



Métodos de biologia molecular para a deteção de alergénios do caju (*Anacardium occidentale*): avaliação do efeito da matriz e do processamento

Cíntia Raquel da Fonte Mendes

**Dissertação do 2º ciclo de estudos conducente ao grau de
Mestre em Controlo de Qualidade, especialidade Água e Alimentos**

Trabalho realizado sob a orientação:

Doutora Joana Sofia Barros Costa
Doutora Isabel Maria Sousa Gomes Mafra
Professora Doutora Maria Beatriz Prior Pinto de Oliveira

Porto, Julho 2016

É autorizada a reprodução integral desta dissertação apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.

AGRADECIMENTOS

Primeiro, agradecer à Doutora Joana Costa a disponibilidade e paciência que manifestou para comigo acompanhando-me sempre desde o início. Obrigada pela oportunidade que me deu em fazer parte do seu trabalho e possibilitando a sua continuação, agradecendo-lhe os conhecimentos de biologia molecular adquiridos. Obrigada pelo apoio e dedicação, e à grande ajuda que me prestou tanto a nível experimental como na escrita deste trabalho, e principalmente pela confiança que depositou em mim.

À Doutora Isabel Mafra pela preocupação e cuidado que demonstrou para comigo e pela oportunidade em entrar neste grupo de investigação. Obrigada pelos conselhos, pelos conhecimentos transmitidos e pela boa disposição.

À Professora Doutora Beatriz Oliveira por ter disponibilizado todas as condições necessárias para a realização deste projeto. Gostaria ainda de lhe agradecer pelo cuidado e preocupação que demonstrou ao longo de todo este percurso.

Aos meus companheiros de laboratório: Caterina Villa, Telmo Fernandes, Liliana Grazina e Sónia Soares que sempre disponibilizaram um pouco do seu tempo na ajuda do trabalho experimental, pelos conselhos partilhados e pela companhia agradável no laboratório.

Às minhas colegas e amigas, Catarina e Inês, que partilharam este ano de trabalho comigo. O meu muito obrigada pelo apoio e a união, companhia e preocupações partilhadas e pelos conselhos e dúvidas que souberam tirar-me.

Aos meus amigos, todos sem exceção, particularmente às minhas “divas”, que conseguiram dar-me alegria e força de vontade, que partilharam também seus conhecimentos e tormentas.

Um obrigado especial ao Bruno Santos pela paciência, por acreditar em mim e pela energia positiva que sempre me proporcionou.

O meu último agradecimento vai aos mais importantes, aos que sempre estiveram presentes apesar de tão longe se encontrarem, aos que sempre me protegeram frente a qualquer obstáculo, aos que mais me deram força e apoio, aos que mais se preocupam, aos que mais se orgulham do meu percurso, aos que mais acreditam em mim e aos que me proporcionam as maiores felicidades: à minha mãe, ao meu pai e à minha irmã. Sem eles, este trabalho seria impossível.

MERCI

!!!

RESUMO

A castanha de caju, designada botanicamente como *Anacardium occidentale*, é responsável por reações imunológicas adversas que variam de moderadas a potencialmente fatais em indivíduos sensibilizados/alérgicos. Até agora, estão identificados três alérgenos na lista oficial da Organização Mundial de Saúde e da União Internacional das Sociedades de imunologia (WHO/IUIS), nomeadamente Ana o 1, Ana o 2 e Ana o 3. De modo a proteger os consumidores alérgicos, a União Europeia estabeleceu legislação que estabelece a rotulagem obrigatória dos frutos de casca rija (ex. caju) e de mais treze grupos de alimentos alérgicos. Com o objetivo de garantir a conformidade da rotulagem dos alimentos, tanto as indústrias como as autoridades reguladoras necessitam de metodologias fidedignas para a deteção/monitorização de alérgenos em produtos processados.

O objetivo do trabalho consistiu no desenvolvimento de métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) para detetar/quantificar o caju com potencial alérgico. Para esta finalidade, misturas modelo de massa e farinha de trigo contendo quantidades conhecidas de caju (50-0,0001%, $n=13$) foram preparadas, assim como misturas cegas de validação (8-0,25%, $n=4$), para avaliar o efeito de matriz. De igual modo, foram preparadas massas modelo para biscoitos de caju e respetivos biscoitos cozidos (10-0,0001%, $n=11$), juntamente com as respetivas misturas cegas (8-0,20%, $n=4$), visando avaliar os efeitos do processamento e da matriz. A extração do ADN foi realizada utilizando o *kit* comercial *NucleoSpin Food*. Para os ensaios de PCR, foram desenhados *primers*, tendo como alvo os três genes que codificam os alérgenos do caju (Ana o 1, Ana o 2 e Ana o 3). A especificidade dos *primers* foi avaliada *in silico*, recorrendo a ferramentas bioinformáticas e experimentalmente por PCR qualitativa.

Os ensaios de PCR qualitativa otimizados permitiram obter sensibilidades absolutas de 10 pg e 1 pg de ADN de caju para os genes Ana o 1 e Ana o 2/Ana o 3, respetivamente. A técnica de PCR em tempo real com sondas de hidrólise permitiu propor dois métodos com alvo nos genes Ana o 2 e Ana o 3, com sensibilidades absolutas de 1 pg de ADN de caju. Em termos relativos, os sistemas propostos atingiram entre 50 a 500 mg/kg, dependendo do tipo de matriz e o processamento. O sistema normalizado com alvo no gene Ana o 3 evidenciou uma sensibilidade de 50 mg/kg para as massas modelo e biscoitos de caju, podendo ser aplicado para a deteção de caju em matrizes alimentares complexas. Pode-se concluir que este trabalho permitiu propor ferramentas adequadas para a deteção e quantificação de caju como alérgico em alimentos processados.

Palavras-chave: *Anacardium occidentale*, alérgenos, deteção, PCR qualitativa, PCR em tempo real, produtos processados.

ABSTRACT

Cashew, botanically known as *Anacardium occidentale*, is responsible for adverse immunological reactions in sensitized allergic individuals, which vary from mild to potentially life-threatening. So far, three proteins have been identified as allergens by the official list of the World Health Organization and the International Union of Immunological Societies (WHO/IUIS), namely Ana o 1, Ana o 2 and Ana o 3. In order to protect the allergic consumers, the European Union has established policies that require the mandatory labeling of nuts (eg. cashew) along with other 13 groups of allergenic foods. To verify labeling compliance, to help the industrial management of food allergens and to ensure consumer's safety, the development of proper and highly sensitive analytical methodologies has attained special emphasis.

The objective of this study was the development of analytical methodologies based on polymerase chain reaction (PCR) for the detection/quantification of cashew allergens. For this purpose, model mixtures of pasta or wheat flour containing known amounts of cashew (50 to 0.0001%, $n=13$) and blind samples (8 to 0.25%, $n=4$) were prepared, in order to evaluate matrix effect. Similarly, model mixtures of batter and cookies containing known quantities of cashew (10 to 0.0001%, $n=11$) and respective validation samples (8 to 0.20%, $n = 4$) were also prepared to evaluate matrix and processing effects. Extraction of DNA was performed using the commercial NucleoSpin food kit. For PCR assays, primers were designed, targeting three genes encoding cashew allergens (Ana o 1, Ana o 2 and Ana o 3). Primers specificity was in silico and experimentally assessed using bioinformatic tools and qualitative PCR, respectively.

Qualitative PCR were developed and optimized, allowing detecting cashew down to the level of 10 pg or 1 pg of DNA for systems Ana o 1 or Ana o 2/Ana o 3, respectively. Real-time PCR systems with hydrolysis probes were successfully proposed targeting the genes Ana o 2 and Ana o 3, with absolute sensitivity of 1 pg. In terms of relative detection, the proposed systems presented different sensitivities, ranging from 50 to 500 mg/kg according to the type of matrix and to the degree of processing. The normalized real-time PCR system targeting Ana o 3 gene seems to present the best sensitivity for the model mixtures of raw and processed cashew cookies (50 mg/kg), suggesting that it could be successfully used for the detection of cashew in complex food matrices. In summary, this work allowed proposing adequate tools for the detection and quantification of cashew as allergen in processed foods.

Keywords: *Anacardium occidentale*, allergens, detection, qualitative PCR, real time PCR, processed products.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS-----	iii
RESUMO-----	v
ABSTRACT -----	vi
ÍNDICE-----	vii
ÍNDICE DE FIGURAS-----	ix
ÍNDICE DE TABELAS-----	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS-----	xvi
COMPONENTE TEÓRICA-----	1
INTRODUÇÃO-----	3
Alergia alimentar -----	5
Epidemiologia da alergia ao caju-----	6
Doses mínimas de elicitación da resposta imunitária ao caju -----	8
Caracterização dos alérgenos -----	8
Ana o 1 e Ana o 2-----	9
Ana o 3 -----	12
Efeito do processamento sobre a alergenidade do caju -----	13
Gestão e rastreabilidade do caju-----	14
Metodologias proteicas-----	15
Metodologias baseadas na análise de ADN -----	21
OBJECTIVO E ÂMBITO DO TRABALHO-----	29
COMPONENTE EXPERIMENTAL-----	31
METODOLOGIA-----	33
Preparação das misturas modelo-----	33
Preparação de misturas modelo reais -----	34
Amostras para avaliação da reatividade cruzada -----	36
Extração do ADN-----	37
Método NucleoSpin Food-----	37
Método NucleoSpin Plant-----	38
Amplificação por PCR-----	38
Escolha e desenho dos primers-----	38
PCR qualitativa-----	40
PCR em tempo real -----	41

RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	45
Avaliação da qualidade dos extratos de ADN -----	45
Pureza e rendimento dos extratos -----	45
Avaliação da integridade ADN -----	49
Capacidade de amplificação-----	49
Detecção de caju por PCR qualitativa -----	51
Ana o 1 -----	52
Ana o 2-----	56
Ana o 3-----	61
Detecção de caju por PCR em tempo real-----	66
Sistema com corante EvaGreen -----	67
Sistema com sondas TaqMan™ -----	75
Aplicação dos modelos de quantificação propostos a misturas modelo de biscoitos de caju -	87
CONCLUSÃO-----	95
BIBLIOGRAFIA-----	97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Composição nutricional do caju natural cru (Adaptado de USDA, 2016).....	4
Figura 2 - Esquema dos diferentes tipos de ELISA direto, indireto e em sandwich (www.thermofisher.com).	18
Figura 3 - Esquema simplificado de um ciclo de PCR. ds, dupla cadeia (Wilson <i>et al.</i> , 2010).	23
Figura 4 - Esquema simplificado do funcionamento de corantes tipo SYBR Green™ (Rodríguez-Lazaro <i>et al.</i> , 2011).	24
Figura 5 - Mecanismo de ação das sondas TaqMan™ (Rodríguez-Lazaro <i>et al.</i> , 2013).	25
Figura 6 - Mecanismo de ação dos Molecular Beacon™ (García-Cañas <i>et al.</i> , 2004).	25
Figura 7 - Curva de amplificação da PCR em tempo real (Rodríguez-Lazaro <i>et al.</i> , 2013).	26
Figura 8 - Misturas modelo de biscoitos de caju 100,000 -1 mg/kg como misturas de referência. 35	
Figura 9 - Misturas cegas de biscoitos de caju usados para validação.....	35
Figura 10 - Sequência nucleotídica do gene que codifica para o alérgeno Ana o 2 do caju (<i>Anacardium occidentale</i> allergen Ana o 2 mRNA, partial cds) (número de acesso GenBank: AF453947.1). Os <i>primers</i> estão assinalados a negrito e destacados a cinzento e a sonda está destacada a negrito e com sublinhado duplo.	39
Figura 11 - Gel de agarose da eletroforese genómica dos extratos das misturas modelo de caju em massa (PCM) extraídos com (A) e sem (B) RNase. M: marcador Hyperladder I 10 kB (Bioline, Londres, Reino Unido); 1,12: 0%; 2,13: 100%; 3,14: 10%; 4,15: 1%; 5,16: 0,1%; 6,17: 0,05%; 7,18: 0,01%; 8-19: 0,005%; 9,20: 0,001%; 10,21: 0,0005%; 11,22: 0,0001%; B: branco de extração. ...	48
Figura 12 - Gel de agarose da eletroforese genómica dos extratos das misturas modelo caju em farinha de trigo (PCW). M: marcador Hyperladder I 10 kB (Bioline, Londres, Reino Unido); 1-11: 0,0001%-10%; 12: 0%; B: branco de extração.	49
Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com <i>primers</i> EG-F/EG-R para os extratos das misturas modelo de caju em massa (PCM) extraídos com (A) e sem (B) RNase. M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1: 0%; 2: 100%; 3-11: 10%; 1%; 0,1%; 0,01%; 0,005%; 0,001%; 0,0005%; 0,0001%; CN: controlo negativo:	50
Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os <i>primers</i> EG-F/EG-R dos extratos das misturas modelo de biscoitos de caju (BC, linhas 1-16) e não processados (BCM, linhas 18-34). M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1,18: 0%; 2,19: 0,0001%; 3,20: 0,0005%; 4,21: 0,001%; 5,22: 0,005%; 6,23: 0,01%; 7,24: 0,05%; 8,25: 0,1%; 9,26: 0,2%; 10,27: 0,5%; 11,28: 1%; 12,29: 2%; 13,30: 4%; 14,31: 5%; 15,32: 8%; 16,33: 10%; 17,34: 100% caju (controlo positivo); CN: controlo negativo.	50
Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os <i>primers</i> EG-F/EG-R dos extratos das amostras usadas na reatividade cruzada. M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1: Noz macadâmia; 2: Pistácio; 3: Amendoim torrado; 4: Favas fritas; 5: Pinhão; 6: Castanha; 7: Pêssegos; 8: Farinha de trigo; 9: Arroz; 10: Noz; 11: Tremoço; 12: Aveia; 13: Cevada; 14: Centeio; 15: Soja; 16: Castanha do Brasil; 17: Milho; 18: Pevide torrada; 19: Alperce; 20: Colza; 21: Girassol; 22: Amêndoa; 23: Tomate-cereja; 24: Avelã; 25: Massa; 26: Erva-príncipe; 27: Hortelã-pimenta; 28: Malva; 29: Sene; 30: Tília; 31: Passiflora; 32: Cardo Mariano; 33: Manjeriço; 34: Coentros; 35: Hiperiço-do-gerês; CN: controlo negativo; CP: controlo positivo (caju cru).	51

Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Ana1-F/Ana1-R com 3 mM de Mg²⁺ das diluições seriadas do extrato de ADN de caju. M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1-5: 100.000, 10.000, 1.000, 100 e 10 pg de ADN de caju. 52

Figura 17 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR dos extratos das misturas de caju em massa (PCM) com os *primers* Ana1-F/Ana1-R a 65°C usando 2,0 mM e 3,0 mM de Mg²⁺. M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1-7: 100%, 10%; 1%; 0,1%; 0,01%; 0,001%; 0,0001%; 8: 0%; CN: controlo negativo. 52

Figura 18 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Ana1-F/Ana1-R dos extratos das amostras de reatividade cruzada. M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1: Noz macadâmia; 2: Pistácio; 3: Amendoim torrado; 4: Favas fritas; 5: Pinhão; 6: Castanha; 7: Pêssego; 8: Farinha de trigo; 9: Arroz; 10: Ameixa preta; 11: Noz; 12: Tremoço; 13: Aveia; 14: Cevada; 15: Centeio; 16: Soja; 17: Castanha do Brasil; 18: Milho; 19: Pevide torrada; 20: Alperce; 21: Colza; 22: Girassol; 23: Amêndoa; 24: Tomate cereja; 25: Avelã; 26: Massa; 27: Erva-príncipe; 28: Hortelã-pimenta; 29: Malva; 30: Sene; 31: Tília; 32: Passiflora; 33: Cardo Mariano; 34: Manjerição; 35: Coentros; 36: Hipericão-do-gerês; CN: controlo positivo (caju cru); CN: controlo negativo. 53

Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Ana1-F/Ana1-R dos extratos das amostras de reatividade cruzada. 1: Noz pecan; 2: Farinha maizena; 3: Pão ralado; 4: Farinha de arroz; 5: Farinha de milho; M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); CP: controlo positivo (caju cru); CN: controlo negativo. 54

Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Ana1-F/Ana1-R das diluições seriadas do extrato de ADN de caju. M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1-7: 100.000, 10.000, 1.000, 100, 10, 1 e 0,1 pg de ADN de caju; CN: controlo negativo. 54

Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Ana1-F/Ana1-R dos extratos das misturas modelo de caju em massa (PCM) extraídos com (A) e sem (B) RNase (diluídos a 50 ng/μL). M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1: 0%; 2-10: 10%; 1%; 0,1%; 0,05%; 0,01%; 0,005%; 0,001%; 0,0005%; 0,0001%; CP: controlo positivo; CN: controlo negativo. 55

Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Ana1-F/Ana1-R das misturas modelo de caju em massa (PCM) extraídos com (A, B) e sem (C, D) RNase com diluição de 20 ng/μL (A, C) e 100 ng/μL (B, D). M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1: 0%; 2-10: 10%; 1%; 0,1%; 0,05%; 0,01%; 0,005%; 0,001%; 0,0005%; 0,0001%; CN: controlo negativo. 55

Figura 23 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Ana2-F/Ana2-R a diferentes temperaturas com 2,0 mM de Mg²⁺ dos extratos das misturas modelo de caju em massa (PCM) (diluídos a 50 ng/μL). M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1-5: 10%; 1%; 0,1%; 0,01%; 0,001%; CN: controlo negativo. 56

Figura 24 - Gel de agarose da eletroforese dos produtos de PCR usando os *primers* Ana2-F/Ana2-R a 62°C com 2,0 mM e 3,0 mM de Mg²⁺ dos extratos das misturas modelo de caju em massa (PCM) (diluídos a 50 ng/μL). M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1-6: 10%; 1%; 0,1%; 0,01%; 0,001%; 0,0001%; 7: 0%; CN: controlo negativo. 57

Figura 25 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Ana2-F/Ana2-R dos extratos das amostras de reatividade cruzada. M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1: Noz macadâmia; 2: Pistácio; 3: Amendoim torrado; 4: Favas fritas; 5: Pinhão; 6: Castanha; 7: Pêssego; 8: Farinha de trigo; 9: Arroz; 10: Ameixa preta; 11: Noz; 12: Tremoço; 13: Aveia; 14: Cevada; 15: Centeio; 16: Soja; 17: Castanha do Brasil; 18: Milho; 19: Pevide torrada; 20: Alperce; 21: Colza; 22: Girassol; 23: Amêndoa; 24: Tomate cereja; 25: Avelã;

26: Massa; 27: Erva-príncipe; 28: Hortelã-pimenta; 29: Malva; 30: Sene; 31: Tília; 32: Passiflora; 33: Cardo Mariano; 34: Manjerição; 35: Coentros; 36: Hiperício-do-gerês; CP: controlo positivo (caju cru); CN: controlo negativo.....	57
Figura 26 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os <i>primers</i> Ana2-F/Ana2-R dos extratos das amostras de reatividade cruzada. M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1: Pistácio; 2: Pinhão; 3: Pêssegos; 4: Farinha de trigo; 5: Tomate cereja; 6: Castanha do Brasil; 7: Farinha maizena; 8: Pão ralado; 9: Massa; 10: Farinha de arroz; 11: Farinha de milho; CP: controlo positivo (caju cru); CN: controlo negativo.	58
Figura 27 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os <i>primers</i> Ana2-F/Ana2-R das diluições seriadas do extrato de ADN de caju. M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1-7: 100.000, 10.000, 1.000, 100, 10, 1 e 0,1 pg de ADN de caju; CN: controlo negativo.	59
Figura 28 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os <i>primers</i> Ana2-F/Ana2-R dos extratos das misturas modelo de caju em massa (PCM) extraídos com (A) e sem (B) RNase (diluídos a 50 ng/μL). M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1: 0%; 2-10: 10%; 1%; 0,1%; 0,05%; 0,01%; 0,005%; 0,001%; 0,0005%; 0,0001%; CP: controlo positivo; CN: controlo negativo.....	59
Figura 29 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os <i>primers</i> Ana2-F/Ana2-R das misturas modelo de caju em massa (PCM) extraídos com (A, B) e sem (C,D) RNase com diluição de 20 ng/μL (A,C) e 100 ng/μL (B,D). M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1: 0%; 2-10: 10%; 1%; 0,1%; 0,05%; 0,01%; 0,005%; 0,001%; 0,0005%; 0,0001%; CN: controlo negativo.	60
Figura 30 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os <i>primers</i> Ana2-F/Ana2-R das misturas modelo de caju em farinha de trigo (PCW) (diluídos a 50 ng/μL). M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1: 0%; 2-12: 0,0001%; 0,0005%; 0,001%; 0,005%; 0,01%; 0,05%; 0,1%; 0,5%; 1%; 5%; 10% CN: Controlo Negativo	60
Figura 31 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os <i>primers</i> Ana2-F/Ana2-R dos extratos das misturas modelo de massa (A) e respetivos biscoitos de caju (B). M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1-10: 10%; 5%; 1%; 0,5%; 0,1%; 0,05%; 0,01%; 0,005%; 0,001%; 0,0005%; 0,0001%; 11: 0%; CN: controlo negativo.....	61
Figura 32 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os <i>primers</i> Ana3-F/Ana3-R a diferentes temperaturas de hibridação (60, 62 e 64°C) com 2,0 mM de Mg ²⁺ dos extratos das misturas modelo de caju em massa (PCM) (diluídos a 50 ng/μL). M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1-6: 10%; 1%; 0,1%; 0,01%; 0,001%; 0,0001%; 7: 0%; CN: controlo negativo.	62
Figura 33 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os <i>primers</i> Ana3-F/Ana3-R a 64°C com 3,0 mM de Mg ²⁺ dos extratos das misturas modelo de caju em massa (PCM) (diluídos a 50 ng/μL). M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1-8: 10%; 1%; 0,1%; 0,01%; 0,005%; 0,001%; 0,0005%; 0,0001%; 9: 0%; CN: controlo negativo.	62
Figura 34 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os <i>primers</i> Ana3-F/Ana3-R dos extratos das amostras de reatividade cruzada. M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1: Noz macadâmia; 2: Pistácio; 3: Amendoim torrado; 4: Favas fritas; 5: Pinhão; 6: Castanha; 7: Pêssego; 8: Farinha de trigo; 9: Arroz; 10: Ameixa preta; 11: Noz; 12: Tremçoço; 13: Aveia; 14: Cevada; 15: Centeio; 16: Soja; 17: Castanha do Brasil; 18: Milho; 19: Pevide torrada; 20: Alperce; 21: Colza; 22: Girassol; 23: Amêndoa; 24: Tomate cereja; 25: Avelã; 26: Massa; 27: Erva-príncipe; 28: Hortelã-pimenta; 29: Malva; 30: Sene; 31: Tília; 32: Passiflora; 33: Cardo Mariano; 34: Manjerição; 35: Coentros; 36: Hiperício do Gerês; CN: controlo positivo (caju cru); CN: controlo negativo.....	63

- Figura 35** - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Ana3-F/Ana3-R dos extratos das amostras de reatividade cruzada. M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1: Noz pecan; 2: Maizena; 3: Pão ralado; 4: Farinha de arroz; 5: Farinha de milho; CP: controlo positivo (caju cru); CN: controlo negativo. 63
- Figura 36** – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Ana3-F/Ana3-R das diluições seriadas do extrato de ADN de caju. M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1-6: 100.000, 10.000, 1.000, 100, 10, e 1 pg de ADN de caju; CN: Controlo Negativo. 64
- Figura 37** – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Ana3-F/Ana3-R dos extratos das misturas modelo de caju em massa (PCM) extraídos com (A) e sem (B) RNase (diluídos a 50 ng/μL). M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1: 0%; 2-10: 10%; 1%; 0,1%; 0,05%; 0,01%; 0,005%; 0,001%; 0,0005%; 0,0001%; CP: controlo positivo; CN: controlo negativo. 64
- Figura 38** – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Ana3-F/Ana3-R das misturas modelo de caju em massa (PCM) extraídos com (A, B) e sem (C,D) RNase com diluição de 20 ng/μL (A,C) e 100 ng/μL (B,D). M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1: 0%; 2-10: 10%; 1%; 0,1%; 0,05%; 0,01%; 0,005%; 0,001%; 0,0005%; 0,0001%; CN: controlo negativo. 65
- Figura 39** - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Ana3-F/Ana3-R das misturas modelo de caju em farinha de trigo (PCW). M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1: 0%; 2-12: 0,0001%; 0,0005%; 0,001%; 0,005%; 0,01%; 0,05%; 0,1%; 0,5%; 1%; 5%; 10% CN: controlo negativo. 65
- Figura 40** - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Ana3-F/Ana3-R das misturas modelo de massa (A) e respetivos biscoitos de caju (B). M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1-10: 10%; 5%; 1%; 0,5%; 0,1%; 0,05%; 0,01%; 0,005%; 0,001%; 0,0005%; 0,0001%; 11: 0%; CN: Controlo Negativo..... 66
- Figura 41** – Curvas de amplificação (A), respetiva curva de calibração (B) e curvas de *melting* (C) obtidas por PCR em tempo real da diluição seriada do extrato de ADN de caju com os *primers* Ana1-F/Ana1-R..... 68
- Figura 42** – Curvas de amplificação (A), respetiva curva de calibração (B) e curvas de *melting* (C) obtidas por PCR em tempo real dos extratos das misturas modelo de caju em massa (PCM) extraídos com RNase (diluídos a 50 ng/μL) com os *primers* Ana1-F/Ana1-R..... 69
- Figura 43** – Curvas de amplificação (A), respetiva curva de calibração (B) e curvas de *melting* (C) obtidas por PCR em tempo real da diluição seriada do extrato de ADN de caju com os *primers* Ana2-F/Ana2-R..... 71
- Figura 44** – Curvas de amplificação (A), respetiva curva de calibração (B) e curvas de *melting* (C) obtidas por PCR em tempo real dos extratos das misturas moledo de caju em massa (PCM) (extraídas com RNase) com os *primers* Ana2-F/Ana2-R. 72
- Figura 45** - Curvas de amplificação (A), respetiva curva de calibração (B) e curvas de *melting* (C) obtidas por PCR em tempo real das diluições seriadas do extrato 100% de caju para determinação do limite de deteção absoluto..... 74
- Figura 46** - Curvas de amplificação (A), respetiva curva de calibração (B) e curvas de *melting* (C) obtidas por PCR em tempo real dos extratos das misturas modelo de caju em massa (PCM) extraídos com RNase, para determinação do limite de deteção relativo. 75
- Figura 47** – Curvas de amplificação (A) e respetiva curva de calibração (B) obtidas por PCR em tempo real com os *primers* Ana 2-F/Ana2-R e sonda Ana2-P utilizando as diluições seriadas de ADN de caju ($n=4$ réplicas). 1-6: 100.000 pg; 10.000 pg; 1.000 pg; 100 pg; 10pg e 1 pg de ADN. 77

