pathogenesis Related Protein Families *The Scientific World Journal*, 19.
- Smith C J; Osborn, A M. (2009) Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology, *FEMS Microbiology Ecology* 67: 6-20

- Smith, W B; Gillis, D; Kette, F E. (2004) Lupin: a new hidden food allergen. *Medical Journal of Australia*, 181:219-220.
- Trugo, L C; Bear, D; Bear, E. (2003) Lupin. In Caballero, B; Trugo, L C; Finglas, P M. *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. 2nded, Academic Press, 3623-3629.
- Tucek, M. (2006) Use of lupin bran in high-fibre food products. Patent No. WO/2006/133492.PCT/AU2006/000821.
- Uzun, B; Arslan, C; Karhan, M; Toker, C. (2007) Fat and fatty acids of white lupin (*Lupinus albus* L.) in comparison to sesame (*Sesamum indicum* L.). *Food Chemistry*, 102:45-49.
- Verma, A K; Kumar, S; Das, M; Dwivedi, P D. (2012) Impact of Thermal Processing on Legume Allergens. *Plant Foods for Human Nutrition*, 67:430-441.
- Verma, A K; Kumar, S; Das, M; Dwivedi, P D. (2013) A Comprehensive Review of Legume Allergy. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 45:30-46.
- Videira, A. (2001) Reação em cadeia de polymerase. In: Videira, A. *Engenharia genética. Princípios e aplicações*. Lidel, 67-70.
- Witke, W. (2004) The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends in Cell Biology*, 14(8):461-469.
- Wüthrich, B; Mitag, D; Ballmer-Weber, B K. (2004) Die pizza: eine quelle von unerwarteten allergenen-anaphylaktische reaktion auf lupinenmehl im pizzateig und in einem lebkuchen. *Allergologie*, 27:495-502.
- Yan, H, Kun, L X. (2013) Real-Time Fluorescent PCR by labeled primer with a single fluorescent molecule. In: Nolan, T, Bustin, S., A. editors. *PCR technology: Current innovations*. Taylor & Franis group, LLC. pp. 63-72.
- Zha, D M; Xing, X M; Yang, F H. (2011). Rapid identification of deer products by multiplex PCR assay. *Food Chemistry* 129 (4): 1904-1908.
- Zielinska, D; Frias, J; Piskula, M K; Kozłowska, H; Zielinski, H; Vidal-Valverde, C. (2008) Evaluation of the antioxidant capacity of lupin sprouts germinated in the presence of selenium. *European Food Research and Technology*, 227:1711-1720.