Figura 48 – Curvas de amplificação (A) e respetiva curva de calibração (B) obtidas por PCR em tempo real com os primers Ana 2-F/Ana2-R e sonda Ana2-P utilizando as misturas de referência PCM a 50 ng/μL de ADN (<i>n</i> =4 réplicas).....	78
Figura 49 – Curvas de amplificação (A) e respetiva curva de calibração (B) obtidas por PCR em tempo real com os primers Ana 2-F/Ana2-R e sonda Ana2-P utilizando os extratos a 50 ng/μL de ADN das misturas modelo de caju em farinha de trigo (PCW) (<i>n</i> =4 réplicas).....	79
Figura 50 – Curvas de amplificação (A) e respetiva curva de calibração normalizada (B) obtida por PCR em tempo real com os primers Ana 2-F/Ana2-R e sonda Ana2-P utilizando os extratos a 50 ng/μL de ADN das misturas modelo de caju em farinha (PCW), para determinação do limite de deteção relativo.	80
Figura 51 – Curvas de amplificação (A) e respetiva curva de calibração (B) obtidas por PCR em tempo real com os primers Ana 3-F/Ana3-R e sonda Ana3-P utilizando as diluições seriadas de ADN de caju (<i>n</i> =4 réplicas). 1-6: 100.000 pg; 10.000 pg; 1.000 pg; 100 pg; 10pg e 1 pg de ADN.	82
Figura 52 – Curvas de amplificação (A) e respetiva curva de calibração (B) obtidas por PCR em tempo real com os primers Ana 3-F/Ana3-R e sonda Ana3-P utilizando os extratos das misturas modelo de caju em massa (PCM) a 50 ng/μL (<i>n</i> =4 réplicas).....	83
Figura 53 - Curvas de amplificação (A) e respetiva curva de calibração (B) obtidas por PCR em tempo real com os primers Ana3-F/Ana3-R e sonda Ana3-P utilizando os extratos a 50 ng/μL de ADN das misturas modelo de caju em farinha (PCW) (<i>n</i> =4 réplicas).....	84
Figura 54 – Curvas de amplificação (A) e respetivas curvas de calibração não normalizada (B) e normalizada (C) obtidas a partir dos ensaios de PCR em tempo real com os primers Ana3-F/Ana3-R e sonda Ana3-P com os extratos a 50 ng/μL de ADN das misturas modelo de caju em farinha de trigo (PCW), para normalização do sistema.	85
Figura 55 - Curvas de amplificação (A) e respetiva curva de calibração não normalizada (B) obtidas por PCR em tempo real com os primers Ana2-F/Ana2-R e sonda Ana2-P utilizando os extratos das massas para biscoitos de caju (BCM) 50 ng/μL (<i>n</i> =4 réplicas).....	88
Figura 56 - Curvas de amplificação (A) e respetiva curva de calibração não normalizada (B) obtidas por PCR em tempo real com os primers Ana2-F/Ana2-R e sonda Ana2-P utilizando os extratos dos biscoitos de caju (BC) 50 ng/μL (<i>n</i> =4 réplicas).	89
Figura 57 – Comparação das curvas de calibração normalizadas obtidas por PCR em tempo real utilizando os extratos das massas (BCM) e respetivos biscoitos (BC).....	90
Figura 58 – Curvas de amplificação (A) e respetiva curva de calibração não normalizada (B) obtidas por PCR em tempo real com os primers Ana3-F/Ana3-R e sonda Ana3-P utilizando os extratos a 50 ng/μL das massas para biscoitos de caju (BCM) (<i>n</i> =4 réplicas).....	91
Figura 59 – Curvas de amplificação (A) e respetiva curva de calibração não normalizada (B) obtidas por PCR em tempo real com os primers Ana3-F/Ana3-R e sonda Ana3-P utilizando os extratos a 50 ng/μL dos biscoitos modelo de caju (BC) (<i>n</i> =4 réplicas).	92
Figura 60 – Comparação das curvas de calibração normalizadas obtidas por PCR em tempo real utilizando os extratos das misturas modelo de massas e respetivos biscoitos de caju.	93

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Identificação dos alergénios do caju segundo a sua classificação bioquímica, função biológica, relevância clínica e respetivos números de acesso.	11
Tabela 2 - <i>Kits</i> de métodos proteicos e de ADN disponíveis comercialmente para deteção/quantificação de caju em alimentos.....	17
Tabela 3 - Técnicas proteicas (ELISA, LC-MS e imunossensores) para a deteção de caju em alimentos	19
Tabela 4 - Técnicas de ADN (PCR em tempo real, LPA, <i>microarrays</i>) para a deteção de caju em alimentos.....	28
Tabela 5 - Misturas binárias de caju em massa utilizadas como materiais de referência.	33
Tabela 6 - Misturas binárias padrão de caju em farinha de trigo utilizadas como materiais de referência.....	34
Tabela 7 - Misturas modelo de biscoitos de caju utilizadas como misturas de referência.	36
Tabela 8 - Descrição das amostras usadas para teste de reatividade cruzada.....	36
Tabela 9 – <i>Primers</i> e sondas de hidrólise usadas neste estudo.	40
Tabela 10 - Componentes das misturas de PCR qualitativa usados com os diferentes pares de <i>primers</i>	40
Tabela 11 - Condições de temperaturas utilizadas nas amplificações por PCR qualitativa com os diferentes pares de <i>primers</i>	41
Tabela 12 - Componentes das misturas de PCR em tempo real com EvaGreen, com os <i>primers</i> Ana 1-F/R e Ana 2-F/R.....	42
Tabela 13 - Condições de temperaturas utilizadas nas amplificações por PCR em tempo real com EvaGreen com os diferentes pares de <i>primers</i>	42
Tabela 14 - Componentes das misturas de PCR em tempo real com sondas específicas utilizando os <i>primers</i> Ana2-F/Ana2-R, Ana3-F/Ana3-R e EG-F/EG-R.	43
Tabela 15 - Condições utilizadas nas amplificações por PCR em tempo real com sondas específicas utilizando diferentes <i>primers</i>	43
Tabela 16 - Concentrações de ADN e respetivas purezas dos extratos das misturas modelo de caju em massa (PCM) com uso de RNase.....	45
Tabela 17 Concentrações de ADN e respetivas purezas dos extratos de caju cru e das misturas modelo de caju em massa (PCM) obtidos com e sem o uso de RNase.....	46
Tabela 18 - Concentrações de ADN e respetivas purezas dos extratos das misturas modelo de caju em farinha de trigo (PCW) obtidos sem o uso de RNase.....	46
Tabela 19 – Concentração de ADN e respetivas purezas dos extratos das massas modelo para biscoitos de caju (BCM) e respetivos biscoitos (BC).....	47
Tabela 20 - Concentração de ADN e respetivas purezas dos extratos das amostras utilizadas na avaliação da especificidade dos <i>primers</i> (reatividade cruzada).	48

Tabela 21 - Resultados normalizados obtidos por PCR em tempo real com os <i>primers</i> Ana 2-F/Ana2-R e sonda Ana2-P (amplificação específica) e os <i>primers</i> EG-F/EG-R e sonda EG-P (gene endógeno universal) para as misturas de caju em farinha de trigo (PCW)	80
Tabela 22 - Estimativa das percentagens de caju adicionadas em amostras cegas de caju em farinha de trigo a partir das PCR com os <i>primers</i> Ana2-F/Ana2-R e sonda Ana3-P. .	81
Tabela 23 - Resultados normalizados obtidos por PCR em tempo real com os <i>primers</i> Ana 3-F/Ana3-R e sonda Ana3-P (amplificação específica) e os <i>primers</i> EG-F/EG-R e sonda EG-P (gene endógeno universal) para as misturas de caju em farinha de trigo (PCW)	86
Tabela 24 – Estimativa das percentagens de caju adicionadas em amostras cegas de caju em farinha de trigo a partir das PCR com os <i>primers</i> Ana3-F/Ana3-R e sonda Ana3-P.	86
Tabela 25 - Resultados normalizados obtidos por PCR em tempo real com os <i>primers</i> Ana2-F/Ana2-R e sonda Ana2-P (amplificação específica) e os <i>primers</i> EG-F/EG-R e sonda EG-P (gene endógeno universal) para as misturas modelo de massa e biscoitos de caju.	89
Tabela 26 - Estimativa das percentagens de caju adicionadas em amostras cegas de massas de biscoitos de caju a partir das PCR com os <i>primers</i> Ana2-F/Ana2-R e sonda Ana2-P.	90
Tabela 27 – Estimativa das percentagens de caju adicionadas em amostras cegas de biscoitos de caju processados a partir das PCR com os <i>primers</i> Ana2-F/Ana2-R e sonda Ana2-P.	91
Tabela 28 – Resultados normalizados obtidos por PCR em tempo real com os <i>primers</i> Ana3-F/Ana3-R e sonda Ana3-P (amplificação específica) e os <i>primers</i> EG-F/EG-R e sonda EG-P (gene endógeno universal) para as misturas modelo de massas e respetivos biscoitos de caju.....	93
Tabela 29 - Estimativa das percentagens de caju adicionadas em massas cegas para biscoitos de caju a partir das PCR com os <i>primers</i> Ana3-F/Ana3-R e sonda Ana3-P.....	94
Tabela 30 - Estimativa das percentagens de caju adicionadas em biscoitos de caju cegos a partir das PCR com os <i>primers</i> Ana3-F/Ana3-R e sonda Ana3-P.	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

ADN: Ácido desoxirribonucléico

ARN: Ácido ribonucleico

BC/M: Biscoitos de caju processados/crus

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

Cq: *Cycle Threshold*

CV: Coeficiente de variação

Da: Unidade de medida de massa atômica Dalton

DBPCFC: Prova de provocação oral duplamente cega controlada com placebo

dNTP: Desoxirribonucleótido trifosfato

DP: Desvio padrão

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ESI-MS/MS: Espectrometria de massa com ionização por *eletrospray*

FAO: *Food Agriculture Organization*

IgE: Imunoglobulina E

IUIS: *International Union of the Immunology Societies* (União Internacional das Sociedades de Imunologia)

LC: Cromatografia líquida

LD: Limite de detecção

LPA: *Ligation-dependent probe amplification*

LQ: Limite de quantificação

mAb: Anticorpo monoclonal

MALDI-TOF-MS: Espectrometria de massa em tempo de voo por ionização e dessorção a laser assistida por matriz

mM: Unidade de medida de quantidade mili-molar

MRM: Monitorização de reações múltiplas

MS: Espectrometria de massa

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

OFC: Prova de provocação oral aberta

OMS: Organização Mundial de Saúde

pAb: Anticorpo policlonal

pb: Par de base

PCM: Padrão de caju em massa

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia de Polimerase)

PCW: Padrão de caju em farinha de trigo

SRM: Monitorização de reação selecionada

Tm: Temperatura de desnaturação

UNIPROT: *Universal Protein Resource*

WHO: *World Health Organization*

COMPONENTE TEÓRICA

INTRODUÇÃO

O caju (*Anacardium occidentale* L.) pertence à família taxonômica Anacardiaceae, que compreende onze espécies do gênero *Anacardium*. No entanto, apenas oito são espécies distintas, uma vez que três delas são sinónimos. Uma destas é *A. occidentale* L., que também é conhecida como *A. microcarpum* Ducke, estando catalogada como duas espécies distintas (GRIN-USDA, 2010). O caju é um fruto originário de países da América do Sul, nomeadamente Brasil e Venezuela, mas atualmente é cultivado em vários países de África, Ásia e América do Sul. Em 2013, o seu principal produtor foi o Vietnam, assegurando 25% da produção total de caju (FAOSTAT, 2016). *A. occidentale* é a espécie mais relevante em termos económicos, tendo grande importância para a alimentação humana. O caju é composto por duas partes: o fruto e a castanha, sendo amplamente utilizado pela indústria alimentar na formulação de vários produtos processados (bolos, chocolates, bebidas). Adicionalmente, o caju tem outras aplicações nomeadamente nas indústrias de tintas e revestimentos ou na produção de biocombustíveis (Eddy *et al.*, 2011).

O caju faz parte dos frutos de casca rijá, aos quais são atribuídos potenciais efeitos benéficos para a saúde, tais como redução do colesterol absorvido, melhoramento do perfil lipídico e prevenção de doenças cardiovasculares (Ros, 2010). O caju tem sido utilizado na medicina tradicional para o tratamento de asma, diabetes tipo 2, infeções cutâneas e inflamações (Shahidi *et al.*, 2008). Os benefícios para a saúde atribuídos ao consumo de frutos de casca rijá têm sido correlacionados com a sua composição rica em ácidos gordos insaturados (metade do teor em lípidos), ácido fólico, fitosteróis (158 mg no caju), tocoferóis e compostos fenólicos com atividade antioxidante (Ros, 2010). A presença dos ácidos anacárdicos que são prejudiciais para as bactérias confere-lhe a sua ação antibacteriana (Shahidi *et al.*, 2008). Relativamente à composição nutricional, dos 43,8 g de lípidos, que podem ser ligeiramente diferentes dependendo de fatores sazonais (Eddy *et al.*, 2011), 7,8 g advêm de ácidos gordos polinsaturados (principalmente ácido linoleico) (Ros, 2010) e 23,7 g são monoinsaturados, o que representa mais de 70% do conteúdo total em lípidos. Contém 30,2 g de carboidratos, dos quais 5,9 g são açúcares, 18,2 g proteínas, 3,3 g fibras e 1,6 g minerais (potássio, fósforo e magnésio) (USDA, 2016). O caju tem um teor em vitaminas totais de 10 mg, sendo as principais a niacina e o α -tocoferol. A figura 1 ilustra a distribuição desses componentes na castanha de caju crua.

Composição nutricional do caju cru (100g)

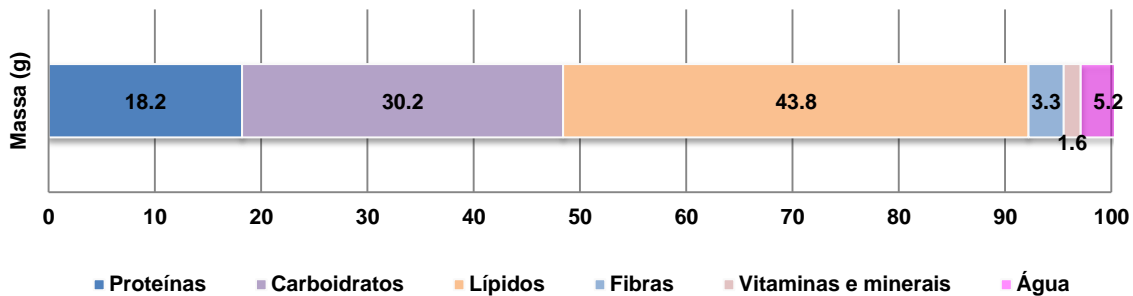


Figura 1 - Composição nutricional do caju natural cru (Adaptado de USDA, 2016).

Sendo considerados alimentos de elevado valor nutricional, com propriedades benéficas para a saúde e por serem positivamente relacionados com hábitos de alimentação saudável (Organização Mundial de Saúde - OMS), o consumo mundial de frutos de casca rija praticamente duplicou nos últimos 20 anos (FAOSTAT, 2016). No entanto, o caju e outros frutos de casca rija representam um risco concreto para saúde de uma pequena, mas significativa parte da população mundial, nomeadamente os indivíduos sensibilizados/alérgicos.

Considerando que as alergias alimentares representam um importante problema de saúde pública, várias medidas legais têm sido estabelecidas para proteger a vida desses indivíduos. Em 1985, a Comissão do *Codex Alimentarius* emitiu uma recomendação para a rotulagem obrigatória dos alimentos pré-embalados suscetíveis de conterem ingredientes potencialmente alergénicos, definindo uma lista de 8 grupos de alimentos alergénicos prioritários (frutos de casca rija, amendoim, cereais contendo glúten, soja, peixe, ovos, leite, crustáceos) (CODEX-STAN-1, 1985). Na União Europeia (UE), a primeira lista prioritária foi emitida pela Diretiva 2003/89/CE (Directive 2003/89/EC) acrescentando sésamo, aipo e mostarda à lista anterior (CODEX STAN 1, 1985), totalizando 12 grupos de alimentos alergénicos com rotulagem obrigatória em alimentos processados. Desde então, a UE aumentou a lista de alimentos alergénicos prioritários para 14 grupos (adicionando os moluscos e o tremço), estabelecendo que estes devem estar realçados do resto dos ingredientes enumerados em alimentos processados, independentemente da sua quantidade (Directive 2007/68/EC; Regulation (EU) 1169/2011). Dado que os frutos de casca rija são considerados um dos 8 grupos de alimentos responsáveis por cerca 90% das reações alérgicas reportadas, estes estão incluídos na lista de alimentos alergénicos com a rotulagem obrigatória na maioria dos países/regiões (ex. EUA; Canadá, União Europeia), com exceção do Japão e da Coreia (Gendel, 2012).

Alergia alimentar

Segundo as diretrizes mais recentes, a alergia alimentar define-se como um efeito adverso na saúde decorrente de uma resposta imunológica específica, que ocorre de forma reprodutível, após a exposição a um determinado alimento (Boyce *et al.*, 2010). Cada alimento é composto por um conjunto complexo de proteínas, podendo-se comportar de maneira diferente quanto ao seu potencial para sensibilizar e interagir com o sistema imunológico de cada indivíduo (Sicherer *et al.*, 2010). Em teoria, qualquer alimento é suscetível de desencadear reações alérgicas em indivíduos sensibilizados/alérgicos, embora quase 90% das alergias relatadas sejam induzidas por alimentos pertencentes a oito grupos (leite, ovos, peixe, crustáceos, soja, amendoim, frutos de casca rija e cereais contendo glúten) (Boyce *et al.*, 2010). Bioquimicamente, os alergénios alimentares são proteínas (geralmente glicoproteínas) solúveis em água e com baixo peso molecular (10-70 kDa), apresentando elevada resistência à temperatura, a pH ácido e à atividade enzimática (protéases) (Sicherer *et al.*, 2010). Como consequência, as reações alérgicas podem ocorrer quando o alimento é ingerido cru, processado ou mesmo digerido (Burks *et al.*, 2012).

As alergias alimentares são tipicamente mediadas pela imunoglobulina E (IgE), embora estas possam também incluir outras respostas imunológicas, nomeadamente as reações não mediadas pela IgE (ex. doença celíaca), mecanismos mistos (IgE e não IgE) (ex. gastroenterite eosinofílica) e reações mediadas por células (ex. dermatite de contato alérgica) (Boyce *et al.*, 2010; Burks *et al.*, 2012). Em conformidade, os órgãos ou sistemas alvo podem ser diferentemente afetados por cada mecanismo imunológico.

A maioria das alergias alimentares são reações mediadas pela IgE cujos sintomas aparecem durante as duas primeiras horas após a ingestão do alimento alergénico. A fisiopatologia destas engloba duas fases, sensibilização e elicitação (Pelz *et al.*, 2015; Vickery *et al.*, 2011). A primeira fase que corresponde à sensibilização alérgica pode ocorrer diretamente através do trato gastrointestinal ou indiretamente via exposições respiratórias e/ou cutâneas. A elicitação ou reação ocorre após reexposição ao alergénio, em consequência da libertação de mediadores, tais como leucotrienos, prostaglandinas e histamina que causam os sintomas clássicos das alergias alimentares (urticária, rinite, angioedema, broncoespasmo, laringoespasmo, anafilaxia) (Burks *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2012; Sicherer *et al.*, 2010; Vickery *et al.*, 2011).

Recentemente, vários fatores internos e ambientais têm sido apontados como riscos potenciais para o desenvolvimento de alergias alimentares. Assim, aspetos genéticos (associações familiares, genes específicos), associação com doenças atópicas (ex. dermatite atópica) e condições pré-existentes (ex. asma), género (masculino/feminino),

tempo e via de exposição ao alergénio (cutânea, respiratória), componentes da dieta (redução do consumo de ácidos gordos polinsaturados e de vitamina D) e as diferenças geográficas nos hábitos alimentares têm sido apontados como fatores de risco crescentes para o desenvolvimento de alergia alimentar (Barg *et al.*, 2011; Lack, 2008; Sicherer, *et al.*, 2014). A severidade de uma reação alérgica é difícil de prever, sendo dependente, não só da fisiologia de cada indivíduo sensibilizado/alérgico, mas também da quantidade de alimentos ingeridos, do tipo e modo de processamento alimentar e das possíveis interações com outros componentes presentes nos alimentos (Boyce *et al.*, 2010). Além disso, fatores tais como a velocidade de absorção de alimentos, a ingestão de alimentos perto do exercício físico e a idade do paciente podem também ter um efeito negativo sobre a gravidade de uma reação alérgica (Burks *et al.*, 2012).

Em termos de apresentação clínica, os sintomas de alergia ao caju são normalmente classificados como graves ou mesmo potencialmente fatais, ocorrendo com manifestações complexas que muitas vezes envolvem mais de um órgão/sistema alvo. Por conseguinte, a maior parte das reações alérgicas ao caju traduzem-se por lesões cutâneas, frequentemente seguidas por sintomas nos tratos respiratório e/ou gastrointestinal (van der Valk *et al.*, 2014). No âmbito das manifestações clínicas, a urticária e o angioedema (manifestações cutâneas), as dores abdominais e os vômitos (sintomas gastrointestinais), a rinite alérgica, o edema da glote e a anafilaxia estão entre os sintomas mais clássicos relacionados com a alergia ao caju (Clark *et al.*, 2007; Davoren *et al.*, 2005; Grigg *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2014; Le *et al.*, 2008; Rance *et al.*, 2003). A anafilaxia é o quadro clínico mais grave e complexo de uma reação alérgica, uma vez que normalmente envolve vários sistemas (cutâneo, respiratório e cardiovascular). A anafilaxia é uma apresentação clínica comum de alergia de caju semelhante ao amendoim e outras alergias aos frutos de casca rija (Davoren *et al.*, 2005) (Grigg *et al.*, 2009; van der Valk *et al.*, 2014).

Epidemiologia da alergia ao caju

A prevalência das alergias alimentares tem sido estimada através de informação recolhida por diferentes indicadores. Dos mais populares, destacam-se os inquéritos e questionários por permitirem a aquisição de uma vasta quantidade de informação de forma simples e rápida. No entanto, os dados recolhidos por estes indicadores devem ser interpretados com especial cuidado, uma vez que os inquiridos frequentemente sobrevalorizam os sintomas associados às suas próprias reações alérgicas. Para a obtenção de dados fidedignos relativos à prevalência das alergias alimentares devem ser utilizados indicadores mais objetivos, nomeadamente os testes de provocação oral (prova

provocação oral aberta - OFC e provas de provocação oral duplamente cega controlada com placebo - DBPCFC), os testes *in vitro* (IgE sérico) e testes *in vivo* (testes cutâneos) (Zuidmeer *et al.*, 2008). Os OFC e os DBPCFC são considerados o “*gold standard*” dos indicadores para o diagnóstico das alergias alimentares, embora estes sejam mais difíceis de realizar, uma vez que são dependentes da colaboração dos pacientes.

Até agora, existem vários estudos com dados de prevalência sobre alergias a frutos de casca rija como grupo de alimentos, mas apenas alguns reportam dados individuais relativos aos diferentes frutos de casca rija (ex. caju). Além disso, a maioria dos estudos envolve pequenas regiões geográficas (ex. cidade, país), o que condiciona a determinação da prevalência real da alergia ao caju ou a outras alergias alimentares. Em relação ao caju, alguns dados epidemiológicos estão disponíveis para alguns países da Europa, EUA e Austrália, no entanto não existem dados sobre esta alergia em economias emergentes (Ásia ou África).

À semelhança de outros frutos de casca rija, a prevalência da alergia ao caju varia de região para região, apresentando a sua maior frequência nos EUA (McWilliam, *et al.*, 2015). Com base num estudo envolvendo 5149 participantes com alergias a amendoim e/ou frutos de casca rija foi possível estabelecer uma prevalência de 20% de pacientes alérgicos ao caju nos EUA (Sicherer *et al.*, 2001). Usando indicadores mais objetivos, como o SPT e os testes de provocação oral (DBPCFC) foi possível relatar uma elevada prevalência de alergia ao caju e à noz, ambas com 30%, numa população teste de 101 pacientes com diagnóstico clínico prévio de alergias a frutos de casca rija (Fleischer *et al.*, 2005).

Além dos EUA, a alergia ao caju parece ter vindo a aumentar em prevalência noutras regiões, nomeadamente no Norte da Europa (Johnson *et al.*, 2014; Vetander *et al.*, 2012). Um estudo baseado nos registos clínicos de um hospital em Uppsala (Suécia), compreendendo um período de 10 anos (2001-2010), evidenciou que os amendoins e os frutos de casca rija foram responsáveis por cerca de 50% dos 703 casos de alergia alimentar em crianças (<18 anos), requerendo frequentemente tratamento com adrenalina e consequente hospitalização. Durante o mesmo período, a prevalência da alergia ao caju foi de 6%, com relatos de aumento da frequência (20 vezes) e da gravidade dos episódios causados pela ingestão deste fruto (Johnson *et al.*, 2014). Numa região diferente da Suécia (Estocolmo), dados semelhantes foram recolhidos em 3 hospitais pediátricos durante 2007. Neste período, 15% dos casos de alergias alimentares relatados em crianças foram atribuídos ao consumo de frutos de casca rija, sendo 5% destas induzidas pela ingestão de caju (Vetander *et al.*, 2012). Em Utrecht (Holanda), um estudo de 3 anos envolvendo 139 pacientes alérgicos a frutos de casca rija estimou uma prevalência de 20% para a alergia ao caju (Le *et al.*, 2008). Em França,

foi relatada uma incidência de 10,3% de alergia ao caju tendo por base uma população de teste de 141 pacientes alérgicos, evidenciando que o número de choques anafiláticos por ingestão de caju aumentou de 3% para 9% entre 2003 e 2007, respetivamente (Moneret-Vautrin, 2008).

Dados de um hospital pediátrico na Austrália (Melbourne) evidenciaram prevalências de 18% e 13% de alergias ao amendoim e ao caju, respetivamente, sendo as causas mais comuns de anafilaxia em crianças (de Silva *et al.*, 2008). Numa outra região da Austrália (Brisbane), uma prevalência de 12,6% de alergia de caju foi descrita por Davoren e Peake (2005) usando relatórios clínicos de uma população teste compreendendo 213 crianças (<18 anos) alérgicas ao amendoim e a frutos de casca rija.

Doses mínimas de eliciação da resposta imunitária ao caju

Como parte do diagnóstico de alergia alimentar, os indivíduos com história clínica e/ou resultados positivos nos testes de diagnóstico *in vitro* e *in vivo* são frequentemente desafiados a entrar em testes de provocação oral (Entink *et al.*, 2014). A partir destes ensaios, as doses mínimas de eliciação de uma resposta alérgica observável podem ser definidos em relação aos alimentos alergénicos testados. Ainda que estes valores sejam definidos com carácter individual para cada paciente, esta informação pode ser utilizada para a definição de valores de referência a nível populacional (Crevel, Baumert *et al.*, 2014; Taylor *et al.*, 2014).

Com base em alguns estudos clínicos usando testes de provocação oral, quantidades tão pequenas quanto 2 mg de proteína de caju foram definidas como suficientes para induzir respostas imunológicas adversas com sintomas observáveis em pacientes alérgicos a este fruto (Allen *et al.*, 2014; Taylor *et al.*, 2014). Presentemente, a quantidade de 0,1 mg de proteína foi recomendada como dose mínima de referência para todos os frutos de casca rija (Taylor *et al.*, 2014).

Caracterização dos alergénios

Sob o ponto de vista alergológico e da evolução das proteínas, os alergénios alimentares estão classificados como pertencentes a algumas famílias de proteínas, dependendo das suas estruturas e funções bioquímicas (Radauer *et al.*, 2008). Até ao momento, 65% dos alergénios vegetais identificados estão incluídos em apenas 4 grupos principais de proteínas: as *cupins*, as prolaminas, as proteínas homólogas da Bet v 1 (pólen das betuláceas) e as profilinas (homólogas da Bet v 2) (Jenkins *et al.*, 2005).

Para além desta classificação, os alergénios podem ser agrupados segundo o mecanismo imunológico de sensibilização envolvido, pertencendo à classe I ou classe II. Os alergénios de classe I são em geral termicamente estáveis e apresentam elevada resistência a pH ácido e à atividade enzimática das protéases. Consequentemente, são considerados agentes de sensibilização primários por via gastrointestinal (via direta), sendo responsáveis por reações alérgicas que variam de moderadas a severas (Harrer *et al.*, 2010). As proteínas de reserva da família das *cupins* (ex. vicilinas, leguminas) e das prolaminas (ex. albuminas 2S) são exemplos de alergénios de classe I (Moreno *et al.*, 2008; Moreno, 2007). Os alergénios de classe II são menos estáveis ao calor e às condições gástricas, pelo que não são considerados como agentes sensibilizadores primários. A via de sensibilização destes alergénios é indireta, resultando na produção de IgE por exposição respiratória e/ou cutânea, sendo normalmente responsáveis por manifestações clínicas leves (Harrer *et al.*, 2010). No caso específico do caju, foram identificados e caracterizados três grupos de alergénios pertencentes a duas superfamílias de proteínas, nomeadamente a *Cupin* (Ana o 1 e Ana o 2) e a Prolamina (Ana o 3), estando todos incluídos na lista oficial de alergénios da WHO/IUIS (*World Health Organization/International Union of Immunological Societies*) (ALLERGEN, 2016). No caju, os alergénios identificados são proteínas de reserva (vicilina, legumina e 2S albumina), pelo que são classificados como alergénios de classe I.

Ana o 1 e Ana o 2

Os alergénios Ana o 1 e Ana o 2 pertencem ao grupo das globulinas 7S (vicilina) e 11S (legumina), respetivamente, as quais fazem parte da superfamília das *Cupin*. Nesta superfamília, está incluída uma ampla diversidade de proteínas, muitas delas classificadas como importantes alergénios, que podem ser encontrados em bactérias e eucariotas, incluindo plantas e animais (Radauer *et al.*, 2007). De um modo geral, os membros da superfamília *Cupin* são caracterizados por duas sequências consenso curtas conservadas e por um ou dois domínios centrais sob forma de barril composto por seis folhas beta antiparalelas (origem da sua designação “*cupin*”). As vicilinas e as leguminas são *bicupins* (possuem dois domínios centrais em forma de barril), sendo consideradas as principais proteínas de reserva em vários legumes e frutos de casca rija, incluindo no caju (Harrer *et al.*, 2010)

As vicilinas são estruturas triméricas de peso molecular entre os 150-190 kDa, sendo constituídas por três monómeros de 40 a 80 kDa (Breiteneder *et al.*, 2004). Estas proteínas são compostas por domínios N- e C-terminais, que são estruturalmente estabilizados por interações hidrofóbicas não covalentes, ligações de hidrogénio e

interações de van der Waals. As vicilinas são proteínas glicosiladas, apresentando um ou dois locais de glicosilação no domínio C-terminal, os quais parecem ter um efeito estabilizador na estrutura tridimensional da proteína (Breiteneder *et al.*, 2005). Para além de serem proteínas de reserva, desempenham outras funções biológicas, nomeadamente atividade antifúngica e dadoras de azoto durante a germinação das sementes. As leguminas são proteínas de reserva representando cerca de 50% da fração proteica dos legumes e dos frutos de casca rijas. São proteínas multiméricas existindo sob a forma de uma mistura de trímeros e hexâmeros de 50-60 kDa ligados por interações não covalentes. Cada monómero resulta da expressão de vários genes e é sintetizado inicialmente como um único polipéptido, sofrendo alterações pós-translacionais e levando à formação de dois polipéptidos, um ácido (30 kDa) e um básico (20 kDa), ligados por uma ponte dissulfureto (Mills *et al.*, 2002). Ao contrário das vicilinas, as leguminas são normalmente proteínas não glicosiladas.

Ana o 1 tem duas isoformas (proteínas partilhando mais de 90% de identidade nas suas sequências): Ana o 1.0101 e Ana o 1.0102. São polipéptidos de 538 e 536 aminoácidos (aa) codificados por sequências de mRNA de 1810 e 1660 bases, respetivamente (ALLERGEN, 2016; Chapman *et al.*, 2007) (Tabela 1). Um estudo desenvolvido por Wang *et al.* (Wang, *et al.*, 2002) permitiu determinar um grau de semelhança de 54-59% e identidade de 33-40% entre as sequências de proteínas recombinantes Ana o 1 e de outras vicilinas (óleo de palma, noz macadâmia e noz). No mesmo estudo, os autores avaliaram a imunorreatividade de Ana o 1 com soro de pacientes alérgicos ao caju, verificando ligação positiva à IgE em 50% dos soros testados, o que levou à classificação de alergénio *major* no caju. Alguns estudos sugerem que as isoformas de Ana o 1 possuem três péptidos como potenciais epítomos imunodominantes e três epítomos lineares que podem participar em um ou dois epítomos conformacionais (Guan *et al.*, 2015). Ana o 1 apresenta alguma reatividade cruzada com os alergénios Ana o 2 e Ana o 3 do caju (Reitsma *et al.*, 2016). Ana o 1 apresenta elevada homologia estrutural com as vicilinas beta-conglicina (soja), Jug r 2 (noz) e Cor a 11 (avelã) (Barre *et al.*, 2008). Em termos imunológicos, o Ana o 1 apresenta IgE-reatividade com o Ara h 1 do soro de pacientes alérgicos ao amendoim (Barre *et al.*, 2008).

Clinicamente, pacientes alérgicos ao caju apresentam frequentemente elevada imunorreatividade ao pistácio e vice-versa (pistácio e caju pertencerem à mesma família botânica Anacardiaceae) (Fernandez *et al.*, 1995; Garcia *et al.*, 2000; Hasegawa *et al.*, 2009), o que é confirmado pela elevada homologia entre as proteínas Ana o 1 (caju) e Pis v 3 (pistácio) (Rouge *et al.*, 2011; Willison *et al.*, 2008).

Tabela 1 - Identificação dos alérgenos do caju segundo a sua classificação bioquímica, função biológica, relevância clínica e respectivos números de acesso.

Alergénio	Isoalergénios	Isoformas	PM (kDa)	Comprimento (aa)	Família de proteínas	Classificação bioquímica	Relevância clínica	Nucleótido (NCBI)	Proteína (NCBI)	Proteína (UniProt)
Ana o 1	Ana o 1.01	Ana o 1.0101	61.8	538	<i>Cupin</i>	Vicilina 7S	Alergénio major. Induz sintomas severos e potencialmente fatais, nomeadamente choque anafilático.	AF395894	AAM73730	Q8L5L5
		Ana o 1.0102	61.6	536				AF395893	AAM73729	Q8L5L6
Ana o 2	Ana o 2.01	Ana o 2.0101	52.0	457	<i>Cupin</i>	Legumina 11S	Alergénio major. Induz sintomas severos e potencialmente fatais, nomeadamente choque anafilático.	AF453947	AAN76862	Q8GZP6
Ana o 3	Ana o 3.01	Ana o 3.0101	16.3	138	Prolamina	Albumina 2S	Alergénio major. Induz sintomas severos e potencialmente fatais, nomeadamente choque anafilático.	AY081853	AAL91665	Q8H2B8

O alergénio Ana o 2 apresenta uma isoforma Ana o 2.0101 com 457 aa e um peso molecular de cerca de 55 kDa, sendo codificado por uma sequência de mRNA de 1671 bases (Tabela 1) (ALLERGEN, 2016). Ana o 2 apresenta elevada imunorreatividade (>50% IgE positivos) com soro de pacientes alérgicos ao caju, tendo sido classificado como um alergénio *major* (Teuber *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003). Esta legumina apresenta elevada identidade e semelhança com outras 11S globulinas, nomeadamente com o Cor a 9 (avelã), o Jug r 4 (noz), o Ara h 3 (amendoim), o Ses i 7 (sésamo) e o Gly m 6 (soja) (Robotham *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2003). Ana o 2 apresenta 6 péptidos lineares que são considerados imunodominantes no polipeptídeo ácido, sugerindo que esta região está predominantemente relacionada com a alergenicidade da proteína (Wang, *et al.*, 2003). Os epítomos lineares do Ana o 2 apresentam elevada homologia conformacional com outros péptidos alergénicos (Ara h 3, Cor a 9 e Jug r 4), sugerindo potencial reatividade cruzada entre os diferentes frutos de casca rija (amendoim, avelã e noz) (Barre *et al.*, 2007).

Ana o 3

A superfamília Prolamina é uma família muito relevante de proteínas, na qual está incluído um grande número de alergénios de plantas. Os membros desta superfamília partilham várias características, tais como um perfil conservado de oito resíduos de cisteína, um elevado teor em resíduos de prolina e glutamina, um baixo peso molecular, uma estrutura secundária conservada e rica em hélices alfa, uma elevada estabilidade térmica e resistência à proteólise (Radauer *et al.*, 2007). Ao contrário dos legumes e dos frutos de casca rija, as prolaminas são as principais proteínas de reserva nos cereais (com exceção do arroz e da aveia) e na família das gramíneas (Radauer *et al.*, 2007; Shewry *et al.*, 2002). Da superfamília Prolamina, fazem parte as proteínas albuminas 2S, as proteínas transportadoras de lípidos e os inibidores da alfa-amilase e da tripsina (Breiteneder *et al.*, 2004).

As albuminas 2S são proteínas hidrossolúveis em baixas concentrações de sal, sendo caracterizadas por um elevado teor em arginina, glutamina, asparagina e cisteína (Breiteneder *et al.*, 2000). São moléculas pequenas (12-15 kDa) com estrutura globular compostas por duas subunidades ligadas por duas pontes dissulfureto (Breiteneder *et al.*, 2004; Pantoja-Uceda *et al.*, 2002; Shewry *et al.*, 1995). Possuem ainda duas pontes dissulfureto adicionais que ajudam a estabilizar e compactar a sua estrutura tridimensional. Para além de participarem na germinação das plantas como dadores de enxofre e azoto, estas proteínas também atuam como antifúngicos ou como antagonistas da calmodulina (Terras *et al.*, 1993). As albuminas 2S constituem uma família muito

relevante de proteínas, uma vez que muitas delas estão envolvidas na maioria das alergias alimentares a plantas (Sampson *et al.*, 2014).

A proteína Ana o 3 é uma albumina 2S, apresentando uma isoforma (Ana o 3.0101) com 138 aa e peso molecular de 14 kDa, a qual é codificada por uma sequência de mRNA de 585 bases (Tabela 1) (ALLERGEN, 2016). O alergénio Ana o 3 apresenta uma elevada imunorreatividade (>73%) com o soro de pacientes alérgicos ao caju, sendo classificado como alergénio major (Robotham *et al.*, 2005; Teuber *et al.*, 2002). A sequência do Ana o 3 tem elevado grau de identidade e semelhança com outras albuminas 2S, nomeadamente com o Pis v 1 (pistácio), o Jug n 1 (noz negra), Jug r 1 (noz Inglesa) e Car i 1 (noz pecan), o que sugere potencial reatividade cruzada com estes frutos (Robotham *et al.*, 2005).

Efeito do processamento sobre a alergenicidade do caju

Os alergénios podem sofrer alterações estruturais por desnaturação ou por modificações químicas/enzimáticas com outros componentes da matriz durante o processamento alimentar (Vanga *et al.*, 2015). Devido à natureza diversificada das proteínas alergénicas (ex. albuminas, vicilinas, legumins, profilinas), a sua imunorreatividade está associada com a presença de epítomos conformacionais e/ou lineares (Mills *et al.*, 2008; Mills *et al.*, 2009). Se, por um lado, alguns tratamentos térmicos são conhecidos para reduzir a imunorreatividade das proteínas, tais como profilinas e vicilinas (Mills *et al.*, 2008), os mesmos processos parecem não alterar a imunorreatividade de outras proteínas (ex. albuminas 2S, leguminas) (Mills *et al.*, 2009). Por outro lado, a formação de novos sítios de ligação à IgE como consequência da alteração conformacional do alergénio (desnaturação) ou de modificações enzimáticas/químicas pode aumentar a sua imunorreatividade (Mills *et al.*, 2008; Mills *et al.*, 2009).

No caso específico de caju, há poucos estudos que descrevem os efeitos dos diferentes processamentos alimentares na sua imunorreatividade (de Leon *et al.*, 2003; Su *et al.*, 2004; Venkatachalam *et al.*, 2008). Os alergénios do caju apresentam elevada resistência à maioria dos processamentos térmicos (de Leon *et al.*, 2003), alterações de pH e mesmo irradiação gama (Su *et al.*, 2004; Venkatachalam *et al.*, 2008) normalmente aplicada na indústria alimentar. A imunorreatividade da proteína alergénica Ana o 1 parece ser afetada a pH 13 ou após autoclavagem durante 20 minutos (Venkatachalam *et al.*, 2008), sugerindo alterações na sua estrutura tridimensional. Apesar de Ana o 1 perder integridade estrutural, alguns epítomos lineares continuam imunorreativos preservando a seu potencial de alergenicidade (Venkatachalam *et al.*, 2008). O alergénio Ana o 2 é mais estável do que o Ana o 1, preservando a sua integridade estrutural,

independentemente do tipo de processamento (Venkatachalam *et al.*, 2008). Ana o 3 é estável a pH entre 1-11, mas não é detetável a pH 13 (Venkatachalam *et al.*, 2008). Processamentos térmicos como cozedura, torra e autoclavagem durante 10 minutos parecem reduzir a imunorreatividade do Ana o 3, sugerindo a perda de integridade estrutural com os diferentes tratamentos (Venkatachalam *et al.*, 2008). A combinação de elevadas concentrações de sulfito de sódio (>50 mM) com temperaturas altas (>100°C) também parecem reduzir a imunorreatividade do Ana o 2 e do Ana o 3 (Mattison, Desormeaux *et al.*, 2014). É também importante referir que a torra do caju a 170°C por 20 min levou a um ligeiro aumento na imunorreatividade do caju (Venkatachalam *et al.*, 2008). Desta forma, um mesmo processamento térmico efetuado a diferentes tempos e/ou temperaturas pode aumentar ou reduzir a resposta alérgica dos distintos alergénios do caju.

Os ensaios *in vitro* simulando a digestão *in vivo* têm sido utilizados como ferramentas de previsão para avaliar o potencial alergénico de proteínas de novos alimentos (Untersmayr *et al.*, 2008). Apesar desta abordagem ser aplicada ao estudo de diferentes alimentos alergénicos (leite, ovo, crustáceos), há ainda pouca informação relativa aos alergénios do caju, sendo apenas encontrado um relatório (Mattison, Grimm *et al.*, 2014). Ana o 2 é muito resistente à digestão, permanecendo imunorreativo quando é absorvido. O alergénio Ana o 3 perde alguma capacidade de se ligar às IgE, no entanto como as suas proteínas são apenas parcialmente digeridas, estas continuam imunorreativas quando são absorvidas, facto que é também observado em outras albuminas 2S alergénicas (Mattison, Grimm *et al.*, 2014).

Gestão e rastreabilidade do caju

As alergias alimentares são consideradas um problema emergente de saúde pública com especial impacto na qualidade de vida dos consumidores sensibilizados/alérgicos (Crevel, Beaumert *et al.*, 2014), representando um desafio societal atual. Encarada como uma tarefa multidisciplinar, a gestão das alergias alimentares requer o envolvimento de diferentes intervenientes, nomeadamente as autoridades reguladoras, as indústrias alimentares, médicos e outros técnicos de saúde e os próprios consumidores sensibilizados/alérgicos (Crevel *et al.*, 2008). Atuando a diferentes níveis, todas as entidades partilham o objetivo comum de proteger a saúde dos indivíduos sensibilizados/alérgicos. As entidades reguladoras e indústria alimentar operam a nível populacional, sendo respetivamente responsáveis por garantir a proteção da saúde pública e por fornecer alimentos seguros para todos os consumidores. No entanto, a responsabilidade final recai a nível individual, especificamente sobre os indivíduos

alérgicos, uma vez que são responsáveis por todas as medidas preventivas em relação à total evicção do alimento alergénico (e/ou os alimentos suscetíveis de reatividade cruzada) (Crevel *et al.*, 2008). Portanto, os consumidores alérgicos são totalmente dependentes das informações do rótulo de alimentos processados, ao selecionar cuidadosamente as suas fontes de nutrientes (Luccioli, 2012).

No entanto, a exposição accidental a alergénios ocultos nos alimentos, devido à rotulagem inadequada ou contaminações cruzadas durante o fabrico de alimentos processados (ex. linhas de produção partilhadas) constitui um risco concreto para consumidores alérgicos (Costa *et al.*, 2014; Costa *et al.*, 2015). Para evitar potenciais riscos para a saúde destes consumidores, o desenvolvimento e aplicação de metodologias analíticas adequadas representam excelentes ferramentas para a gestão industrial de alimentos processados contendo ingredientes alergénicos, facilitando a sua subsequente monitorização por parte das entidades reguladoras.

Apesar das opiniões contraditórias sobre qual o melhor analito alvo para a deteção/quantificação de alergénios em alimentos, há atualmente um amplo espectro de métodos analíticos baseado na análise de proteínas e/ou ADN para a maioria dos alimentos alergénicos. Contudo, a falta de métodos oficiais e de materiais de teste/referência disponíveis para a sua deteção/quantificação representa uma grande falha na gestão dos alergénios alimentares (Costa *et al.*, 2014; Costa *et al.*, 2015). A escolha do melhor método a usar para análise de um dado alimento alergénico deverá depender de critérios específicos, tais como o analito alvo (proteínas versus ADN), a base de deteção (química vs biológica), o custo por ensaio/análise, o custo de equipamentos/instalação, a reatividade cruzada, a necessidade de conhecimento especializado e a possibilidade de deteção multialvo (Johnson *et al.*, 2011).

No caso específico do caju, há vários métodos comerciais (Tabela 2) e descritos na literatura (Tabela 3), tanto baseados em proteínas marcadoras de espécie ou alergénicas, assim como, nas respetivas sequências de ADN que codificam as mesmas (proteínas marcadoras/alergénicas).

Metodologias proteicas

Estas técnicas podem ser divididas em dois grupos principais: os métodos imunológicos clássicos, como os imunoensaios (ensaios de imunoabsorção enzimática - ELISA, dispositivos de fluxo lateral – LFD e *immunoblotting*) e os imunossensores que identificam os alergénios por interação destes com anticorpos específicos, e as metodologias cromatográficas com deteção por espetrometria de massa (MS) através de identificação direta de marcadores (péptidos alvo). Até agora, os métodos baseados em imunoensaios

estão entre os mais populares, embora os métodos por MS tenham vindo a conquistar um papel especial na deteção e quantificação de alergénios em alimentos (Johnson *et al.*, 2011).

ELISA e LFD

Os imunoenaios clássicos (ELISA e o LFD) baseiam-se na interação anticorpo-alergénio (ou outra proteína marcadora). Os ELISA são considerados métodos semi-quantitativos ou quantitativos, sendo a técnica analítica mais amplamente utilizada para a análise de rotina e rastreio de alergénios em alimentos (Schubert-Ullrich *et al.*, 2009). Os LFD são versões simplificadas dos ELISA (Schubert-Ullrich *et al.*, 2009; van Hengel 2007), os quais são bastante populares na indústria alimentar, sendo comumente utilizado para verificar possíveis contaminações cruzadas ao longo das linhas de produção ou nas formulações finais (Costa *et al.*, 2014). Presentemente, os ELISA e os LFD podem ser adquiridos comercialmente sob a forma de *kits*, possibilitando a deteção de um grande número de alimentos alergénicos diferentes. A Tabela 2 resume os *kits* de ELISA e de LFD disponíveis para a deteção específica de caju em alimentos. Estes ensaios podem ser aplicados a uma vasta gama de matrizes alimentares com sensibilidades de 1-2 mg/kg ou 0,2-1 mg/kg de caju em alimentos por LFD ou ELISA, respetivamente. No entanto, estes ensaios têm elevada suscetibilidade à reatividade cruzada com proteínas não alvo. No caso dos *kits* comerciais para o caju, verifica-se alguma reatividade cruzada com outras plantas, como a castanha do Brasil, o pistácio, a avelã, o amendoim e a noz (Tabela 2).

Além de *kits* comerciais, existem alguns métodos ELISA reportados para a deteção de caju em matrizes alimentares complexas e processadas, ou seja, especiarias, cereais, chocolates, sorvetes e biscoitos (Tabela 3). Os métodos ELISA existem sob diferentes tipos: ELISA competitivos, indiretos, diretos ou em sandwich, sendo estes últimos os mais vulgarmente utilizados (Figura 2). Os limites de deteção (LD) dos métodos desenvolvidos estão alinhados com os dos *kits* comerciais, os quais variam de 0,1-1,0 mg/kg, dependendo do tipo de matriz alimentar testada (Cho *et al.*, 2015; Gaskin *et al.*, 2009; Gaskin *et al.*, 2011; Rejeb *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2002, 2003).

Os sistemas ELISA podem também ser realizados em abordagem multialvo, combinando anticorpos específicos de diferentes alimentos alergénicos num único ensaio. Este tipo de abordagem foi proposto com sucesso por Rejeb *et al.* (2005) para a deteção simultânea de amendoim e 4 frutos de casca rija (caju, amêndoa, avelã e castanha do Brasil) em chocolates de leite e chocolates pretos, permitindo a deteção de 1 mg/kg de caju nestas matrizes (Tabela 3). Uma abordagem para a deteção múltipla de 14 alimentos

alergénicos e de glúten foi proposta por Cho *et al.* (2015), utilizando microesferas magnéticas. Neste método, cada alimento alergénico foi combinado com microesferas e dois anticorpos de captura, detetando caju cru com alguma reatividade cruzada com avelã, pistácio e castanha do Brasil.

Tabela 2 - Kits de métodos proteicos e de ADN disponíveis comercialmente para deteção/quantificação de caju em alimentos

Kit comercial (marca)	Tipo de ensaio (Cat. No.)	Reatividade cruzada	Intervalo de quantificação	LD (mg/kg)	LQ (mg/kg)	Tempo de execução
<i>Lateral Flow Cashew Kernel</i> (r-Biopharm AG, Darmstadt, Alemanha)	LFD qualitativo (BL610-25)	10 % castanha do Brasil, 1 % avelã, 1 % noz, 0,01% amendoim (torrado/cozido)	-	1	-	10 min (incubação)
<i>AgraStrip® Cashew/Pistachio</i> (Romer Labs Division, Getzersdorf, Áustria)	LFD qualitativo (COKAL1310AS)	Nenhuma informação	2-10.000 mg/kg	2	-	11 min (incluindo extração)
<i>Cashew Protein Rapid Test</i> (Elution Technologies, Colchester, VT, EUA)	LFD qualitativo (CASH-1013)	Nenhuma reatividade cruzada com as amostras testadas	-	2	-	10 min
<i>Reveal for multi-Treenut</i> (Neogen Corporation, Lansing, MI, EUA)	Dispositivo portátil de teste qualitativo (deteta amêndoa, caju, avelã, noz pecan, pistácio, noz) (8555)	Nenhuma informação	5-10 mg/kg	-	-	10 min
<i>AgraQuant® ELISA Cashew</i> (Romer Labs Division, Getzersdorf, Áustria)	ELISA em sanduiche quantitativo (COKAL3148)	Nenhuma informação	2-60 mg/kg	0,2	2	~60 min (tempo total de incubação)
<i>Cashew ELISA Kit</i> (Arigo Biolaboratories Corp, Hsinchu, Taiwan)	ELISA em sanduiche (ARG80791)	Nenhuma reatividade cruzada com 52 espécies de plantas e animal	2-60 mg/kg	0,2	2	~60 min (tempo total de incubação)
<i>AgraQuant® Plus Cashew</i> (Romer Labs Division, Getzersdorf, Áustria)	ELISA em sanduiche quantitativo (COKAL3148F)	Nenhuma informação	1-25 mg/kg	1	1	~30 min
<i>Cashew Check</i> (Bio-Check Ltd, Denbighshire, RU)	ELISA qualitativo (R-6046, R-6047)	Nenhuma informação	2-50 mg/kg	<0.2		~60 min (tempo total de incubação)
<i>Cashew ELISA kit</i> (BioFront Technologies, Tallahassee, FL, EUA)	ELISA quantitativo (CA2-EK-48/96)	Nenhuma reatividade cruzada com outras espécies (incluindo todos os frutos de casca rija)	1-40 mg/kg	0,13	1	10 min de extração 30min de teste
<i>Cashew Protein ELISA Kit</i> (Elution Technologies, Colchester, VT, EUA)	Sandwich ELISA (E-75CSH)	Nenhuma reatividade cruzada com 32 espécies de plantas	243 - 0,9 mg/kg	0.9	0.9	~50 min

LD – limite de deteção, LQ – limite de quantificação

Apesar de todas as vantagens atribuídas aos imunoenaios, estes métodos também possuem várias desvantagens que devem ser sempre consideradas, nomeadamente os problemas dos falso-positivos resultantes da reatividade cruzada e dos efeitos de matriz,

e os problemas de falsos negativos, como resultado de alterações conformacionais e/ou químicas/enzimáticas nas proteínas durante o processamento alimentar (temperatura, glicosilação, alterações de pH, formação de produtos de Maillard, fermentação, hidrólise parcial) (Costa *et al.*, 2014).

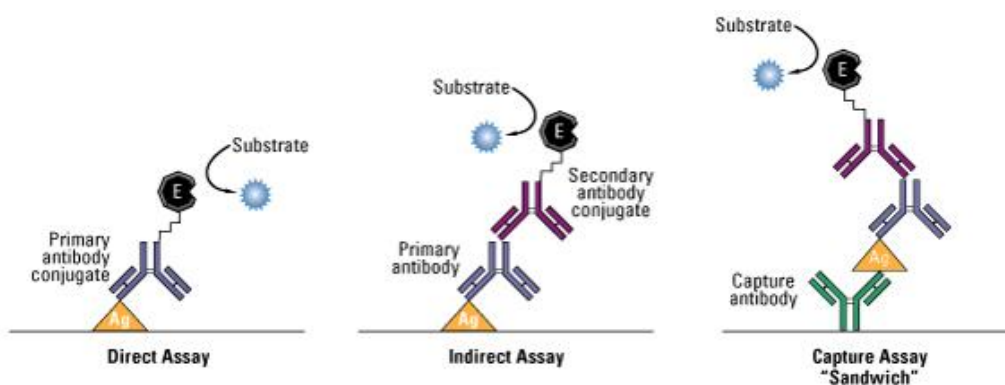


Figura 2 - Esquema dos diferentes tipos de ELISA direto, indireto e em sandwich (www.thermofisher.com).

Imunossensores

Atualmente, a aplicação de biossensores como plataformas alternativas para a detecção de alérgenos em alimentos tornou-se um dos campos mais emergentes. Quando comparado com outros métodos à base de proteínas (ex. ELISA), os biossensores são considerados como técnicas de detecção rápida, de simples execução, reprodutíveis, de baixo custo e com a vantagem de permitir detecção simultânea de múltiplos alérgenos. Além destas vantagens, os biossensores são de fácil utilização e com viabilidade para automatização, tornando possível a sua potencial aplicação à escala industrial para a monitorização em tempo real da presença de alérgenos em alimentos (Pilolli *et al.*, 2013).

Os biossensores baseiam-se na detecção direta do alvo através do reconhecimento de uma determinada interação biológica por um recetor e a molécula alvo (proteína ou ADN) (Prado *et al.*, 2015; Schubert-Ullrich *et al.*, 2009). Esta interação pode ser registada por diferentes transdutores (ótico, piezoelétrico ou eletroquímico), os quais registam o sinal e processam-no numa medida proporcional à concentração de um alvo específico (Schubert-Ullrich *et al.*, 2009).

Atualmente, alguns biossensores usando anticorpos como recetores (imunossensores) têm vindo a ser desenvolvidos para a análise dos alérgenos alimentares (Alves *et al.*, 2015). Rebe Raz *et al.* (2010) desenvolveram um sensor de *microarray* onde imobilizaram os anticorpos específicos acoplados a um transdutor ótico para a detecção simultânea de

12 ingredientes alergénicos, incluindo o caju. O dispositivo permitiu a deteção de 0,4 e 0,9 mg/kg de caju em matrizes complexas e processadas, biscoitos e chocolates, respetivamente (Tabela 3). Estes LD são semelhantes aos registados com os *kits* ELISA comerciais (Tabela 2), podendo estes chips constituírem uma excelente alternativa para deteção múltipla de diferentes alimentos alergénicos num mesmo ensaio.

Tabela 3 - Técnicas proteicas (ELISA, LC-MS e imunossensores) para a deteção de caju em alimentos

Método	Anticorpo/alvo	Reatividade cruzada	Nível de sensibilidade	Matriz alimentar	Referência
ELISA em Sandwich	IgG de coelho e cabra contra anacardein.	Reatividade cruzada ligeira com sementes de girassol, pistácio, noz e noz pecan.	LD - 1 mg/kg	Farinhas de trigo fortificadas, chocolates, cereais e especiarias. Produtos comerciais (snacks indianos).	Wei <i>et al.</i> (2002) (2003)
ELISA em Sandwich	Anticorpos policlonais de ovelha e coelho contra caju torrado.	Reatividade cruzada com avelã e pistácio de um painel de 99 alimentos/ingredientes.	LQ - 1 mg/kg	Biscoitos enriquecidos, chocolate e gelado.	Gaskin <i>et al.</i> (2009)
ELISA em Sandwich	IgG policlonais de ovelha, cabra e coelho contra caju cru e torrado sem gordura.	Reatividade cruzada com avelã e pistácio de um painel de 101 ingredientes (especiarias, frutos de casca rija, frutos entre outros).	LD - 0,11 mg/kg LQ - 0,46 mg/kg	Biscoitos enriquecidos em açúcar, leite achocolatado, e gelado de baunilha. Produtos comerciais.	Gaskin <i>et al.</i> (2011)
ELISA de rastreamento para múltiplos alergénios	Anticorpos policlonais de coelho contra proteínas de caju.	Nenhuma reatividade cruzada dentro de 23 espécies de plantas e animal (incluindo frutos de casca rija).	LD - 1 mg/kg	Leite enriquecido e chocolate preto.	Rejeb <i>et al.</i> (2005)
Sistema multiplex de esferas magnéticas	Não mencionado	Reatividade cruzada com avelã, castanha do Brasil, e pistácio. Possível reatividade com amêndoa e noz.	LOD - 5 ng/mL	Caju cru. Outros frutos de casca rija e materiais de referência.	Cho <i>et al.</i> (2015)
Chip de anticorpos em <i>microarray</i> com o caju. deteção iSPR	Anticorpos policlonais contra o caju.	Reatividade cruzada pronunciada com o pistácio. Reatividade cruzada moderada com avelã, castanha do Brasil e amêndoa.	Biscoitos: LD - 0,4 mg/kg LQ - 2,3 mg/kg Chocolates: LD - 0,9 mg/kg LQ - 3,1 mg/kg	Biscoitos enriquecidos e chocolates.	Raz <i>et al.</i> (2010)
LC-ESI-LIT-MS ² vs LC-ESI-LIT-MS ³	Ana o 2 (2 péptidos)	Nenhuma reatividade cruzada com amêndoa, avelã, noz e amendoim.	Modo MS ² : LD - 14 mg/kg LQ - 46 mg/kg Modo MS ³ : LD - 30 mg/kg LQ - 98 mg/kg	Bolachas modelo.	Bignardi <i>et al.</i> (2010)
LC-ESI-MS	Ana o 2 (2 péptidos)	Nenhuma reatividade cruzada com amêndoa, avelã, noz e amendoim.	Bolachas: LD - 0,5 mg/kg LQ - 1,6 mg/kg Chocolates: LD - 15 mg/kg LQ - 50 mg/kg	Chocolates e bolachas modelos.	Bignardi <i>et al.</i> (2013)
LC-MS/MS	Ana o 2 (2 péptidos) Ana o 3 (2 péptidos)	Nenhuma reatividade cruzada com outros frutos de casca rija.	LD - 1 mg/kg	Bolachas, biscoitos, bolos e farinhas.	Sealey-Voyksner <i>et al.</i> (2016)

Espetrometria de massa

A rápida e constante evolução da proteômica permitiu a sua aplicação na caracterização eficiente de proteínas alimentares. Dado o crescimento no desempenho e versatilidade dos instrumentos de espectrometria de massa, hoje em dia, é possível estabelecer estratégias analíticas inovadoras para a detecção, caracterização e quantificação de alergénios alimentares (Cunsolo *et al.*, 2014; Faeste *et al.*, 2011; Monaci *et al.*, 2009). Estas são habitualmente acopladas a aparelhos de cromatografia líquida (LC), permitindo desenvolver sistemas com elevada precisão, especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade (Monaci *et al.*, 2009; Picariello *et al.*, 2011). Para além destas vantagens, a tecnologia MS possibilita a detecção direta da/o proteína/péptido alvo (permitindo a identificação inequívoca dos analitos), eliminando o fenómeno de reatividade cruzada associado à interação com um recetor biológico (Monaci *et al.*, 2009). A detecção, quantificação e caracterização dos alergénios alimentares por métodos MS baseiam-se em duas estratégias principais: a “bottom-up” e a “top-down”. A primeira (mais utilizada para o rastreio dos alergénios) baseia-se na análise de péptidos marcadores obtidos por digestão trípica das proteínas em gel ou em solução, enquanto a segunda identifica diretamente as proteínas intactas (geralmente para a caracterização das proteínas alergénicas) (Monaci *et al.*, 2009; Picariello *et al.*, 2011; Prado *et al.*, 2015). A escolha entre a digestão das proteínas em gel ou em solução dependerá do tipo de análise a realizar por MS. A digestão em gel é executada normalmente para a análise do perfil (*fingerprint*) de péptidos através da espectrometria de MALDI-TOF-MS (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*). A digestão em solução é usada para a análise direta dos péptidos. A separação dos péptidos/proteínas é efetuada através de um sistema de LC de fase reversa acoplado a uma plataforma de MS com ionização por *eletrospray* (ESI-MS/MS) e isolamento por monitorização de reação selecionada (SRM) ou monitorização de reações múltiplas (MRM) (Cunsolo, *et al.*, 2014; Harrer *et al.*, 2010).

Relativamente ao caso do caju, três metodologias baseadas em sistemas MS foram desenvolvidas para a sua detecção e quantificação em alimentos processados (Tabela 3). Os sistemas MS propostos visavam a identificação de vários alvos em simultâneo, permitindo a discriminação do caju de outros frutos de casca rija (ex. amêndoa, noz, avelã) em diferentes matrizes alimentares (bolachas, chocolates, biscoitos, bolos e farinhas) (Bignardi *et al.*, 2010; Bignardi *et al.*, 2013; Sealey-Voyksner *et al.*, 2016). Para a identificação inequívoca do alimento alergénico foram utilizados pelo menos 2 péptidos com alvo em 2 proteínas alergénicas (Ana o 2 e Ana o 3) como marcadores de espécie. Os péptidos marcadores não evidenciaram reatividade cruzada com outros péptidos de

frutos de casca rija (Tabela 3), permitindo limites de detecção na ordem dos 0,5-100 mg/kg. Em geral, os limites de detecção e de quantificação propostos pelos métodos MS foram superiores aos reportados para *kits* ELISA comerciais (0,2-1 mg/kg) (Tabela 2) ou desenvolvidos academicamente (0,1-1 mg/kg) (Tabela 3). Tal como para outros métodos baseados na análise de proteínas (ex. ELISA ou LFD), as sensibilidades dos métodos por MS também são afetadas pelo efeito da matriz alimentar (Tabela 3). Assim, os limites de detecção e quantificação foram consideravelmente superiores para a análise de caju em alimentos complexos e/ou muito processados (ex. chocolates) (Bignardi *et al.*, 2013). Os sistemas MS são considerados excelentes alternativas para a detecção e quantificação direta de alergénios alimentares, mas o elevado custo dos equipamentos MS e a necessidade de pessoal especializado para a manutenção de plataformas MS deverão ser principais fatores a considerar.

Metodologias baseadas na análise de ADN

Atualmente, as técnicas baseadas no ADN têm sido encaradas com um interesse crescente para a análise de alergénios em alimentos (Johnson *et al.*, 2011). Comparadas com as proteínas, as moléculas de ADN apresentam elevada integridade mesmo após serem submetidas às condições severas do processamento alimentar. É por isso uma excelente alternativa para a avaliação de alimentos processados, apesar de identificar o alvo alergénico de modo indireto. Estas técnicas são de fácil implementação e têm sido utilizadas como ferramentas de confirmação na identificação de alimentos alergénicos (Costa *et al.*, 2014; Costa, Mafra, Carrapatoso *et al.*, 2012; Johnson *et al.*, 2011). Os métodos aplicados à análise de alergénios baseiam-se sobretudo na amplificação de sequências específicas através da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase). A especificidade e seletividade da amplificação estão estritamente relacionadas com a utilização de *primers* desenhados especificamente para a sua hibridação numa porção estudada de ADN que codifica para um determinado marcador de espécie ou do próprio alergénio (van Hengel, 2007). De salientar que, nos últimos anos, várias técnicas de biologia molecular têm sido desenvolvidas como abordagens altamente específicas e sensíveis para a identificação de alergénios alimentares (Costa, Mafra, Kuchta *et al.*, 2012; Costa, Mafra, & Oliveira 2012; Costa *et al.*, 2013).

PCR qualitativa

A PCR é uma técnica utilizada em biologia molecular para gerar milhares a milhões de cópias de uma dada sequência de ADN a partir da amplificação de uma ou algumas

cadeias de ADN (Johnson *et al.*, 2011; Rodriguez-Lazaro *et al.*, 2013; Wilson *et al.*, 2010). O processo consiste basicamente em utilizar os mecanismos da replicação *in vitro*, requerendo um conjunto de componentes necessários para a produção de novos produtos. Os componentes que se encontram numa mistura de PCR convencional incluem um par de oligonucleótidos (*primers*) complementares às cadeias de ADN alvo, nucleótidos contendo as diferentes bases azotadas (timina, adenina, guanina e citosina) (dNTP) para a construção das novas cadeias de ADN, a Taq polimerase e o seu cofator (Mg^{2+}) que permite estimular a atividade da enzima, o tampão para fornecer e estabilizar as condições ótimas de atividade da enzima e o ADN alvo.

Cada ensaio de PCR possui um programa específico e adequado ao alvo, à amostra e aos constituintes nucleotídicos da mistura envolvida. Cada ciclo consiste em três fases (Figura 3) (Rodriguez-Lazaro *et al.*, 2013; Wilson *et al.*, 2010):

- ✓ Desnaturação: onde ocorre a rutura das pontes de hidrogénio que mantêm as cadeias duplas unidas. Estas separam-se após serem sujeitas a temperaturas elevadas (94-96 °C);
- ✓ Hibridação: ligação dos *primers* às cadeias de ADN simples, ocorrendo geralmente a temperaturas mais baixas (50-65°C). De salientar que nesta fase cada *primer* liga-se às extremidades 3' do fragmento para que a polimerase possa identificá-las;
- ✓ Extensão: normalmente ocorre a 72°C, que é temperatura ótima da atividade enzimática da Taq polimerase, permitindo que esta adicione os dNTP de 5' para 3' criando as cadeias complementares do fragmento alvo.

A cada ciclo, as cópias de ADN geradas vão servindo de molde para as cópias seguintes, permitindo uma amplificação à escala exponencial. Após 25 a 40 ciclos, os produtos da PCR são avaliados qualitativamente de forma rápida por eletroforese em gel de agarose.

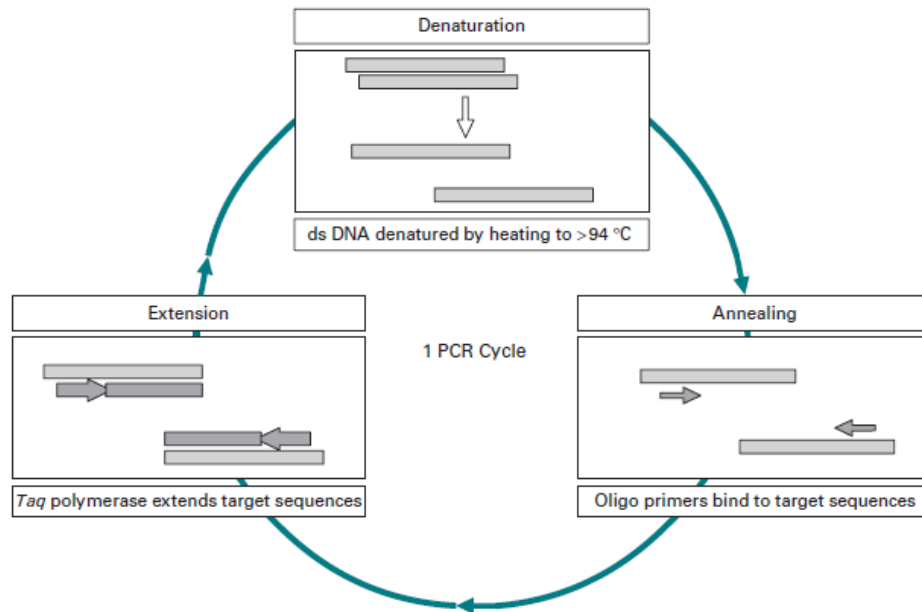


Figura 3 - Esquema simplificado de um ciclo de PCR. ds, dupla cadeia (Wilson *et al.*, 2010).

PCR em tempo real

A PCR em tempo real permite monitorizar a cinética da reação e da amplificação do alvo em tempo real. Baseia-se na aquisição de um sinal de fluorescência a cada ciclo, resultando na construção de curvas de amplificação e de calibração (Rodriguez-Lazaro *et al.*, 2013). Estas últimas possibilitam a quantificação do alvo após a análise prévia de padrões ou da normalização da técnica (Wilson *et al.*, 2010). A PCR em tempo real apresenta várias vantagens em relação à PCR convencional, nomeadamente maior rapidez e simplicidade de análise dos produtos, maior sensibilidade, possibilidade de quantificação numa gama alargada grandezas (até 8 ordens de magnitude) e a amplificação de fragmentos pequenos, permitindo a análise de alimentos complexos e muito processados (Prado *et al.*, 2015).

Contudo, é importante realçar que a performance dos métodos baseados na PCR (qualitativa e em tempo real) é altamente dependente da qualidade, integridade e quantidade do ADN a analisar. Neste contexto, o método de extração de ADN de alimentos é determinante, tendo especial relevância nos alimentos com elevado grau de processamento. Deste modo, a seleção do protocolo de extração do ADN deve ter em conta o tipo e origem do material (animal, vegetal) e os processamentos alimentares a que foi submetido (cru, processado termicamente) (Johnson *et al.*, 2011).

Existem dois tipos de PCR em tempo real que se distinguem pelo método usado na aquisição de sinal de fluorescência (Prado *et al.*, 2015). O uso de corantes de fluorescência é um dos métodos mais usados que permite a aquisição de sinal pela

emissão de fluorescência quando o corante se intercala com as cadeias duplas de ADN (Figura 4). O corante universal de cianina SYBR Green é o fluoróforo mais usado, pois possui uma eficiência de hibridação à cadeia dupla de cerca de 100 vezes superior ao brometo de etídio (Prado *et al.*, 2015). A análise das curvas de desnaturação (*melting*) que pode ser efetuada após a aquisição da fluorescência, permitindo a confirmação da identidade dos fragmentos e a monitorização da especificidade da amplificação. A emissão de fluorescência dá-se a 480 nm, sendo possível após estímulo do corante com luz azul (520 nm) e a ligação deste às cadeias duplas que estão a ser amplificadas. A medição da fluorescência é consequentemente efetuada no fim da extensão, antes que a desnaturação ocorra e o sinal de fluorescência decaia (Rodriguez-Lazaro *et al.*, 2013). Mais recentemente surgiram novos corantes com maior potencial fluorescente, estabilidade e especificidade para as cadeias duplas de ADN, chamados de corantes de nova geração como EvaGreen (Costa, Mafra, & Oliveira 2012). Adicionalmente, estes corantes têm também a vantagem de serem usados em maiores concentrações (aumentando o sinal de fluorescência) mas com menor ruído, tornando a reação mais eficiente.

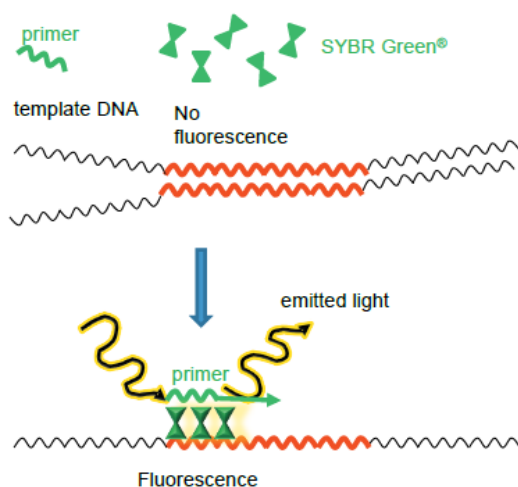


Figura 4 - Esquema simplificado do funcionamento de corantes tipo SYBR Green™ (Rodriguez-Lazaro *et al.*, 2011).

Como alternativas aos corantes de fluorescência existem as sondas específicas de hidrólise (sondas TaqMan™, Figura 5) ou de hibridação (Molecular Beacon™, Figura 6), sondas Scorpion™) que funcionam como um terceiro *primer*, permitindo conferir maior especificidade à amplificação (Prado *et al.*, 2015; Rodriguez-Lazaro *et al.*, 2013). Estas sondas consistem em oligonucleótidos específicos complementares ao fragmento a amplificar ao qual estão ligados um fluoróforo e um neutralizador (*quencher*) em cada

uma das suas extremidades. Ao contrário dos corantes de fluorescência que emitem sinal sempre que se ligam a uma cadeia dupla de ADN, o fluoróforo da sonda só emite fluorescência quando este é clivado desta pela Taq polimerase. Ao realizar a extensão, a polimerase liberta o fluoróforo e o neutralizador (*quencher*), que ao serem afastados em solução permite ao aparelho registar a fluorescência emitida pelo fluoróforo (García-Cañas *et al.*, 2004; Rodriguez-Lazaro *et al.*, 2013).

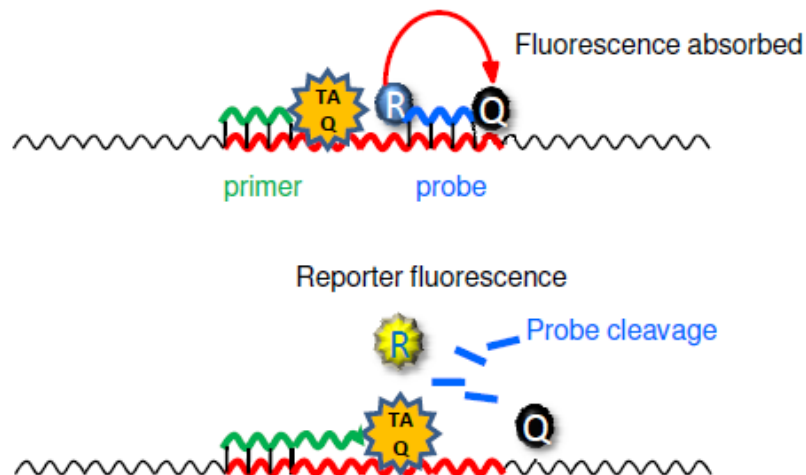


Figura 5 - Mecanismo de ação das sondas TaqMan™ (Rodriguez-Lazaro *et al.*, 2013).

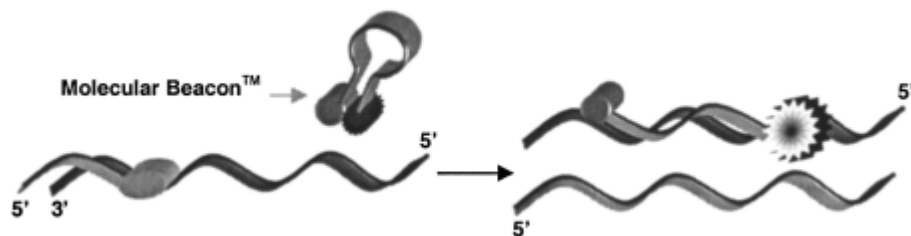


Figura 6 - Mecanismo de ação dos Molecular Beacon™ (García-Cañas *et al.*, 2004).

Para a quantificação dos produtos de PCR, a aquisição de fluorescência permite correlacionar o número de ciclos com o logaritmo da quantidade/concentração do analito, através do estabelecimento de uma curva de amplificação em que é representada a fluorescência emitida em função do número de ciclos (Smith *et al.*, 2009). O ciclo de quantificação (Cq) é determinado pelo valor de interceção da curva de amplificação com o valor limite *threshold*, zona onde o produto formado é diretamente proporcional à quantidade de ADN inicial (Prado *et al.*, 2015; Rodriguez-Lazaro *et al.*, 2013). Em cada curva de amplificação, é possível distinguir três fases (Figura 7) (Rodriguez-Lazaro *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2009):

- i. **Fase de iniciação:** ocorre nos primeiros ciclos da PCR em que a emissão de fluorescência das amostras não é distinguida da linha de base;
- ii. **Fase exponencial:** ocorre um aumento exponencial da fluorescência, identificando-se um sinal maior do que o ruído e podendo ser correlacionado com a quantidade inicial de ADN das amostras;
- iii. **Fase “plateau”:** os reagentes ficam esgotados e não se observa aumento da fluorescência, salientando-se uma diminuição da eficiência da reação.

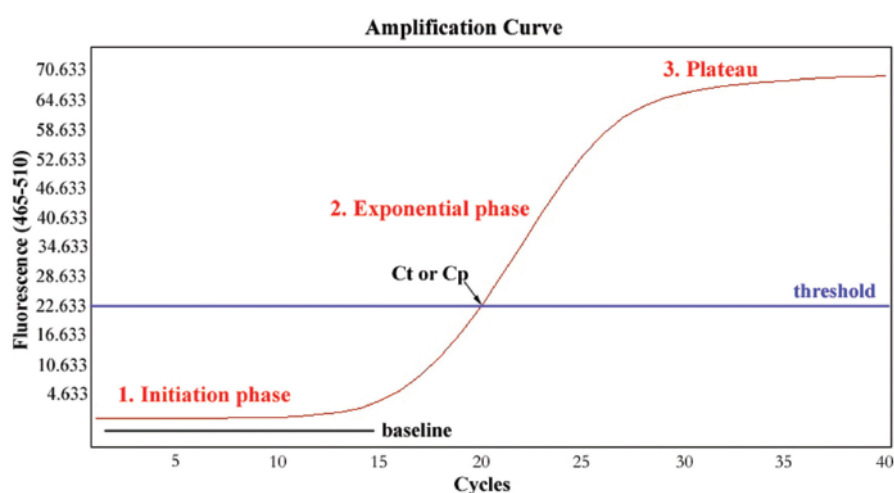


Figura 7 - Curva de amplificação da PCR em tempo real (Rodriguez-Lazaro *et al.*, 2013).

Considera-se que o Cq é o valor mínimo de ciclos para o qual a fluorescência é significativamente superior ao ruído, ou seja, quando o sinal de fluorescência é detetado pela primeira vez (Smith *et al.*, 2009). A partir do Cq, consegue-se determinar a concentração inicial do ADN alvo que será inversamente relacionada com este (Rodriguez-Lazaro *et al.*, 2013). Esta estratégia permite a quantificação tanto absoluta, através da aquisição de sinal de fluorescência de padrões obtidos por diluição seriada do alvo, quanto relativa. Posteriormente, uma curva de calibração é construída a partir dos valores de Cq de cada diluição em função do logaritmo da concentração do alvo (absoluta ou relativa). O Cq determinado das amostras desconhecidas é interpolado à curva de calibração obtida por regressão, permitindo o cálculo da concentração inicial em estudo (Smith *et al.*, 2009).

No âmbito da análise dos alergénios, a técnica de PCR em tempo real é das mais utilizadas. Com vantagens como custo e tempo de análise razoáveis e semelhantes aos imunoensaios, e requisitos moderados de grau de especialização dos analistas e dos equipamentos, fazem destes sistemas excelentes alternativas para a deteção/quantificação de alergénios em alimentos. Para além disso, a sua elevada

especificidade, conseguida pela escolha adequada dos *primers*, reduz significativamente o fenómeno de reatividade cruzada observado nos métodos proteicos (Costa *et al.*, 2014; Costa *et al.*, 2015). Atualmente, alguns *kits* de PCR em tempo real para a deteção do caju já se encontram comercialmente disponíveis, ainda que em menor escala que os imunoenaios (ex. ELISA, LFD). A tabela 2 apresenta alguns *kits* de PCR em tempo real para a identificação qualitativa do caju numa ampla variedade de matrizes alimentares. As alegadas sensibilidades de 1 a 5 cópias de ADN genómico estão, no entanto, dependentes do efeito de matriz. Como era de esperar, estas técnicas não apresentam reatividade cruzada entre o caju e outros alimentos alergénicos testados.

Além dos *kits* comerciais, existem alguns métodos de PCR em tempo real reportados na literatura para a deteção/quantificação específica do caju cru ou processado (ex. chocolates, gelados, pesto) (Tabela 4) (Brzezinski 2006; Ehlert *et al.*, 2008; Lopez-Calleja *et al.*, 2015; Piknova *et al.*, 2007).

A maioria das técnicas de PCR em tempo real propostas para quantificação do caju tem como alvos os genes unicópia (Ana o 1, Ana o 2 e Ana o 3), existindo apenas um método com alvo numa região multicópia (*internal transcriber spacer ribossomal* - ITS). Na vertente de quantificação do alvo, os genes unicópia têm sido mais utilizados por existirem nas células num número mais constante, logo apresentando menor variabilidade entre tecidos, permitindo a reprodutibilidade dos resultados (Prado *et al.*, 2015). Contudo, os sistemas de PCR em tempo real com alvo em genes unicópia apresentam menor sensibilidade (~100 mg/kg de caju), comparando com a deteção de um marcador multicópia (0,1 mg/kg de caju) (Tabela 4). De referir que estes sistemas exibem elevada especificidade, não tendo sido evidenciados fenómenos de reatividade cruzada entre o caju e outras espécies (plantas e animais).

A PCR em tempo real pode também ser utilizada em sistema multiplex, permitindo a deteção simultânea de vários alergénios num único ensaio. Dois sistemas de PCR em tempo real com deteção multiplex foram desenvolvidos para quantificar caju com elevada especificidade e sensibilidade numa ampla variedade de alimentos (Tabela 4) (Koppel *et al.*, 2012; Pafundo *et al.*, 2010).

Ligation-dependent Probe Amplification

Uma nova alternativa da PCR propõe a sua aplicação como técnica de análise adequada na área alimentar, particularmente na deteção de alergénios com o objetivo de eliminar algumas das dificuldades associadas aos sistemas multiplex. O método (*ligation-dependent probe amplification* - LPA) consiste na amplificação de produtos de PCR resultantes da ligação de sondas de hibridação bipartidária específicas, usando um único

par de *primers* para a amplificação simultânea de vários alvos (PCR competitiva). A eficiência de amplificação de todos os fragmentos alvo é, por isso, semelhante. O fragmento resultante é de tamanho único e é quantificado após a sua separação por eletroforese capilar (Prado *et al.*, 2015).

Tabela 4 - Técnicas de ADN (PCR em tempo real, LPA, *microarrays*) para a deteção de caju em alimentos

Método	Gene alvo	Reatividade cruzada	Matrizes	Nível de sensibilidade	Referências
PCR em tempo real (sonda TaqMan)	2S albumina (Ana o 3)	Sem reatividade cruzada com noz, amendoim, avelã amêndoa e castanha do Brasil	Misturas modelo de biscoitos de chocolate com caju	5 pg de ADN de caju. 100 mg/kg de caju em biscoitos de chocolate	Brzezinski (2006)
PCR em tempo real (sonda TaqMan)	2S albumina (Ana o 3)	Sem reatividade cruzada com 17 espécies de plantas (incluindo frutos de casca rija)	Misturas modelo de caju em nogado de pistácio. Produtos comerciais (snacks, chocolate, cereais de pequeno-almoço, bolachas)	1,25 pg de ADN de caju. 100 mg/kg de caju em nogado de pistácio	Piknova <i>et al.</i> (2007)
PCR em tempo real (sonda TaqMan)	Ana o 3	Sem reatividade cruzada com as 56 espécies de plantas e animais (incluindo frutos de casca rija)	Misturas modelo de caju em pesto de manjerição. Produtos comerciais (pesto, gelados, doces, biscoitos, cremes)	0,5 pg de ADN de caju. 2 mg/kg de caju em pesto de manjerição	Ehlert <i>et al.</i> (2008)
PCR em tempo real (sonda TaqMan)	Internal Transcribed Spacer (ITS1)	Sem reatividade cruzada com 49 espécies de plantas e animais	Misturas modelo de caju cru e processado termicamente em farinha de trigo. Produtos comerciais (chocolates, pão, bolachas, cereais, produtos de carne)	0,1 mg/kg de caju cru e processado termicamente em farinha de trigo	Lopez-Calleja <i>et al.</i> (2015)
PCR em tempo real (sistema multiplex com SYBR GreenER)	Ana o 1	Nenhuma reatividade cruzada com 13 espécies de plantas	Caju em diferentes misturas de frutos de casca rija. Produtos comerciais (bolachas, chocolates e crackers)	0,5 pg de ADN de caju	Pafundo <i>et al.</i> (2010)
PCR em tempo real (sonda TaqMan, Sistema em multiplex)	Ana o 3	Reatividade cruzada ligeira com pistácio de um painel de 42 espécies de plantas e animal	Misturas modelo de salsichas com caju e biscoitos de arroz com caju. Produtos comerciais (chocolates, sanduiches, cremes)	32 mg/kg e 5 mg/kg de caju em salsichas cozidas e biscoitos de arroz, respetivamente	Koppel <i>et al.</i> (2012)
Amplificação por sonda dependente de ligação (LPA) (sistema multiplex)	Ana o 3	Nenhuma reatividade cruzada com 56 espécies de plantas e animal (incluindo frutos de casca rija)	Misturas modelo de caju em pesto. Produtos comerciais (pesto, gelados, doces, biscoitos, cremes, molhos)	5 mg/kg de caju em pesto	Ehlert <i>et al.</i> (2009)
Biossensor ótico de chip em camada fina acoplado a PCR (sistema multiplex)	Ana o 3	Nenhuma reatividade cruzada entre as espécies usadas no biossensor (carne, soja, peixe, camarão, frango, trigo, amendoim, caju)	Misturas modelo de caju em milho em pó. Produtos comerciais (bolachas, raspas de chocolate, cereais)	0,5 pg de ADN de caju 10 mg/kg de caju em milho em pó	Wang <i>et al.</i> (2011)

Um sistema LPA foi desenvolvido por Ehlert *et al.* (2009) para a deteção simultânea de 10 alimentos alergénicos, incluindo o caju, em várias matrizes alimentares (ex. biscoitos, chocolates). A especificidade das sondas foi avaliada através de teste reatividade cruzada com 56 espécies de plantas e animais, assegurando a ausência de

amplificações não específicas. O sistema LPA permitiu detetar caju até um limite de 5 mg/kg em pesto (Tabela 4).

Genossensores/Microarrays

Os biossensores baseados na deteção de ADN, conhecidos como genossensores, têm vindo a desempenhar um papel importante na deteção de fragmentos de sequências de ADN específicos. Estes sistemas baseiam-se numa tecnologia similar à dos imunossensores, apenas diferindo na interação biológica que corresponde à ligação entre uma sequência ADN/ARN alvo e uma sonda complementar específica que funciona como recetor (Alves *et al.*, 2015; Prado *et al.*, 2015). Tal como os imunossensores, os genossensores apresentam várias vantagens, tais como a fácil execução, simplicidade, baixo custo, possível automatização e elevadas sensibilidade e especificidade. A montagem de vários genossensores em plataformas de *microarray* possibilita a identificação/quantificação de vários alvos simultaneamente, permitindo um maior desempenho e menor tempo de análise.

Um chip de *microarrays* com deteção ótica em camada fina acoplada a um sistema de PCR em tetraplex foi desenvolvido com sucesso para a deteção de 8 alergénios em alimentos processados (Wang *et al.*, 2011). O sistema proposto reporta a deteção do caju com LD relativo de 10 mg/kg em farinha de milho e um LD absoluto de 0,5 pg de ADN genómico (Tabela 4). Não se observa qualquer fenómeno de reatividade cruzada entre as espécies testadas, sendo aplicado a uma ampla variedade de produtos comerciais.

OBJECTIVO E ÂMBITO DO TRABALHO

Nos últimos anos, o número de reações alérgicas induzidas pelo consumo de caju tem vindo a aumentar, principalmente nos países industrializados. Para evitar potenciais riscos para a saúde consumidores alérgicos, o desenvolvimento e aplicação de metodologias analíticas adequadas representam excelentes ferramentas para a gestão industrial de alimentos processados contendo ingredientes alergénicos, facilitando a sua subsequente monitorização por parte das entidades reguladoras.

Desta forma, o objetivo deste trabalho centrou-se no desenvolvimento de marcadores moleculares para a deteção de alergénios do caju, utilizando as técnicas de PCR qualitativa e PCR em tempo real com sondas de hidrólise. Neste contexto, três genes que codificam as proteínas alergénicas Ana o 1, Ana o 2 e Ana o 3 foram avaliados, tendo sido desenvolvidos e otimizados três métodos de PCR qualitativa. Para tal, três conjuntos

de *primers* com alvo em cada um dos genes foram desenhados e testados *in silico* e experimentalmente (reatividade cruzada com diferentes espécies animais e vegetais) para a avaliar especificidade dos *primers*. Sistemas de PCR em tempo real com uso de corante de fluorescência EvaGreen e alvo nos três genes foram também desenvolvidos. Para obviar alguns problemas de amplificação não específica resultantes do uso do corante EvaGreen, novos métodos com sondas de hidrólise foram desenvolvidos para os genes que codificam os alergénios Ana o 2 e Ana o 3. Para a otimização de todas as técnicas e na ausência de materiais de referência certificados, vários conjuntos de misturas modelos contendo caju foram preparados, nomeadamente em massa e em farinha de trigo ($n=13$ misturas com quantidades de 50% a 0,0001%). Para avaliar o efeito do processamento térmico na performance das metodologias desenvolvidas, misturas modelo de massas e biscoitos de caju foram preparadas numa gama de quantidades de 10% a 0.0001% ($n=13$). Para se proceder à quantificação do caju em biscoitos, foram desenvolvidos métodos normalizados de PCR em tempo real com alvo numa região eucariota universal (18S rARN) e em cada um dos genes específicos para o caju (Ana o 2 e Ana o 3). Os métodos normalizados foram validados com recurso a amostras cegas preparadas com quantidades conhecidas de caju em biscoito e massa de biscoito.

COMPONENTE EXPERIMENTAL

METODOLOGIA

Preparação das misturas modelo

De forma a garantir a integridade do processo de preparação das amostras e misturas modelo, foram sempre seguidas as regras de boas práticas de laboratório em biologia molecular. Antes de se proceder à trituração das amostras, todo o material e recipientes usados nesta operação foram previamente descontaminados quimicamente com uma solução de hipoclorito de sódio durante 30 minutos, de forma a evitar possíveis contaminações cruzadas com ADN de outras fontes. O caju, a massa e a farinha de trigo foram adquiridos comercialmente e triturados com recurso a um moinho de lâmina dupla (Grindomix GM200, Retsch, Alemanha) utilizando recipientes diferentes de forma a prevenir contaminações.

Dois conjuntos independentes de misturas modelo de caju em massa (PCM) ou caju em farinha de trigo (PCW) foram preparadas em dias distintos para evitar contaminações. As misturas modelo de caju em massa (PCM) foram preparadas por diluição seriada de acordo com as quantidades descritas na Tabela 5.

Tabela 5 - Misturas binárias de caju em massa utilizadas como materiais de referência.

Misturas modelo	Concentração de caju	Massas usadas
PCM0	0%	100 g massa
PCM50	50% (500.000 mg.kg ⁻¹)	100 g massa + 100g caju
PCM10	10% (100.000 mg.kg ⁻¹)	280 g massa + 70g PCM50
PCM8	8% (80.000 mg.kg ⁻¹)	60 g massa + 240 g PCM10
PCM5	5% (50.000 mg.kg ⁻¹)	112,5 g massa + 187,5 g PCM8
PCM4	4% (40.000 mg.kg ⁻¹)	44 g massa + 176 g PCM5
PCM2,5	2,5% (25.000 mg.kg ⁻¹)	75 g massa + 125 g PCM4
PCM1	1% (10.000 mg.kg ⁻¹)	120 g massa + 80 g PCM2,5
PCM0,5	0,5% (5.000 mg.kg ⁻¹)	100 g massa + 100 g PCM1
PCM0,25	0,25% (2.500 mg.kg ⁻¹)	100 g massa + 100 g PCM0,5
PCM0,1	0,1% (1.000 mg.kg ⁻¹)	120 g massa + 80 g PCM0,25
PCM0,05	0,05% (500 mg.kg ⁻¹)	75 g massa + 75 g PCM0,1
PCM0,01	0,01% (100 mg.kg ⁻¹)	160 g massa + 40 g PCM0,05
PCM0,005	0,005% (50 mg.kg ⁻¹)	75 g massa + 75 g PCM0,01
PCM0,001	0,001% (10 mg.kg ⁻¹)	160 g massa + 40 g PCM0,005
PCM0,0005	0,0005% (5 mg.kg ⁻¹)	75 g massa + 75 g PCM0,001
PCM0,0001	0,0001% (1 mg.kg ⁻¹)	80 g massa + 20 g PCM0,0005

Resumidamente, para a primeira mistura de 50% (500.000 mg/kg) adicionaram-se 100 g de caju com 100 g de massa. A referida mistura foi homogeneizada no moinho, sendo retirada a quantidade necessária para a mistura seguinte. As misturas seguintes foram

obtidas por adições sequenciais de massa até uma concentração de 0,0001% (1 mg/kg) num total de $n=17$ misturas (Tabela 5). As misturas binárias de caju em farinha de trigo (PCW) foram preparadas de forma semelhante às misturas modelo anteriores (PCM), com as quantidades referidas na Tabela 6.

Um conjunto de misturas modelo com as quantidades 8%, 4%, 2,5% e 0,25% foram adicionalmente preparadas com o intuito de funcionarem como amostras cegas para a validação dos métodos de PCR desenvolvidos. Todas as misturas foram mantidas a -20°C até se proceder à sua extração.

Tabela 6 - Misturas binárias padrão de caju em farinha de trigo utilizadas como materiais de referência

Misturas modelo	Concentração de caju	Massas usadas
PCW0	0%	100 g farinha de trigo (FT)
PCW1	50% (500.000 mg.kg ⁻¹)	100 g FT + 100 g caju
PCW2	10% (100.000 mg.kg ⁻¹)	160 g FT + 40 g PCW1
PCW3	5% (50.000 mg.kg ⁻¹)	100 g FT + 100 g PCW2
PCW4	1% (10.000 mg.kg ⁻¹)	160 g FT + 40 g PCW3
PCW5	0,5% (5.000 mg.kg ⁻¹)	100 g FT + 100 g PCW4
PCW6	0,1% (1.000 mg.kg ⁻¹)	160 g FT + 40 g PCW5
PCW7	0,05% (500 mg.kg ⁻¹)	10 g FT + 100 g PCW6
PCW8	0,01% (100 mg.kg ⁻¹)	160 g FT + 40 g PCW7
PCW9	0,005% (50 mg.kg ⁻¹)	100 g FT + 100 g PCW8
PCW10	0,001% (10 mg.kg ⁻¹)	160 g FT + 40 g PCW9
PCW11	0,0005% (5 mg.kg ⁻¹)	100 g FT + 100 g PCW10
PCW12	0,0001% (1 mg.kg ⁻¹)	160 g FT + 40 g PCW11
VALIDAÇÃO		
PCW13	8% (80.000 mg.kg ⁻¹)	92 g FT + 8 g caju
PCW14	4% (40.000 mg.kg ⁻¹)	50 g FT + 50 g PCW13
PCW15	2,5% (25.000 mg.kg ⁻¹)	30 g FT + 50 g PCW14
PCW16	0,25% (2.500 mg.kg ⁻¹)	72 g FT + 8 g PCW15

Preparação de misturas modelo reais

Para avaliar o efeito do processamento térmico na performance dos métodos de PCR propostos foram preparadas misturas modelo de massa de biscoito com quantidades conhecidas de caju, sendo posteriormente submetidas a processamento térmico. Inicialmente prepararam-se três lotes de massa de biscoito cuja receita base continha 225 g de farinha de trigo com fermento, 100 g de açúcar, 90 g de manteiga e 50 mL de leite. De forma a minimizar a quantidade de massa de biscoito necessária, as misturas foram obtidas por diluição 1:10 a partir da mistura 10% ou 5% de biscoito de caju de acordo com o descrito na Tabela 7. As misturas seguintes foram obtidas por adições

sequenciais de massa de biscoito até uma concentração de 0,0001% (1 mg/kg) num total de $n=13$ misturas (Tabela 7). Em cada mistura foi retirada uma porção de massa de biscoito não processado e congelada a -20°C até à sua extração. O restante da mistura modelo foi processado termicamente em forno a 180°C durante 15 min. Deste processo, resultaram dois conjuntos de misturas modelo, um de massas cruas e outro das respectivas massas cozidas ou biscoitos (Figura 8).

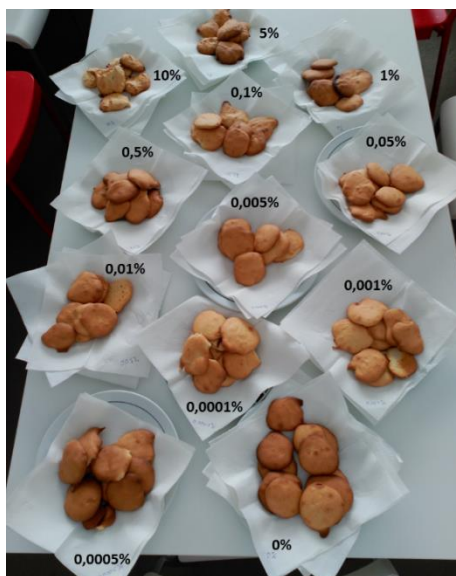


Figura 8 - Misturas modelo de biscoitos de caju 100,000 -1 mg/kg como misturas de referência.

Depois de frios, os biscoitos foram triturados num moinho de lâmina dupla e armazenados a -20°C até se proceder à sua extração. Adicionalmente, foram preparadas misturas modelo de 8%, 4%, 2,0% e 0,20% de e respectivos biscoitos, como misturas cegas para validação (Tabela 7 e Figura 9).



Figura 9 - Misturas cegas de biscoitos de caju usados para validação

Tabela 7 - Misturas modelo de biscoitos de caju utilizadas como misturas de referência.

Misturas Modelo	Concentração de caju	Quantidades usadas
BC0	0%	200 g massa de biscoito (MB)
BC1	10% (100.000 mg.kg ⁻¹)	180 g MB + 20 g caju
BC2	1% (10.000 mg.kg ⁻¹)	180 g MB + 20 g BC1
BC3	0,1% (1.000 mg.kg ⁻¹)	180 g MB + 20 g BC2
BC4	0,01% (100 mg.kg ⁻¹)	180 g MB + 20 g BC3
BC5	0,001% (10 mg.kg ⁻¹)	180 g MB + 20 g BC4
BC6	0,0001% (1 mg.kg ⁻¹)	180 g MB + 20 g BC5
BC7	5% (50.000 mg.kg ⁻¹)	190 g MB + 10 g caju
BC8	0,5% (5.000 mg.kg ⁻¹)	180 g MB + 20 g BC7
BC9	0,05% (500 mg.kg ⁻¹)	180 g MB + 20 g BC8
BC10	0,005% (50 mg.kg ⁻¹)	180 g MB + 20 g BC9
BC11	0,0005% (5 mg.kg ⁻¹)	180 g MB + 20 g BC10
VALIDAÇÃO		
BC12	8% (80.000 mg.kg ⁻¹)	230 g MB + 20 g caju
BC13	4% (40.000 mg.kg ⁻¹)	125 g MB + 125 g BC12
BC14	2,0% (25.000 mg.kg ⁻¹)	100 g MB + 100 g BC13
BC15	0,20% (2.500 mg.kg ⁻¹)	180 g MB + 20 g BC14

Amostras para avaliação da reatividade cruzada

Para avaliar a especificidade dos *primers* foram analisadas diferentes plantas usadas como alimentos, num total de $n=41$ espécies que estão representadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Descrição das amostras usadas para teste de reatividade cruzada

Códigos	Descrição	Códigos	Descrição
AN03	Noz Macadâmia	AN98	Tomate cereja
AN36	Pistácio torrado e salgado	AN99	Miolo de avelã
AN37	Amendoim torrado e salgado	AN118	Castanha do Brasil
AN38	Favas fritas	AN119	Noz pecan
AN40	Miolo de pinhão	AN132	Maizena
AN41	Castanha	AN144	Pão ralado
AN43	Pêssego	AN146	Caju cru
AN44	Farinha de trigo	C4.2	Milho
AN46	Arroz	PHP0	Massa crua
AN49	Pevide torrada	WM0	Farinha de milho
AN50	Ameixa preta	WR0	Farinha de arroz
AN53	Alperce	EM21	Erva príncipe
AN55	Colza	EM29	Hortelã-pimenta
AN56	Girassol	EM32	Malva
AN57	Tremoço cozido	EM33	Sene
AN60	Aveia grão	EM35	Tília
AN61	Cevada grão	EM39	Passiflora
AN62	Centeio grão	EM44	Cardo mariano
AN63	Soja	EM46	Manjerição
AN76	Amêndoa	EM47	Coentros
AN78	Noz	H. and	<i>Hipericum androsaemum</i>

Extração do ADN

Para a extração do ADN das misturas modelos e das espécies testadas na reatividade cruzada, foram usados dois *kits* de extração de ADN disponíveis comercialmente: *NucleoSpin Food kit* e *NucleoSpin Plant II DNA extraction kit* (ambos da Macherey-Nagel, Düren, Alemanha).

Método NucleoSpin Food

O método *Nucleospin Food kit* foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante, com ligeiras alterações. Brevemente, 200 mg de cada amostra/mistura, previamente homogeneizados, foram pesados para tubos de reação esterilizados de 2 mL. Para promover a rotura das células (lise), adicionaram-se 750 µL de tampão de lise CF pré-aquecido a 65°C e 10 µL de solução de proteinase K (10 mg/mL). Após vórtex vigoroso, os tubos foram incubados por 60 min a 65°C num termobloco (Eppendorf Thermomixer Comfort, Hamburg, Alemanha) com uma agitação de 950 rpm. Após incubação, os tubos foram colocados à temperatura ambiente, tendo-se adicionado 4 µL de solução de RNase (2 mg/mL). Deixou-se incubar à temperatura ambiente durante 5 minutos. De seguida, centrifugou-se a 17.000xg durante 10 min a 4°C. Transferiu-se delicadamente o sobrenadante para tubos de 1,5 mL, repetindo-se a centrifugação por 5 minutos de modo a garantir a eliminação de material que ainda esteja em suspensão. De seguida, pipetaram-se aproximadamente 450-500 µL de sobrenadante para um novo tubo de reação de 2,0 mL, adicionando-se iguais volumes de reagente de ligação ao ADN (C4) e de etanol absoluto. Após agitação por inversão, todo o conteúdo foi transferido para uma coluna de sílica e centrifugado a 11.000x g por 1 minuto à temperatura ambiente. Nota: o volume máximo da coluna é 750 µL, por isso, o passo anterior necessitou de ser repetido 2-3 vezes. O ADN fica retido na coluna de sílica que foi lavada 3 vezes com 400 µL de CWQ, 700 µL e 200 µL de C5 com centrifugações de 1 min a 11.000x g à temperatura ambiente. Na última lavagem com C5, a centrifugação é feita durante 2 min nas mesmas condições para secar a coluna. Por fim, a eluição do ADN foi efetuada para um novo tubo de 1,5 mL com 50 µL de tampão de eluição CE pré-aquecido a 70°C, após incubação por 5 minutos à temperatura ambiente e centrifugação por 1 minuto a 11.000x g. Esta operação foi repetida duas vezes, obtendo-se um volume final de extrato de 100 µL. Os extratos foram armazenados a -20°C após terem-se efetuado as diluições adequadas. Aquando do uso da RNase, todas as extrações foram realizadas em lotes de 6 amostras de modo a garantir a correta atividade da RNase e com um branco para controlar eventuais contaminações durante as extrações.

Método NucleoSpin Plant

Este método foi exclusivamente usado para a extração das plantas testadas em ensaios de avaliação de reatividade cruzada. A 200 mg de amostra, juntaram-se 600 µL de tampão de lise PL2 (contendo dodecilsulfato de sódio - SDS) pré-aquecido a 65°C e 20 µL de RNase A (10 mg/mL). Os tubos foram incubados num termobloco por 60 min a 65°C, tendo o cuidado de homogeneizar por vórtex de 15 em 15 minutos para garantir uma melhor lise celular. Juntou-se às misturas 150 µL de tampão PL3, as quais foram de novo homogeneizadas por vórtex e incubadas em gelo por 5 minutos para a precipitação do SDS. De seguida, transferiu-se o conteúdo para uma coluna de purificação e centrifugou-se por 2 minutos a 11.000xg de modo a eliminar os resíduos. Após filtração, rejeitou-se a coluna e adicionaram-se 450 µL de tampão PC ao sobrenadante, homogeneizando-se a mistura por inversão. Esta etapa permitiu ajustar as condições de ligação do ADN à coluna. Transferiu-se todo o conteúdo da mistura para uma nova coluna de sílica e centrifugou-se a 11.000xg por 1 min. Devido à capacidade máxima de 750 µL da coluna, a mistura foi eluída 2-3 vezes. O ADN fica retido na coluna de sílica que foi lavada 3 vezes com 400 µL de PW1, 700 µL e 200 µL de PW2 com centrifugações de 1 min a 11.000xg à temperatura ambiente. Na última lavagem com PW2, a centrifugação foi feita durante 2 min nas mesmas condições para secar a coluna. Para a eluição do ADN da coluna foram adicionados 50 µL de solução PE pré-aquecida a 65°C. Deixou-se incubar por 5 min antes de centrifugar a 11.000xg por 1 min. Este passo foi repetido duas vezes, obtendo-se um extrato final de 100 µL. Os extratos foram armazenados a -20°C após terem sido efetuadas as diluições adequadas.

Amplificação por PCR

Escolha e desenho dos primers

Para a deteção específica da castanha de caju (*A. occidentale*), foram selecionados três genes que codificam as proteínas alergénicas Ana o 1 (vicilina), Ana o 2 (legumina) e a Ana o 3 (albumina 2S) (AF395894.1; AF453947.1 e AY081853.1, respetivamente) do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os *primers* foram desenhados com recurso ao software primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Os critérios de seleção dos *primers* envolveram a definição de uma temperatura ótima de hibridação (60-65°C), elevado conteúdo em guanina-citosina (G-C) e um comprimento de fragmento a amplificar (<150 pb). A especificidade dos *primers* foi avaliada *in silico* com recurso ao programa nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE>

[_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome](#)) para verificar a ausência de complementaridade com outras sequências existentes nas bases de dados da GenBank (reatividade cruzada). A ausência de auto-hibridação e a formação de *hairpins* foram propriedades avaliadas com o software Oligocalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>). Após o estudo e escolha dos *primers*, estes foram sintetizados e adquiridos da empresa STAB Vida (Caparica, Portugal). A Figura 10 representa um exemplo do desenho dos *primers* e respetiva sonda de hidrólise para a sequência do gene Ana o 2. Todos os *primers* e respetivas sondas de hidrólise usados neste trabalho estão apresentados na Tabela 9.

1	TCTTTCTGTTTGCTTTTAAATTCCTTTTCATGGTTGCCTAGCTTCTCGCCAGGAATGGCAACAACAA
68	GATGAGTGCCAAATCGATAGGCTGGATGCCCTTGAACCCGATAACCGAGTTGAGTATGAAGCCGGTA
135	CGGTGGAAGCCTGGGATCCTAACCATGAGCAATTCGGATGCGCTGGTGTGCCTTGGTTAGGCATAC
202	CATCCAACCTAATGGCCTTCTCTTGCCTCAATATTTCTAATGCTCCTCAACTTATTTACGTTGTCCAG
269	GGTGAGGGTATGACAGGAATATCATATCCAGGATGCCAGAACTTACCAAGCGCCCCAACAGGGAC
306	GACAACAGGGACAGAGTGGTAGGTTCCAGGACCGGCATCAAAGATTTCGACGCTTCCGTCGAGGCGA
373	TATCATCGCAATCCCCGCCGGAGTAGCACACTGGTGCTACAACGAGGGCAATTCCCCGGTCGTCACT
440	GTTACTCTTCTAGACGTCTCAAACAGTCAAATCAGCTTGATAGGACCCACGAAAATTCATCTGG
507	CTGGTAACCCAAAAGATGTGTTCCAGCAGCAGCAACAACACCAATCTCGCGGGCGTAACCTTTTTTC
574	TGGCTTCGATACAGAGTTATTGGCTGAGGCTTTCGAAGTGACGAACGTCTCATAAAGCAGCTCAAA
641	AG CGAGGACAACAGGGGTGGCA TTGTTAAGGTGAAGGATGACGAACCTTCGGGTGATCCGCCCATCAA
708	GGAG TCAGAGCGAGCGTGGAAAGTGAGAGTGAA GAGGAAAGTGAGGATGAAAACG CCGATGGGGACA
775	GCGTGACA ATGGGATTGAAGAGACCATTTGCACTATGAGACTCAAAGAGAATATCAATGATCCTGCT
842	CGCGCTGACATTTACACCCAGAAAGTCGGTCGTCTTACCACACTCAACAGCCTCAACCTCCCAATCC
909	TCAAATGGCTTCAACTCAGTGTGAAAAGGGTGTGCTATACAAAATGCTCTAGTGCTGCCACACTG
976	GAACCTCAACTCGCACAGCATAATATACGGGTGCAAGGGTAAAGGCCAGGTTCAAGTAGTAGACAAC
1043	TTCGGCAACAGAGTGTTCGACGGCGAAGTCCGCGAGGGACAGATGTTGGTGGTGCCACAAAACCTTTG
1110	CAGTAGTGAAACGTGCAAGAGAGGAAAGATTCGAATGGATTTCTTTCAAGACCAATGATCGGGCCAT
1177	GACGAGTCTCTCGCTGGACGCACCTCGGTGCTTGGTGGCATGCCAGAGGAAGTGTAGCCAATGCG
1244	TTCCAGATCTCAAGAGAAGATGCTAGGAAGATCAAGTTCAACAATCAGCAGACAACCTTTGACAAGTG
1311	GAGAGTCAAGCCACCACATGAGGGATGATGCTTAAATTTTAAAGTAATTTGAGCTGAGCTAGTGGTGA
1378	TTTAAAGCCGAATGCATGTGGTGTACGTACTATGTTTTTTGTTTTGCTTTGTAAGGGGGATAGGTAA
1445	TGAATAATAAAGGAGAGCTTGGATAGTCTCTGCTGTGAGAGGGGAGAAGAAAGCAGGGAGCAGAGAG
1512	CAGAGAGCTTGTATGTAGTTAAGTTAATATTACTACTACTACTACTACGATGTGAATGAACTCTTGA
1579	TGAGTTCTGTCCAATAAAAACTACTTTTCTACTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figura 10 - Sequência nucleotídica do gene que codifica para o alergénio Ana o 2 do caju (*Anacardium occidentale* allergen Ana o 2 mRNA, partial cds) (número de acesso GenBank: AF453947.1). Os *primers* estão assinalados a negrito e destacados a cinzento e a sonda está destacada a negrito e com sublinhado duplo.

Tabela 9 – *Primers* e sondas de hidrólise usadas neste estudo.

Espécie	Primers	Sequência (5'→3')	Gene	Fragmento	GenBank
<i>Anacardium occidentale</i>	Ana1-F	ATGAGCCGGAGAGGCCGAAGG	Ana o 1	157 pb	AF395894
	Ana1-R	TGTCAAGCTTTTCAAGCGGCCGGA			
	Ana2-F	CGAGGACAACAGGGGTGGCA	Ana o 2	140 pb	AF453947
	Ana2-R	TGTCACGCTGTCCCCATCGG			
	Ana2-P	FAM-TCAGAGCGAGCGTGGAAGTGAGAGTGAA-BHQ1			
	Ana3-F	AGGTACGTGAAGCAGGAGGTCCA	Ana o 3	144 pb	AY081853
	Ana3-R	TTGCTGCAGCTGCCTCACCATT			
	Ana3-P	FAM-AAGCTTGAGGGAATGCTGCCAGGAGTT-BHQ1			
	Eucariotas	EG-F	TCGATGGTAGGAATAGTGGCCTACT	18S rARN	109 pb
EG-R		TGCTGCCTTCTTTGGATGTGGTA			
EG-P		FAM-ACGGGTGACGGAGAATTAGGGTTTCGATTC-BHQ2			

PCR qualitativa

Foram desenvolvidos três ensaios de PCR qualitativa para a detecção de caju com alvo em cada um dos genes selecionados (Ana o 1, Ana o 2 e Ana o 3). Para tal, todas as reações foram otimizadas com os *primers* desenhados (Tabela 9). Preparou-se uma mistura reacional com 25 µL de volume final, na qual se juntaram os diferentes reagentes: água ultrapura (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), enzima SuperHot Taq Polymerase® (Genaxxon Bioscience, Ulm, Alemanha) com o respetivo tampão (Tris-HCl 670 mM, pH 8,8, (NH₄)₂SO₄ 160 mM, Tween 20, 0.1%) e MgCl₂, dNTP (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha), *primers* (Tabela 9) e extrato de ADN. As quantidades utilizadas de cada um dos componentes estão descritas na Tabela 10.

Tabela 10 - Componentes das misturas de PCR qualitativa usados com os diferentes pares de *primers*

Reagentes	<i>Primers</i>			
	Ana1-F/Ana1-R	Ana2-F/Ana2-R	Ana3-F/Ana3-R	EG-F/EG-R
Água ultrapura (µL)	14,2	13,7	14,9	13,9
Tampão (10x) (µL)	2,5	2,5	2,5	2,5
MgCl ₂ (25 mM) (µL)	2,5	3,0	2,0	3,0
dNTP (2,5 mM) (µL)	2,0	2,0	2,0	2,0
<i>Primer F</i> (10 mM) (µL)	0,8	0,8	0,7	0,7
<i>Primer R</i> (10 mM) (µL)	0,8	0,8	0,7	0,7
Taq Polimerase (µL)	0,2	0,2	0,2	0,2
Extrato ADN (µL)	2,0	2,0	2,0	2,0
Volume total (µL)	25	25	25	25

Na preparação de cada um dos ensaios, incluiu-se um controlo negativo que serviu para verificação de eventuais contaminações durante a realização da PCR. Neste controlo, substituiu-se o extrato de ADN pelo mesmo volume de água ultrapura. As reações foram realizadas com recurso a dois termocicladores disponíveis no laboratório: MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler (BioRad Laboratories, Hercules, CA, EUA) e Simpli Amp Thermal Cycler (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA) de acordo com diferentes condições de temperatura e tempo para os diferentes pares de *primers* usados (Tabela 11).

Tabela 11 - Condições de temperaturas utilizadas nas amplificações por PCR qualitativa com os diferentes pares de *primers*.

Primers	Ana1-F/ Ana1-R		Ana2-F/ Ana2-R		Ana-3F/ Ana3-R		EG-F/ EG-R	
	Temperatura	Tempo	Temperatura	Tempo	Temperatura	Tempo	Temperatura	Tempo
Desnaturação	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
Amplificação	65°C	30 s	62°C	30 s	64°C	30 s	63°C	30 s
	72°C	30 s	72°C	30 s	72°C	30 s	72°C	30 s
Nº de ciclos	40		40		40		35	
Extensão	72°C	5 min	72°C	5 min	72°C	5 min	72°C	5 min

Os fragmentos amplificados por PCR qualitativa foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% com tampão SGTB 1x (GriSP Research Solutions, Porto, Portugal) corado com Gel Red 1x (Biotium, Hayward, CA, EUA) durante 25 a 30 minutos com uma tensão de 200 V. Estes foram expostos a um transiluminador com luz UV para poderem ser visualizados com um sistema fotográfico Gel Doc EZ Imager (BioRad Laboratories, Hercules, CA, EUA) e processado com o software Image Lab software version 5.1 (BioRad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Para a visualização das bandas, 20 µL de cada produto de PCR foram misturados com 4 µL de corante de carregamento com azul de bromofenol. Este foi usado do mesmo modo para corar os 2 µL de marcador molecular de ADN (100 pb) (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha).

PCR em tempo real

Foram desenvolvidos três sistemas de PCR em tempo real com recurso a um corante universal (EvaGreen) com alvo em cada um dos genes (Ana o 1, Ana o 2 e Ana o 3). Em cada sistema, as condições foram otimizadas com misturas reacionais que estão descritas na Tabela 12, num volume total de 20 µL contendo água ultrapura (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), *SsoFast™ EvaGreen® Supermix* (1x) (BioRad

Laboratories, Hercules, CA, EUA), *primers* e extrato de ADN. Cada ensaio foi realizado em duplicado com cada mistura modelo sendo amplificada em quadruplicado ($n=4$).

Tabela 12 - Componentes das misturas de PCR em tempo real com EvaGreen, com os *primers* Ana 1-F/R e Ana 2-F/R

Reagentes	Primers		
	Ana1-F/Ana1-R	Ana2-F/Ana2-R	Ana3-F/Ana3-R
Água ultrapura (µL)	6,4	6,4	6,6
SsoFast™ EvaGreen® Supermix (2x) (µL)	10	10	10
Primer F (10mM) (µL)	0,8	0,8	0,7
Primer R (10mM) (µL)	0,8	0,8	0,7
Extrato ADN (µL)	2,0	2,0	2,0
Volume total (µL)	20	20	20

As condições de temperatura e tempo para cada sistema estão definidas nas Tabela 13. Incluiu-se em cada ensaio um controlo negativo em que o extrato ADN foi substituído pelo mesmo volume de água ultrapura. Procedeu-se, após amplificação, em seguida, à aquisição de sinal para análise da temperatura de *melting*.

Tabela 13 - Condições de temperaturas utilizadas nas amplificações por PCR em tempo real com EvaGreen com os diferentes pares de *primers*

Primers	Ana1F/R		Ana2F/R		Ana3F/R	
	Temperatura	Tempo	Temperatura	Tempo	Temperatura	Tempo
Desnaturação	95°C	5 min	95°C	5 min	95°C	5 min
	95°C	10 s	95°C	10 s	95°C	10 s
Amplificação	65°C	40 s	62°C	15 s	65°C	40 s
Extensão			72°C	25 s		
Nº de ciclos	50		50		50	
Curva de <i>melting</i>	95°C	1 min	95°C	1 min	95°C	1 min
	70°C	3 min	70°C	3 min	70°C	3 min
	70-95°C	0,2°C/10 s	70-95°C	0,2°C/10 s	70-95°C	0,2°C/10 s

Foram também desenvolvidos dois sistemas de PCR em tempo real com recurso a sondas de hidrólise com alvo em dois genes (Ana o 2 e Ana o 3). Em cada sistema, as condições foram otimizadas com misturas reacionais que estão descritas na Tabela 14, num volume total de 20 µL contendo: água ultrapura (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), SsoFast™ Probes Supermix (2x) (BioRad Laboratories, Hercules, CA, EUA), primers (Ana2-F/Ana2-R ou Ana3-F/Ana3-R), sondas de hidrólise (Ana2-P ou Ana3-P) (Tabela 9) e extrato de ADN. As reações foram efetuadas sem a aplicação da análise de temperatura de *melting*.

Tabela 14 - Componentes das misturas de PCR em tempo real com sondas específicas utilizando os *primers* Ana2-F/Ana2-R, Ana3-F/Ana3-R e EG-F/EG-R.

Reagentes	Primers		
	Ana2-F/R e Ana2-P	Ana3-F/R e Ana3-P	EG-F/R e EG-P
Água ultrapura (µL)	5,9	6,2	6,2
SsoFast™ Probes Supermix (2x) (µL)	10	10	10
Primer F (10 mM) (µL)	0,8	0,7	0,7
Primer R (10 mM) (µL)	0,8	0,7	0,7
Sonda (10 mM) (µL)	0,5	0,4	0,4
Extrato ADN (µL)	2,0	2,0	2,0
Volume total (µL)	20	20	20

As reações decorreram num termociclador CFX96 Real-time PCR System (BioRad Laboratories, Hercules, CA, EUA) com os programas de tempo e temperaturas representados na Tabela 15. A detecção do sinal de fluorescência emitido foi efetuada no final de cada ciclo e processado com o *software* Bio-Rad CFX Manager 3.1 (BioRad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

Tabela 15 - Condições utilizadas nas amplificações por PCR em tempo real com sondas específicas utilizando diferentes *primers*.

Primers/Sonda	Ana2-F/R e Ana2-P		Ana-3F/R e Ana3-P	
	Temperatura	Tempo	Temperatura	Tempo
Desnaturação	95°C	5 min	95°C	5 min
	95°C	10 s	95°C	15 s
Amplificação	62°C	15 s	65°C	45 s
Extensão	72°C	25 s		
Nº de ciclos	55		55	

Com o objetivo de se proceder à quantificação normalizada do caju, usaram-se *primers* e sonda com alvo num gene eucariota universal (18S rARN) (Tabela 9) cujas condições estão descritas nas Tabelas 14 e 15. Dado que os dois sistemas de PCR em tempo real com alvos no Ana o 2 ou no Ana o 3 foram normalizados, a amplificação do gene eucariota universal processou-se em paralelo com a amplificação do gene específico (Ana o 2 ou Ana o 3) na mesma reação. Cada sistema foi testado pelo menos em duplicado, com $n=2$ e $n=4$ replicados para o gene eucariota e gene específico, respetivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação da qualidade dos extratos de ADN

Pureza e rendimento dos extratos

As misturas modelo de caju em massa (PCM), de caju em farinha de trigo (PCW), assim como as misturas modelo de massas e respectivos biscoitos de caju (BC e BCM) foram extraídas com o *kit* comercial Nucleospin Food. O método foi igualmente testado com recurso ao uso de RNase, o que demonstrou algumas diferenças de rendimento e de purezas que se podem verificar nas tabelas abaixo. Relativamente às amostras PCM (Tabelas 16 e 17), com a adição de RNase, verificaram-se rendimentos entre os 90 e os 250 ng/ μ L de ADN com purezas entre 2,0 e 1,9, estando de acordo com os valores de referência (1,8-2,0) para extratos de ADN com elevada qualidade. Nos extratos em que a RNase não foi utilizada, os rendimentos foram muito superiores (650-1200 ng/ μ L) com purezas de 2,2. Os extratos das misturas modelo de caju em trigo (PCW) foram obtidos sem uso de RNase, apresentando rendimentos entre os 290 a 556 ng/ μ L com purezas de 2,1-2,2 (Tabela 18).

Tabela 16 - Concentrações de ADN e respetivas purezas dos extratos das misturas modelo de caju em massa (PCM) com uso de RNase.

Misturas modelo	Concentração (ng/ μ L)	Pureza (A_{260}/A_{280})
PCM0	204,0	2,0
PCM50	169,0	2,0
PCM10	143,0	2,0
PCM8	178,8	2,0
PCM5	205,1	2,0
PCM4	111,3	2,0
PCM2,5	118,3	2,0
PCM1	90,8	1,9
PCM0,5	107,3	2,0
PCM0,25	140,5	2,0
PCM0,1	200,8	1,9
PCM0,05	85,7	1,9
PCM0,01	102,0	1,9
PCM0,005	103,2	2,0
PCM0,001	97,4	1,9
PCM0,0005	102,5	2,0
PCM0,0001	248,2	2,0

Tabela 17 Concentrações de ADN e respectivas purezas dos extratos de caju cru e das misturas modelo de caju em massa (PCM) obtidos com e sem o uso de RNase.

Misturas modelo	Extração com RNase		Extração sem RNase	
	Concentração (ng/μL)	Pureza (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)	Concentração (ng/μL)	Pureza (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)
Caju	65,1	1,9	1046,6	2,2
PCM0	219,0	2,0	702,2	2,2
PCM10	243,0	2,0	1154,7	2,2
PCM1	184,3	2,0	720,4	2,2
PCM0,1	179,2	2,0	814,7	2,2
PCM0,05	161,5	2,0	736,3	2,2
PCM0,01	226,0	2,0	688,1	2,2
PCM0,005	190,1	2,0	692,7	2,2
PCM0,001	167,6	2,0	663,6	2,2
PCM0,0005	183,0	2,0	684,4	2,2
PCM0,0001	236,4	2,0	702,9	2,2

Tabela 18 - Concentrações de ADN e respectivas purezas dos extratos das misturas modelo de caju em farinha de trigo (PCW) obtidos sem o uso de RNase.

Misturas modelo	Concentração (ng/μL)	Pureza (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)
PCW0	400,5	2,1
PCW12	311,0	2,1
PCW11	365,1	2,1
PCW10	371,0	2,1
PCW9	343,9	2,1
PCW8	435,7	2,1
PCW7	362,1	2,1
PCW6	400,0	2,1
PCW5	292,7	2,1
PCW4	322,6	2,2
PCW3	406,0	2,1
PCW2	420,7	2,2
VALIDAÇÃO		
PCW13	497,3	2,1
PCW14	555,2	2,1
PCW15	420,2	2,1
PCW16	333,7	2,1

Quanto às misturas modelo de biscoitos de caju, a extração foi efetuada sem uso de RNase. As concentrações dos extratos das massas modelo para biscoitos de caju (não processados) (BCM) foram superiores (194,9-355,9 ng/μL) às apresentadas pelos extratos dos biscoitos cozidos (BC) (121,9-250,0 ng/μL), mas com purezas semelhantes (2,0-2,1) (Tabela 19).

Tabela 19 – Concentração de ADN e respetivas purezas dos extratos das massas modelo para biscoitos de caju (BCM) e respetivos biscoitos (BC)

Misturas Modelo	Concentração (ng/μL)	Pureza (A_{260}/A_{280})	Misturas Modelo	Concentração (ng/μL)	Pureza (A_{260}/A_{280})
BC0	150,7	2,0	BCM0	249,2	2,1
BC1	219,5	2,0	BCM1	296,6	2,1
BC2	193,7	2,0	BCM2	291,2	2,1
BC3	147,7	1,9	BCM3	207,8	2,0
BC4	121,9	2,0	BCM4	274,1	2,0
BC5	148,7	2,0	BCM5	234,9	2,0
BC6	181,1	2,0	BCM6	338,1	2,1
BC7	159,3	2,0	BCM7	194,9	2,0
BC8	155,9	2,0	BCM8	223,1	2,0
BC9	179,1	2,0	BCM9	253,6	2,0
BC10	197,5	2,0	BCM10	312,8	2,1
VALIDAÇÃO					
BC12	183,6	2,0	BCM12	286,4	2,1
BC13	250,0	2,0	BCM13	327,0	2,1
BC14	147,7	2,0	BCM14	355,9	2,0
BC15	132,3	2,0	BCM15	256,9	2,0

Para a avaliação da especificidade dos conjuntos de *primers*, diferentes espécies de plantas foram extraídas com os *kits* comerciais Nucleospin Food ou Nucleospin Plant II. Os extratos de plantas medicinais (códigos EM) apresentaram purezas entre os 1,4-1,9 e concentrações de ADN inferiores a 100 ng/μL (Tabela 20). Em geral, as outras amostras de plantas e alimentos evidenciaram purezas (1,9-2,2) e rendimentos elevados (126,7-3640,2 ng/μL) com a exceção da ameixa preta (AN50), do alperce (AN53) e do amido de milho (AN132). Verificaram-se, igualmente para estas amostras, rendimentos e purezas baixos, semelhantes aos obtidos com as plantas medicinais (67,7; 24,4 e 3,2 ng/μL). De notar que o extrato de pêssigo também apresentou baixo rendimento (4,6 ng/μL), mas pureza elevada (1,9). A diferença entre os valores dos rendimentos para as amostras de plantas e alimentos poderá estar associada ao processo da extração do ADN, à natureza dos tecidos e/ou à potencial presença de compostos que inibam o isolamento do ADN (Tabela 20). A integridade e a capacidade de amplificação de todos os extratos foram posteriormente avaliados por eletroforese em gel de agarose e por amplificação de região eucariota universal, respetivamente. Todos os extratos foram diluídos para as concentrações de 50 ou 10 ng/μL (no caso das plantas medicinais EM), quando possível.

Tabela 20 - Concentração de ADN e respectivas purezas dos extratos das amostras utilizadas na avaliação da especificidade dos *primers* (reatividade cruzada).

Amostra	Concentração (ng/μL)	Pureza (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)	Amostra	Concentração (ng/μL)	Pureza (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)
AN03	290,5	2,2	AN98	320,9	2,2
AN36	625,1	2,2	AN99	164,9	2,2
AN37	677,1	2,2	AN118	126,7	2,1
AN38	1496,9	2,2	AN119	208,9	2,2
AN40	374,0	2,0	AN132	3,2	2,6
AN41	289,6	2,1	AN144	81,6	2,1
AN43	4,6	1,9	C4.2	1115,4	2,2
AN44	524,7	2,1	PHP0	609,5	2,1
AN46	1978,5	2,2	WR0	1682,7	2,3
AN49	458,4	2,2	WM0	474,4	2,2
AN50	67,7	1,1	EM21	73,0	1,9
AN53	24,4	1,7	EM29	112,0	1,8
AN55	900,7	2,2	EM32	9,5	1,4
AN56	429,5	2,1	EM33	30,8	1,8
AN57	422,3	2,2	EM35	19,5	1,5
AN60	731,8	2,2	EM39	17,3	1,6
AN61	380,0	2,1	EM44	52,1	1,5
AN62	239,4	2,2	EM46	74,4	1,5
AN63	3640,2	2,1	EM47	36,9	1,9
AN76	469,8	2,2	H. and	45,7	1,8
AN78	355,8	2,2			

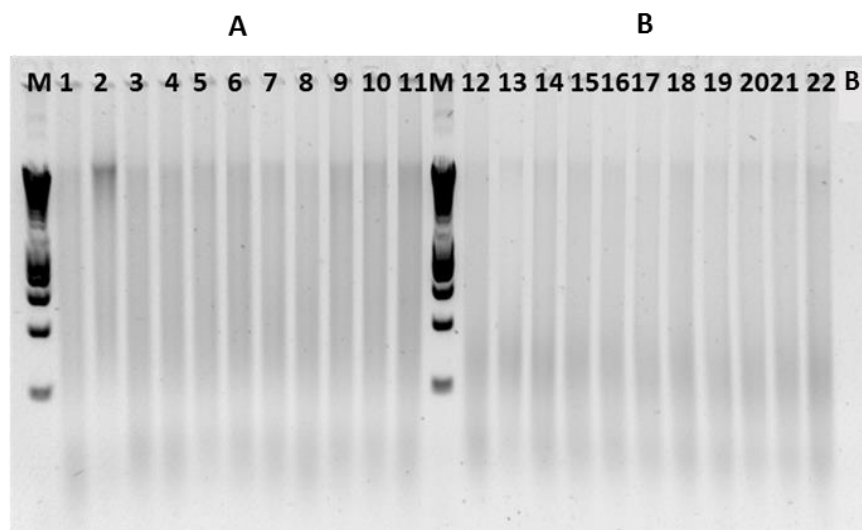


Figura 11 - Gel de agarose da eletroforese genômica dos extratos das misturas modelo de caju em massa (PCM) extraídos com (A) e sem (B) RNase. M: marcador Hyperladder I 10 kB (Bioline, Londres, Reino Unido); 1,12: 0%; 2,13: 100%; 3,14: 10%; 4,15: 1%; 5,16: 0,1%; 6,17: 0,05%; 7,18: 0,01%; 8-19: 0,005%; 9,20: 0,001%; 10,21: 0,0005%; 11,22: 0,0001%; B: branco de extração.

Avaliação da integridade ADN

Para avaliar a integridade dos extratos de ADN, estes foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%. Na Figura 11, apresentam-se os resultados das misturas modelo de caju em massa (PCM) extraídas com e sem RNase, onde se podem observar bandas com alguma intensidade na região de 10 kb, o que indica a presença de ADN íntegro e de elevado peso molecular. Na Figura 12, observa-se a presença de material de elevado peso molecular (10 kb) com arrastamentos intensos, indicando a presença de algum material genético degradado.

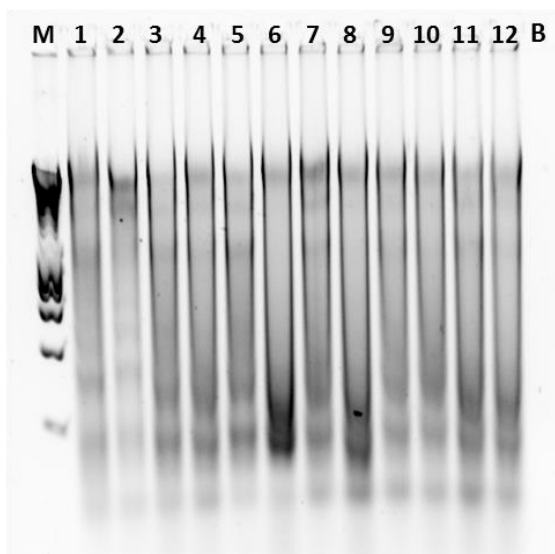


Figura 12 - Gel de agarose da eletroforese genómica dos extratos das misturas modelo caju em farinha de trigo (PCW). M: marcador Hyperladder I 10 kb (Bioline, Londres, Reino Unido); 1-11: 0,0001%-10%; 12: 0%; B: branco de extração.

Capacidade de amplificação

Para eliminar a presença de falsos negativos, todos os extratos foram amplificados por PCR qualitativa com recurso a *primers* com alvo numa região eucariota universal (18S rARN). As figuras 13 a 15 representam as PCR qualitativas para a região eucariota universal de todos os extratos utilizados neste estudo e que correspondem às misturas modelo de caju em massa (PCM), caju em farinha de trigo (PCW), massas (BCM) e respetivos biscoitos de caju (BC) e às espécies usadas para avaliação da especificidade dos *primers* (reatividade cruzada).

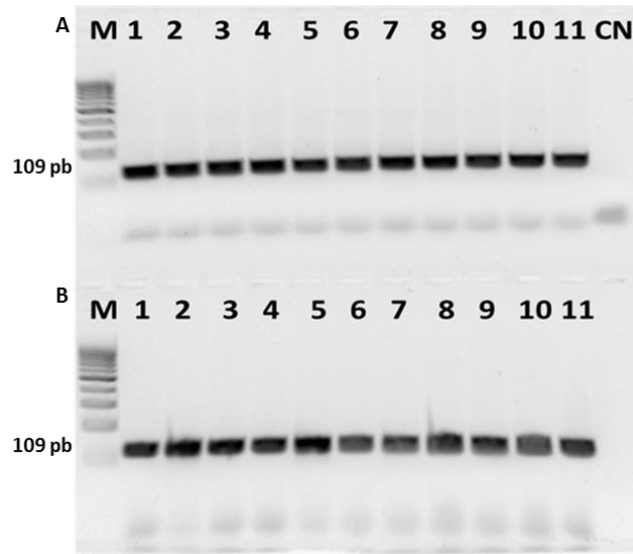


Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com *primers* EG-F/EG-R para os extratos das misturas modelo de caju em massa (PCM) extraídos com (A) e sem (B) RNAse. M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1: 0%; 2: 100%; 3-11: 10%; 1%; 0,1%; 0,01%; 0,005%; 0,001%; 0,0005%; 0,0001%; CN: controlo negativo:

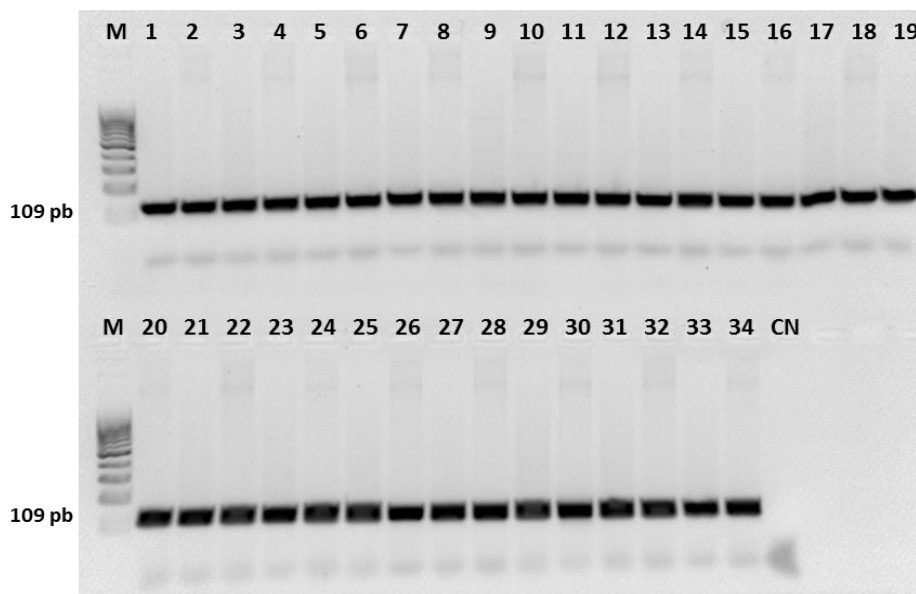


Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* EG-F/EG-R dos extratos das misturas modelo de biscoitos de caju (BC, linhas 1-16) e não processados (BCM, linhas 18-34). M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1,18: 0%; 2,19: 0,0001%; 3,20: 0,0005%; 4,21: 0,001%; 5,22: 0,005%; 6,23: 0,01%; 7,24: 0,05%; 8,25: 0,1%; 9,26: 0,2%; 10,27: 0,5%; 11,28: 1%; 12,29: 2%; 13,30: 4%; 14,31: 5%; 15,32: 8%; 16,33: 10%; 17,34: 100% caju (controlo positivo); CN: controlo negativo.

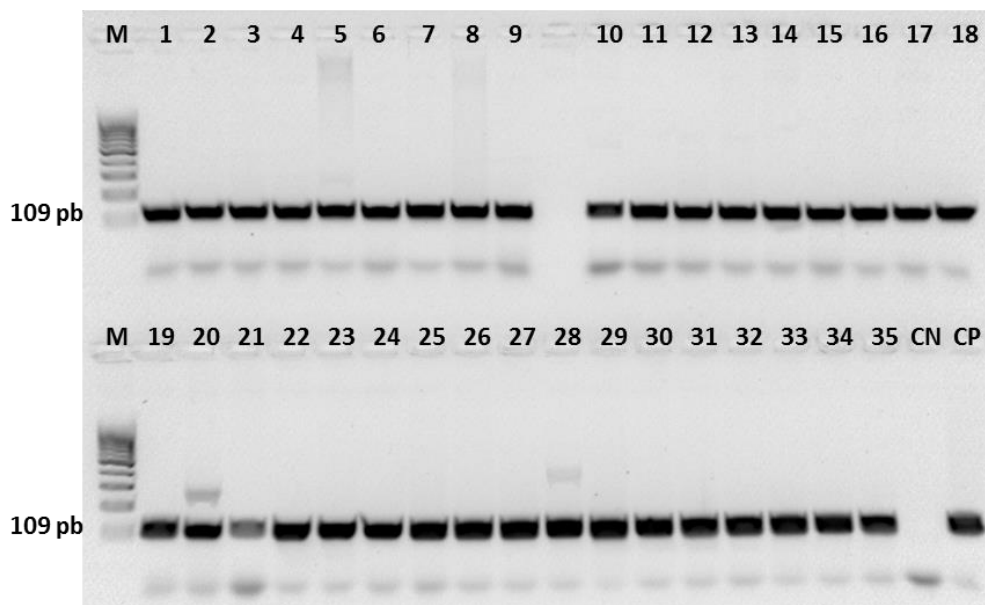


Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* EG-F/EG-R dos extratos das amostras usadas na reatividade cruzada. M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1: Noz macadâmia; 2: Pistácio; 3: Amendoim torrado; 4: Favas fritas; 5: Pinhão; 6: Castanha; 7: Pêssegos; 8: Farinha de trigo; 9: Arroz; 10: Noz; 11: Tremoço; 12: Aveia; 13: Cevada; 14: Centeio; 15: Soja; 16: Castanha do Brasil; 17: Milho; 18: Pevide torrada; 19: Alperce; 20: Colza; 21: Girassol; 22: Amêndoa; 23: Tomate-cereja; 24: Avelã; 25: Massa; 26: Erva-príncipe; 27: Hortelã-pimenta; 28: Malva; 29: Sene; 30: Tília; 31: Passiflora; 32: Cardo Mariano; 33: Manjeriço; 34: Coentros; 35: Hipericão-do-gerês; CN: controlo negativo; CP: controlo positivo (caju cru).

Deteção de caju por PCR qualitativa

A eficiência dos *primers* desenhados foi testada por PCR qualitativa otimizando as condições de temperatura de hibridação e concentrações do cofator da enzima (Mg^{2+}) e dos *primers*. Estes fatores foram testados em extratos diluídos para 50 ng/ μ L de ADN das misturas modelo de caju em massa (PCM). As condições finais dos ensaios estão resumidas nas tabelas 10 e 11. Com o fim de avaliar a especificidade dos *primers*, testaram-se várias amostras de alimentos vegetais conhecidos por terem reatividade cruzada com o caju ou envolvidos em géneros alimentícios e receitas que o envolvam (Tabela 8). Por fim, a sensibilidade absoluta e relativa foi determinada para cada sistema.

Ana o 1

Otimização do método com *primers* Ana1-F/Ana1-R

Para a otimização da técnica de PCR com alvo no gene Ana o 1 foram avaliados vários parâmetros, sendo um deles a determinação da temperatura de hibridação ótima dos *primers*. Desta forma, cinco extratos de diluição seriada 1/10 (100,000-10 pg) de ADN de caju foram amplificados com três temperaturas de hibridação diferentes (60, 62 e 64°C). A PCR realizada com maior temperatura de hibridação permitiu a produção de fragmentos mais intensos até à diluição de 10 pg de ADN de caju (Figura 16).

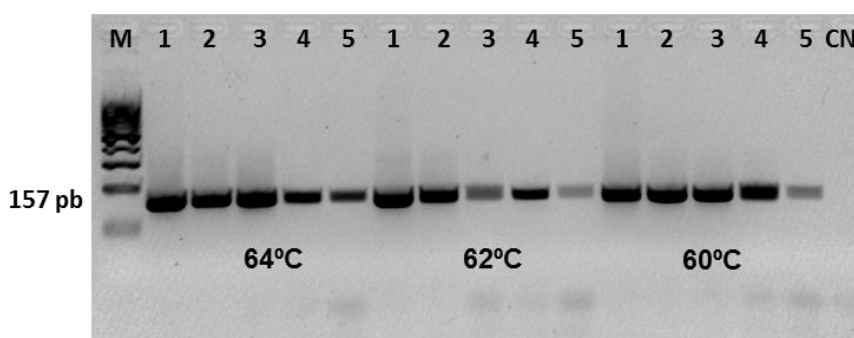


Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Ana1-F/Ana1-R com 3 mM de Mg^{2+} das diluições seriadas do extrato de ADN de caju. M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1-5: 100.000, 10.000, 1.000, 100 e 10 pg de ADN de caju.

Dado que a temperaturas mais altas, a reação parece ser favorecida, procedeu-se à amplificação dos extratos das misturas modelo de caju em massa à temperatura de hibridação de 65°C com duas concentrações de magnésio (2,0 e 3,0 mM) (Figura 17).

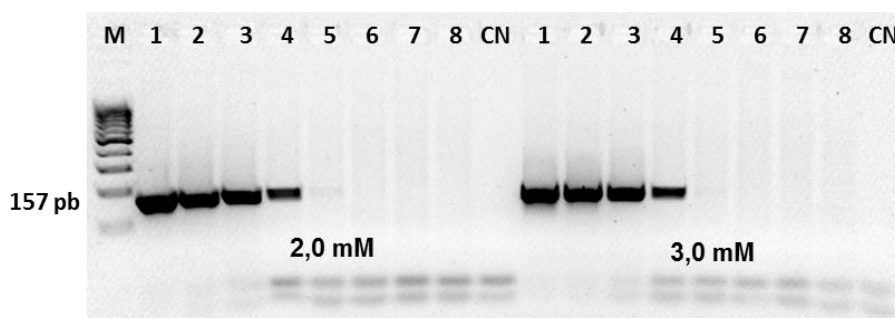


Figura 17 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR dos extratos das misturas de caju em massa (PCM) com os *primers* Ana1-F/Ana1-R a 65°C usando 2,0 mM e 3,0 mM de Mg^{2+} . M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1-7: 100%, 10%; 1%; 0,1%; 0,01%; 0,001%; 0,0001%; 8: 0%; CN: controlo negativo.

Verificou-se que as bandas tinham maior resolução com 3,0 mM de Mg^{2+} , permitindo a amplificação do caju até 0,1% (1.000 mg/kg) em massa. No entanto, na reação com 2,0 mM de magnésio parece haver uma banda ténue à concentração de 0.01% de caju em massa, decidindo-se otimizar a PCR para a concentração de 2.5 mM de magnésio.

Reatividade Cruzada

Para avaliar a especificidade dos *primers* Ana1-F/Ana1-R procedeu-se à PCR dos extratos das amostras das diferentes espécies de plantas e alimentos. Todas as espécies testadas não amplificaram em presença do *primers* Ana1-F/Ana1-R (Figura 18), à exceção da amostra de farinha de arroz (Figuras 19). No entanto, dado que apresentou uma banda muito ténue, esta não foi considerada como reatividade cruzada. Desta forma, os *primers* Ana1-F/Ana1-R foram considerados específicos para o alvo caju.

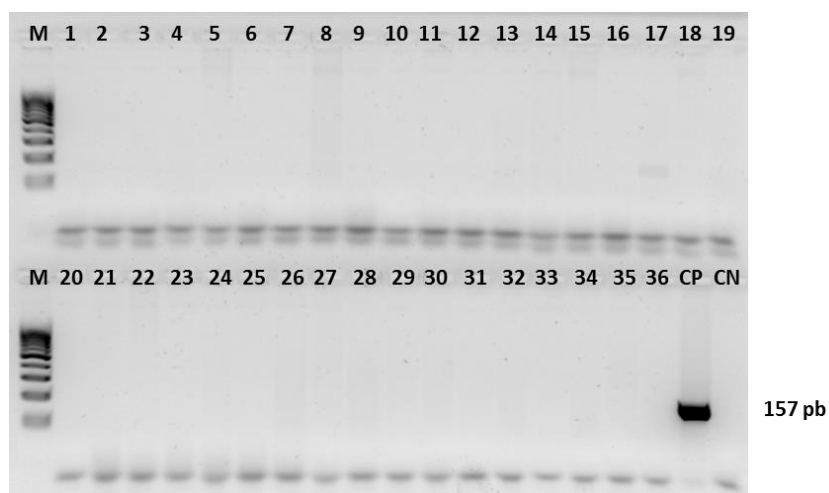


Figura 18 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os primers Ana1-F/Ana1-R dos extratos das amostras de reatividade cruzada. M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1: Noz macadâmia; 2: Pistácio; 3: Amendoim torrado; 4: Favas fritas; 5: Pinhão; 6: Castanha; 7: Pêssego; 8: Farinha de trigo; 9: Arroz; 10: Ameixa preta; 11: Noz; 12: Tremoço; 13: Aveia; 14: Cevada; 15: Centeio; 16: Soja; 17: Castanha do Brasil; 18: Milho; 19: Pevide torrada; 20: Alperce; 21: Colza; 22: Girassol; 23: Amêndoa; 24: Tomate cereja; 25: Avelã; 26: Massa; 27: Erva-príncipe; 28: Hortelã-pimenta; 29: Malva; 30: Sene; 31: Tília; 32: Passiflora; 33: Cardo Mariano; 34: Manjeriçã; 35: Coentros; 36: Hipericão-do-gerês; CP: controlo positivo (caju cru); CN: controlo negativo.

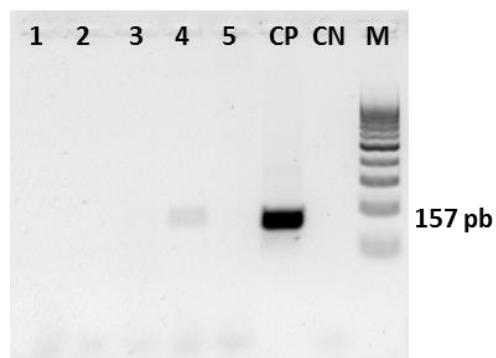


Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os primers Ana1-F/Ana1-R dos extratos das amostras de reatividade cruzada. 1: Noz pecan; 2: Farinha maizena; 3: Pão ralado; 4: Farinha de arroz; 5: Farinha de milho; M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); CP: controlo positivo (caju cru); CN: controlo negativo.

Sensibilidade absoluta e relativa

Utilizando-se as condições otimizadas para a PCR com os *primers* Ana1-F/Ana1-R foram estabelecidos as sensibilidades dos ensaios. A sensibilidade absoluta foi determinada com sete diluições seriadas (100.000-0,1 pg) de ADN de caju, permitindo a sua amplificação até 1 pg (Figura 20).

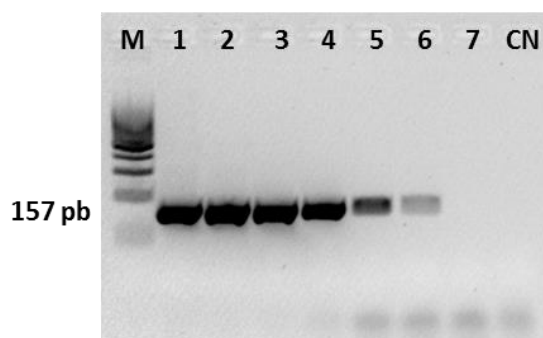


Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Ana1-F/Ana1-R das diluições seriadas do extrato de ADN de caju. M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1-7: 100.000, 10.000, 1.000, 100, 10, 1 e 0,1 pg de ADN de caju; CN: controlo negativo.

Para a determinação sensibilidade relativa foram amplificados os extratos das misturas modelo de caju em massa (PCR) extraídas com e sem RNase com a concentração de 50 ng/μL. Em ambos os conjuntos foi atingido o valor de 0.05% (500 mg/kg) de caju em massa (Figura 21).

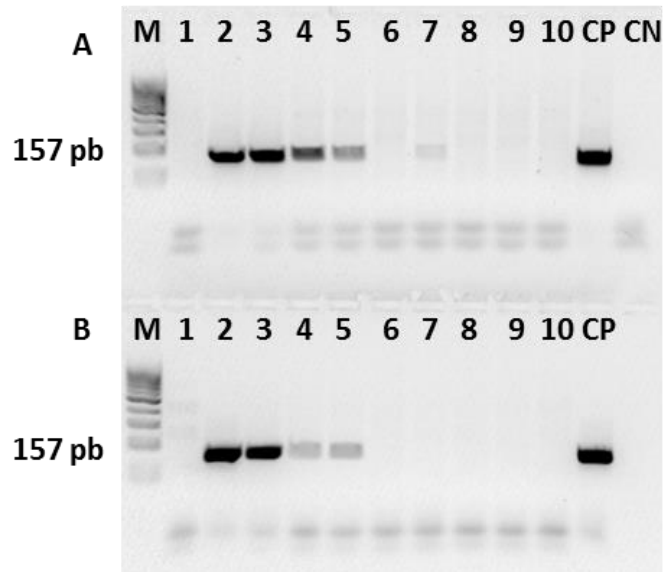


Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Ana1-F/Ana1-R dos extratos das misturas modelo de caju em massa (PCM) extraídos com (A) e sem (B) RNase (diluídos a 50 ng/μL). M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1: 0%; 2-10: 10%; 1%; 0,1%; 0,05%; 0,01%; 0,005%; 0,001%; 0,0005%; 0,0001%; CP: controlo positivo; CN: controlo negativo.

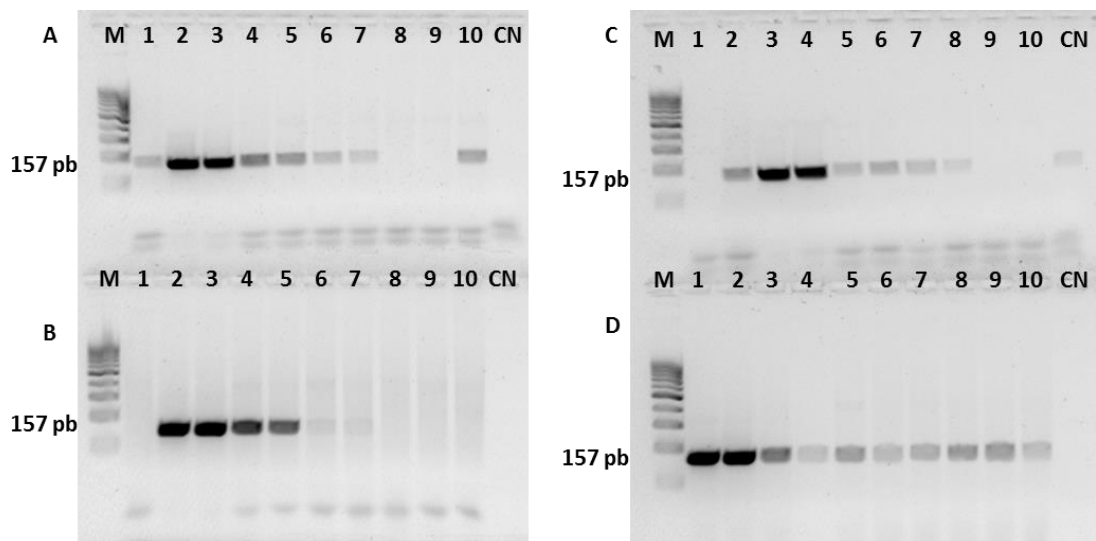


Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Ana1-F/Ana1-R das misturas modelo de caju em massa (PCM) extraídos com (A, B) e sem (C, D) RNase com diluição de 20 ng/μL (A, C) e 100 ng/μL (B, D). M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1: 0%; 2-10: 10%; 1%; 0,1%; 0,05%; 0,01%; 0,005%; 0,001%; 0,0005%; 0,0001%; CN: controlo negativo

Com o objetivo de aumentar a sensibilidade relativa, diferentes concentrações dos extratos das misturas de caju em massa foram testadas, nomeadamente a 20 e 100 ng/μL (Figura 22). No entanto, o valor manteve-se com as referidas concentrações.

Abaixo de 0,1% de caju em massa não há evidências de gradiente para o caso dos extratos diluídos a 100 ng/μL. Com os extratos a 20 ng/μL extraídos com RNase registou-se amplificação positiva até 0.005%, mas com amplificação positiva também para o 0% caju, logo este valor não pôde ser considerado. Desta forma, pode-se verificar que a sensibilidade absoluta e relativa para o caju foram de 1 pg e 0,05% (Figuras 20 e 21), respetivamente.

Ana o 2

Otimização do método com *primers* Ana2-F/Ana2-R

Tal como para o gene Ana o 1, na otimização da técnica de PCR com alvo no gene Ana o 2 foram avaliados vários parâmetros, nomeadamente a temperatura de hibridação ótima dos *primers*. Desta forma, extratos de misturas modelo de caju em massa (PCM) diluídos a 50 ng/μL foram amplificados com três temperaturas de hibridação diferentes (60, 62 e 64°C) com 2,0 mM de magnésio (Tabela 11). A PCR realizada com a temperatura de hibridação a 62°C permitiu a produção de fragmentos mais intensos até à concentração de 0,1% de caju em massa (Figura 23). A temperatura de hibridação foi definida para os 62°C e visando aumentar a sensibilidade do método, diferentes concentrações de magnésio foram testadas (2,0 e 3,0 mM). O aumento de magnésio disponível na reação pareceu aumentar a sensibilidade do método possibilitando a amplificação de 0,01% de caju em massa (Figura 24). De acordo com os resultados obtidos, a técnica de PCR com alvo no gene Ana o 2 foi otimizada com uma temperatura de 62°C e 3,0 mM de magnésio como cofator da enzima.

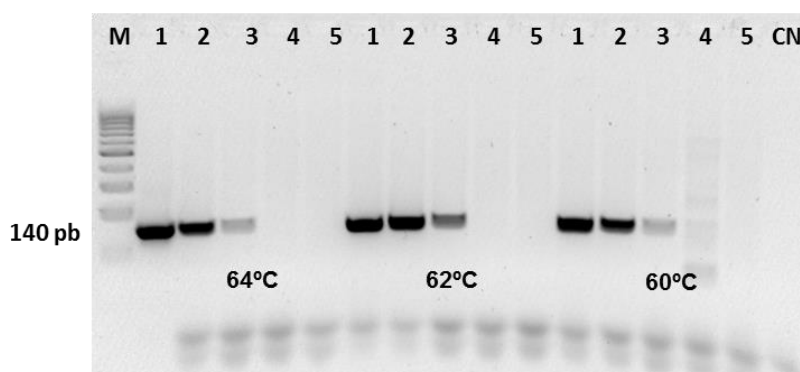


Figura 23 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Ana2-F/Ana2-R a diferentes temperaturas com 2,0 mM de Mg²⁺ dos extratos das misturas modelo de caju em massa (PCM) (diluídos a 50 ng/μL). M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1-5: 10%; 1%; 0,1%; 0,01%; 0,001%; CN: controlo negativo.

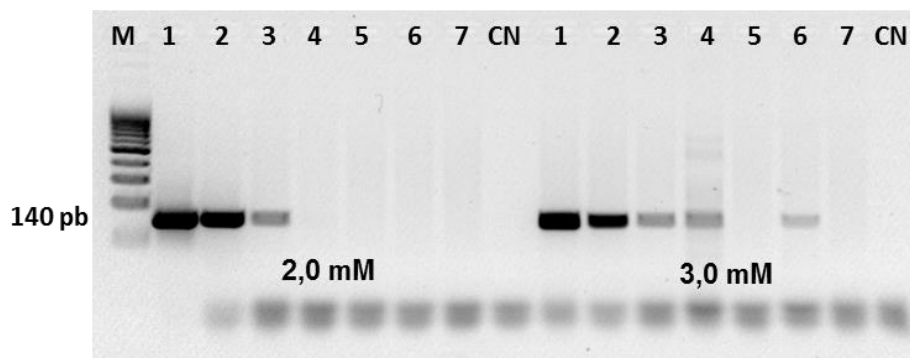


Figura 24 – Gel de agarose da eletroforese dos produtos de PCR usando os *primers* Ana2-F/Ana2-R a 62°C com 2,0 mM e 3,0 mM de Mg²⁺ dos extratos das misturas modelo de caju em massa (PCM) (diluídos a 50 ng/μL). M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1-6: 10%; 1%; 0,1%; 0,01%; 0,001%; 0,0001%; 7: 0%; CN: controlo negativo.

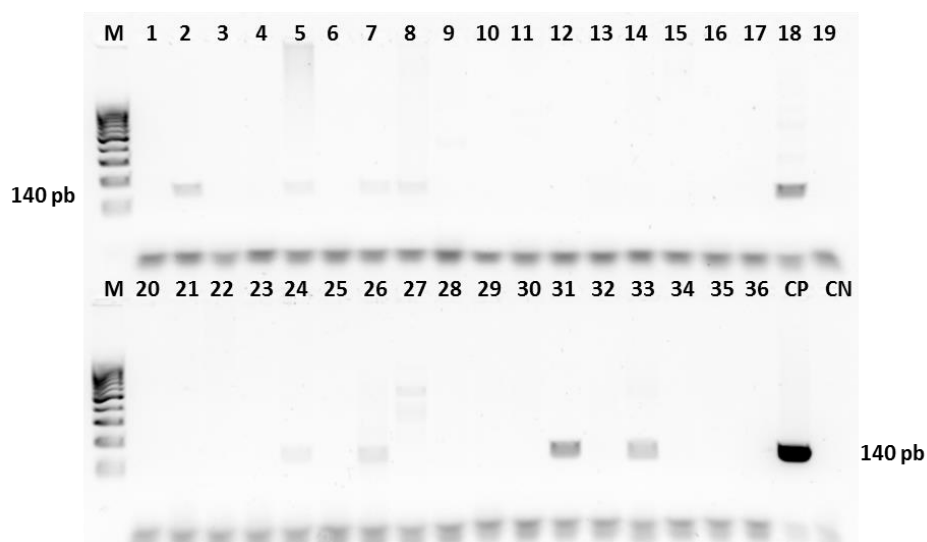


Figura 25 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Ana2-F/Ana2-R dos extratos das amostras de reatividade cruzada. M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1: Noz macadâmia; 2: Pistácio; 3: Amendoim torrado; 4: Favas fritas; 5: Pinhão; 6: Castanha; 7: Pêssego; 8: Farinha de trigo; 9: Arroz; 10: Ameixa preta; 11: Noz; 12: Tremoço; 13: Aveia; 14: Cevada; 15: Centeio; 16: Soja; 17: Castanha do Brasil; 18: Milho; 19: Pevide torrada; 20: Alperce; 21: Colza; 22: Girassol; 23: Amêndoa; 24: Tomate cereja; 25: Avelã; 26: Massa; 27: Erva-príncipe; 28: Hortelã-pimenta; 29: Malva; 30: Sene; 31: Tília; 32: Passiflora; 33: Cardo Mariano; 34: Manjeriçao; 35: Coentros; 36: Hiperiçao-do-gerês; CP: controlo positivo (caju cru); CN: controlo negativo.

Reatividade Cruzada

Quanto a avaliação da especificidade dos *primers* com alvo no gene Ana o 2, obtiveram-se ampliações não específicas em nove amostras: pistácio, pinhão, pêssegos, farinha de trigo, milho, tomate cereja, massa, tília e cardo mariano (Figura 25). Dada a fraca

intensidade das bandas foram feitas novas extrações destas 9 amostras de forma a eliminar potenciais contaminações nestas amostras. Após repetição do ensaio com os novos extratos (com amplificação prévia positiva para o gene eucariota 18S rARN), verificou-se que todas as bandas não específicas foram eliminadas, à exceção da amostra de pão ralado. No entanto, dada a fraca intensidade da banda do pão ralado, esta amostra não foi considerada como reatividade cruzada (Figura 26).



Figura 26 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Ana2-F/Ana2-R dos extratos das amostras de reatividade cruzada. M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1: Pistácio; 2: Pinhão; 3: Pêssegos; 4: Farinha de trigo; 5: Tomate cereja; 6: Castanha do Brasil; 7: Farinha maizena; 8: Pão ralado; 9: Massa; 10: Farinha de arroz; 11: Farinha de milho; CP: controlo positivo (caju cru); CN: controlo negativo.

Sensibilidade absoluta e relativa

Utilizando-se as condições otimizadas para a PCR com os *primers* Ana2-F/Ana2-R estabeleceu-se a sensibilidade absoluta e relativa. A sensibilidade absoluta foi determinada com sete diluições seriadas (100.000-0,1 pg) de ADN de caju, permitindo a sua amplificação até 1 pg (Figura 27). Com extratos das misturas modelo de caju em massa (PCM) diluídos a 50 ng/ μ L, obteve-se amplificação até ao nível de 0.01% (100 mg/kg) de caju em massa com os extratos obtidos com a adição de RNase (Figura 28).

Tal como no caso do sistema com alvo no Ana o 1, para o gene Ana o 2 foram também testados extratos com diferentes concentrações (20 e 100 ng/ μ L). Com os extratos de 100 ng/ μ L, a sensibilidade atingida foi de 0,005% (50 mg/kg) de caju em massa (PCM) dos extratos obtidos sem a adição de RNase. Na maioria das reações para amplificação do gene Ana o 2 é comum o aparecimento de bandas com diferentes tamanhos moleculares (bandas parecidas com arrastamento) nas amostras onde o alvo está em muito baixa concentração (por exemplo linhas 6-10, Figura 29 A, B).

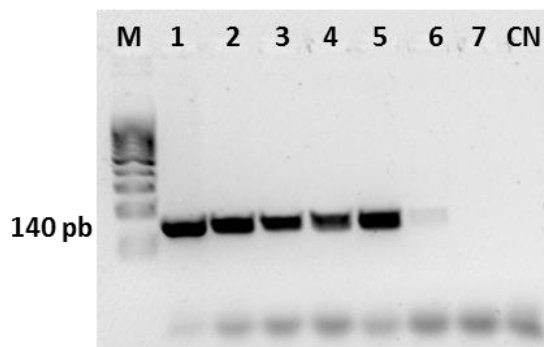


Figura 27 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Ana2-F/Ana2-R das diluições seriadas do extrato de ADN de caju. M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1-7: 100.000, 10.000, 1.000, 100, 10, 1 e 0,1 pg de ADN de caju; CN: controlo negativo.

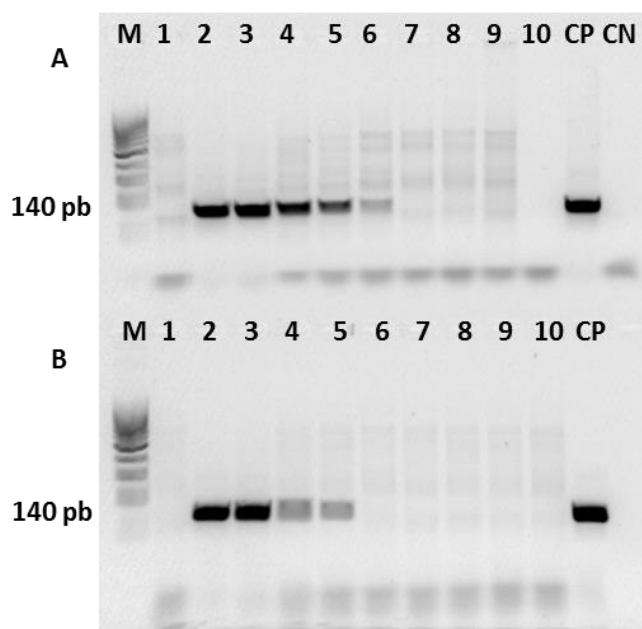


Figura 28 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Ana2-F/Ana2-R dos extratos das misturas modelo de caju em massa (PCM) extraídos com (A) e sem (B) RNase (diluídos a 50 ng/ μ L). M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1: 0%; 2-10: 10%; 1%; 0,1%; 0,05%; 0,01%; 0,005%; 0,001%; 0,0005%; 0,0001%; CP: controlo positivo; CN: controlo negativo.

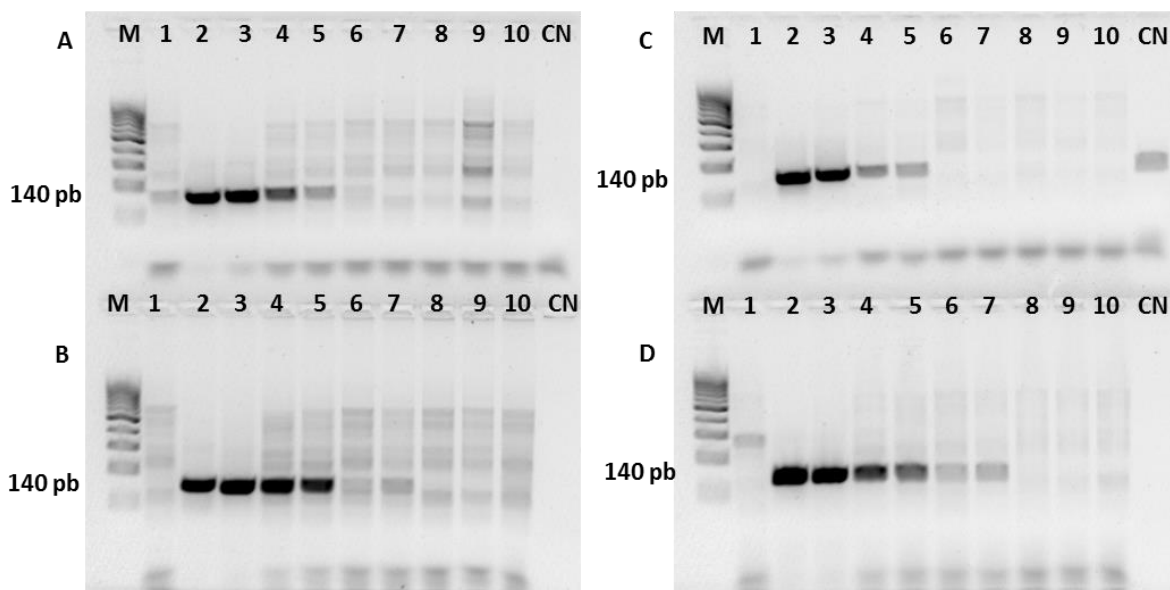


Figura 29 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Ana2-F/Ana2-R das misturas modelo de caju em massa (PCM) extraídos com (A, B) e sem (C,D) RNase com diluição de 20 ng/μL (A,C) e 100 ng/μL (B,D). M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1: 0%; 2-10: 10%; 1%; 0,1%; 0,05%; 0,01%; 0,005%; 0,001%; 0,0005%; 0,0001%; CN: controlo negativo.

Para avaliar o efeito de matriz, testaram-se as misturas modelo de caju em farinha de trigo (PCW). As mesmas bandas de arrastamento mantiveram-se para as concentrações menores de caju em farinha de trigo em extratos obtidos sem a adição de RNase. A sensibilidade atingida foi de 100 mg/kg de caju em farinha de trigo, considerando que a mistura com 50 mg/kg (linha 5, Figura 30) não foi testada.

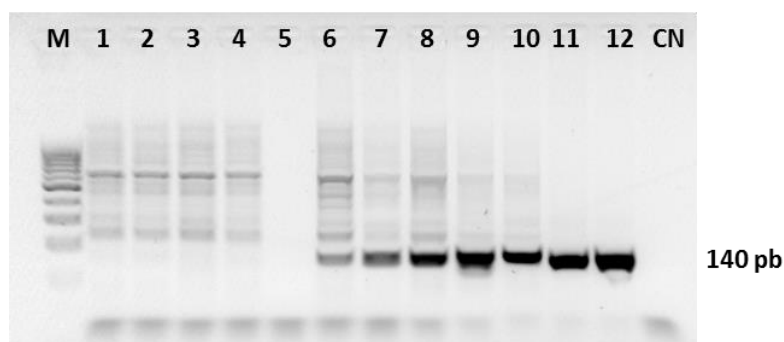


Figura 30 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Ana2-F/Ana2-R das misturas modelo de caju em farinha de trigo (PCW) (diluídos a 50 ng/μL). M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1: 0%; 2-12: 0,0001%; 0,0005%; 0,001%; 0,005%; 0,01%; 0,05%; 0,1%; 0,5%; 1%; 5%; 10% CN: Controlo Negativo

No caso das misturas modelo de biscoitos de caju, a sensibilidade relativa foi de 50 mg/kg em ambas as misturas de massas (A) e biscoitos (B) (linhas 7, Figura 31). Tal como nas matrizes anteriores (massa e farinha de trigo), verificaram-se bandas de arrastamento nas amostras com menor quantidade de ADN alvo (linhas 5-11, Figura 31).

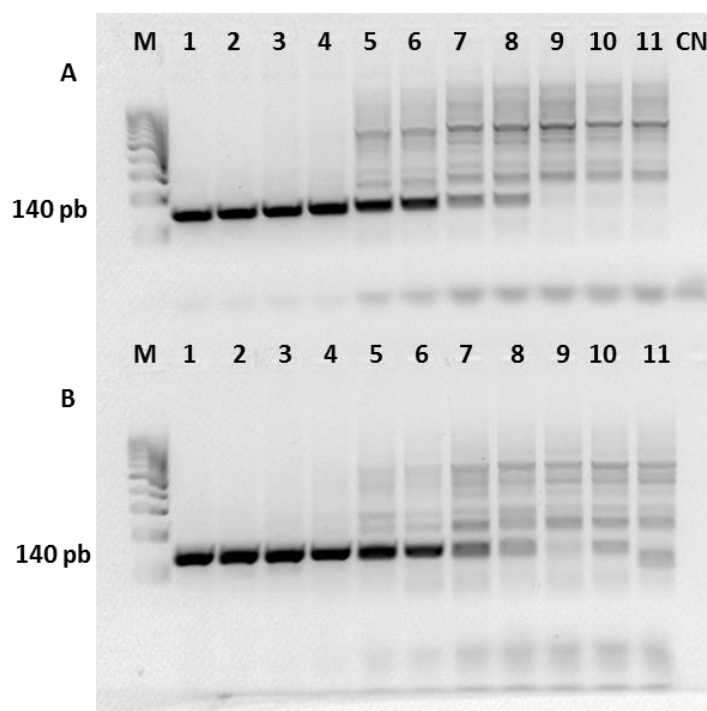


Figura 31 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Ana2-F/Ana2-R dos extratos das misturas modelo de massa (A) e respectivos biscoitos de caju (B). M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1-10: 10%; 5%; 1%; 0,5%; 0,1%; 0,05%; 0,01%; 0,005%; 0,001%; 0,0005%; 0,0001%; 11: 0%; CN: controlo negativo

Ana o 3

Otimização do método com *primers* Ana3-F/Ana3-R

Procedeu-se de modo idêntico aos genes anteriores à otimização do ensaio de PCR para o gene Ana o 3, testando diferentes temperaturas de hibridação e diferentes concentrações de magnésio. Os extratos de misturas modelo de caju em massa (PCM) diluídos a 50 ng/μL foram amplificados com três temperaturas de hibridação diferentes (60, 62 e 64°C) e 2,0 mM de magnésio (Tabela 11). A PCR realizada com a temperatura de hibridação a 64°C permitiu a produção de fragmentos mais intensos até à concentração de 0,01% de caju em massa (Figura 32). O aumento da concentração de magnésio para 3,0 mM à temperatura de hibridação ótima de 64°C não alterou a sensibilidade da técnica (Figura 33). Desta forma, as condições definidas para este

ensaio foram: temperatura de hibridação ótima de 64°C e concentração de magnésio de 2,0 mM como cofator para a enzima.

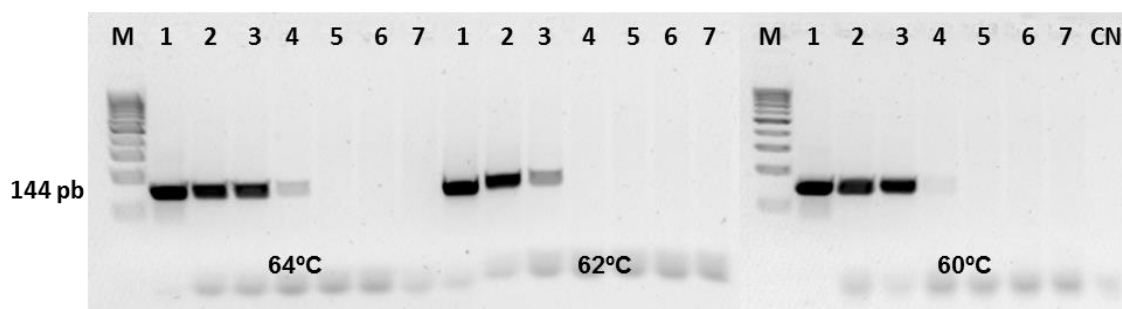


Figura 32 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Ana3-F/Ana3-R a diferentes temperaturas de hibridação (60, 62 e 64°C) com 2,0 mM de Mg²⁺ dos extratos das misturas modelo de caju em massa (PCM) (diluídos a 50 ng/μL). M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1-6: 10%; 1%; 0,1%; 0,01%; 0,001%; 0,0001%; 7: 0%; CN: controlo negativo.

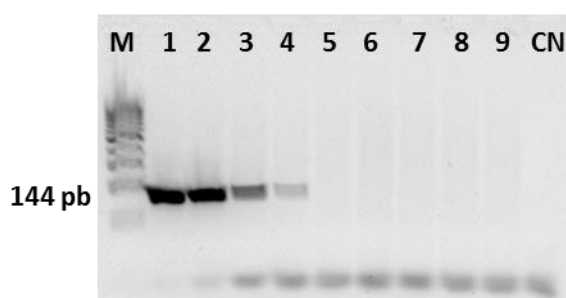


Figura 33 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Ana3-F/Ana3-R a 64°C com 3,0 mM de Mg²⁺ dos extratos das misturas modelo de caju em massa (PCM) (diluídos a 50 ng/μL). M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1-8: 10%; 1%; 0,1%; 0,01%; 0,005%; 0,001%; 0,0005%; 0,0001%; 9: 0%; CN: controlo negativo.

Reatividade Cruzada

Com os *primers* Ana3-F/Ana3-R, apenas o pinhão apresentou aparente reatividade cruzada com o caju (Figuras 34 e 35). A amostra de pinhão foi extraída novamente, tendo sido eliminada a banda ténue para esta amostra após nova PCR. Deste modo, os *primers* foram considerados específicos para o caju.

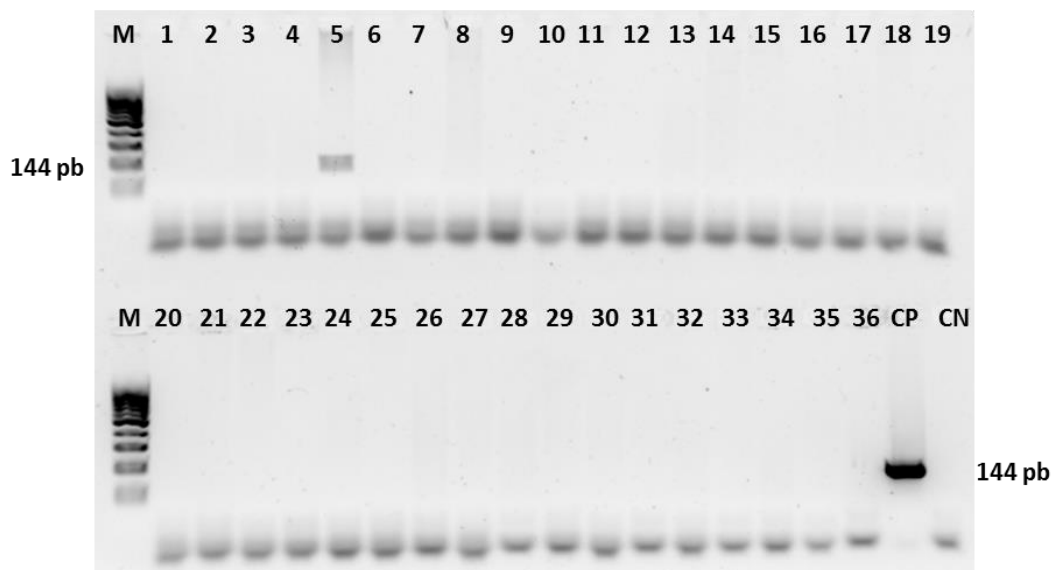


Figura 34 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os primers Ana3-F/Ana3-R dos extratos das amostras de reatividade cruzada. M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1: Noz macadâmia; 2: Pistácio; 3: Amendoim torrado; 4: Favas fritas; 5: Pinhão; 6: Castanha; 7: Pêssego; 8: Farinha de trigo; 9: Arroz; 10: Ameixa preta; 11: Noz; 12: Tremoço; 13: Aveia; 14: Cevada; 15: Centeio; 16: Soja; 17: Castanha do Brasil; 18: Milho; 19: Pevide torrada; 20: Alperce; 21: Colza; 22: Girassol; 23: Amêndoa; 24: Tomate cereja; 25: Avelã; 26: Massa; 27: Erva-príncipe; 28: Hortelã-pimenta; 29: Malva; 30: Sene; 31: Tília; 32: Passiflora; 33: Cardo Mariano; 34: Manjeriçao; 35: Coentros; 36: Hiperiçao do Gerês; CN: controlo positivo (caju cru); CN: controlo negativo.

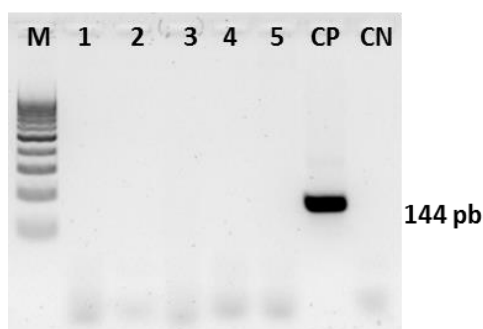


Figura 35 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os primers Ana3-F/Ana3-R dos extratos das amostras de reatividade cruzada. M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1: Noz pecan; 2: Maizena; 3: Pão ralado; 4: Farinha de arroz; 5: Farinha de milho; CP: controlo positivo (caju cru); CN: controlo negativo.

Sensibilidade absoluta e relativa

Para determinar a sensibilidade absoluta, as mesmas diluições do extrato de ADN de caju foram testadas nas condições anteriormente descritas. A amplificação ocorreu até 1 pg de ADN de caju, correspondendo à menor diluição testada. No entanto, dada a

intensidade da banda a 1 pg ser ténue, a concentração de 0,1 pg não foi utilizada (Figura 36). Os valores de 0,005% e 0,05% foram atingidos usando as misturas modelo de caju em massa (PCM) extraídas com e sem RNase diluídas a 50 ng/μL, respetivamente (Figura 37).

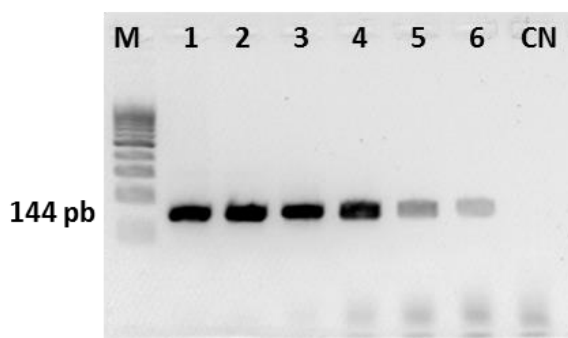


Figura 36 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Ana3-F/Ana3-R das diluições seriadas do extrato de ADN de caju. M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1-6: 100.000, 10.000, 1.000, 100, 10, e 1 pg de ADN de caju; CN: Controlo Negativo.

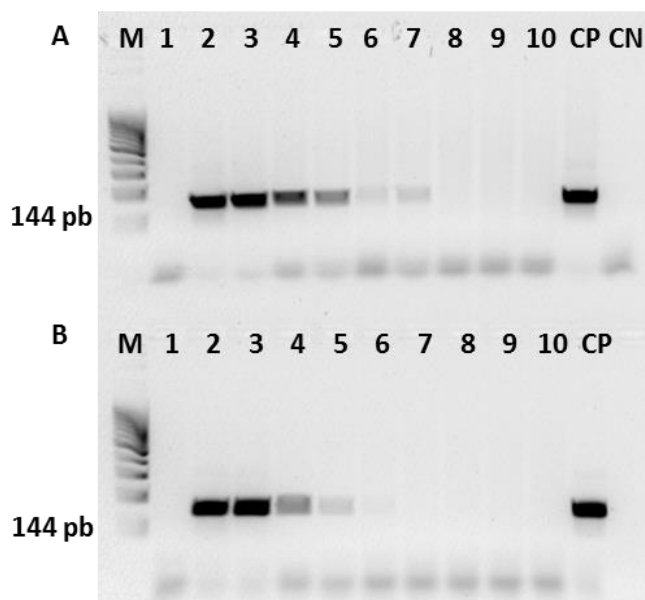


Figura 37 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Ana3-F/Ana3-R dos extratos das misturas modelo de caju em massa (PCM) extraídos com (A) e sem (B) RNase (diluídos a 50 ng/μL). M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1: 0%; 2-10: 10%; 1%; 0,1%; 0,05%; 0,01%; 0,005%; 0,001%; 0,0005%; 0,0001%; CP: controlo positivo; CN: controlo negativo.

Utilizando extratos com concentrações de 20 ng/μL, a sensibilidade foi de 500 mg/kg de caju em massa, enquanto para diluições de 100 ng/μL, o valor atingido foi de 100 mg/kg (Figura 38).

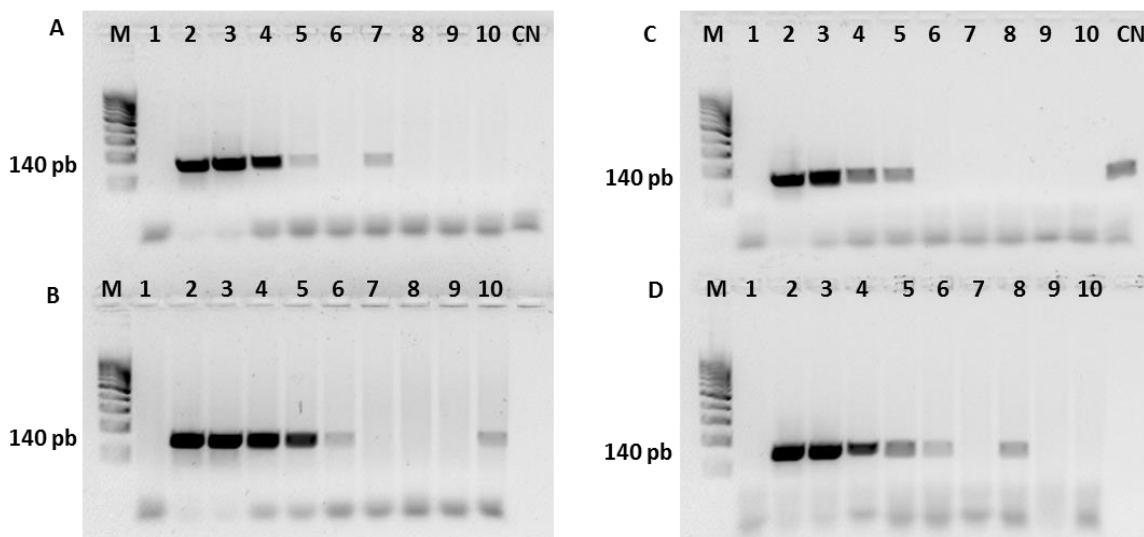


Figura 38 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Ana3-F/Ana3-R das misturas modelo de caju em massa (PCM) extraídos com (A, B) e sem (C,D) RNase com diluição de 20 ng/μL (A,C) e 100 ng/μL (B,D). M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1: 0%; 2-10: 10%; 1%; 0,1%; 0,05%; 0,01%; 0,005%; 0,001%; 0,0005%; 0,0001%; CN: controlo negativo.

O efeito de matriz foi avaliado com as misturas modelo de caju em farinha de trigo, verificando-se que para extratos diluídos a 50 ng/μL, a sensibilidade foi de 500 mg/kg (0,05%) (Figura 39). No caso das misturas modelo de biscoitos de caju, a sensibilidade foi de 50 mg/kg com ambas as misturas de massas (A) e biscoitos (B) (linhas 8, Figura 40).

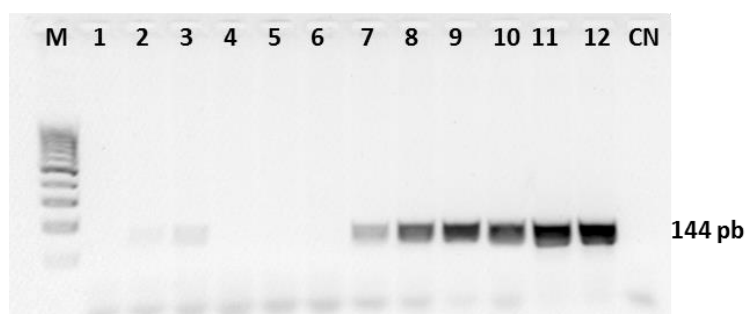


Figura 39 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Ana3-F/Ana3-R das misturas modelo de caju em farinha de trigo (PCW). M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1: 0%; 2-12: 0,0001%; 0,0005%; 0,001%; 0,005%; 0,01%; 0,05%; 0,1%; 0,5%; 1%; 5%; 10% CN: controlo negativo.

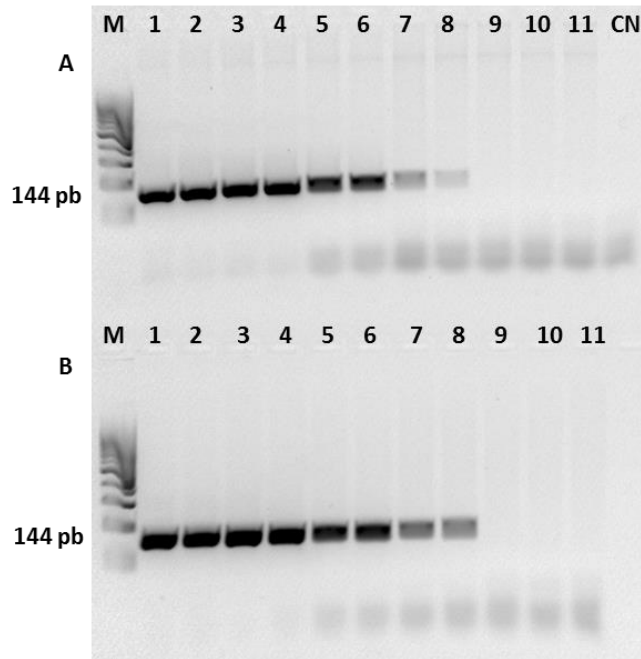


Figura 40 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com os *primers* Ana3-F/Ana3-R das misturas modelo de massa (A) e respectivos biscoitos de caju (B). M: marcador molecular 100 pb (Bioron, Ludwigsafen, Alemanha); 1-10: 10%; 5%; 1%; 0,5%; 0,1%; 0,05%; 0,01%; 0,005%; 0,001%; 0,0005%; 0,0001%; 11: 0%; CN: Controlo Negativo

Em termos qualitativos absolutos, todos os sistemas permitiram a amplificação de 1 pg de ADN de caju, tendo este sido definido como o limite de deteção absoluto. Em termos de deteção relativa, cada sistema apresentou um comportamento distinto, variando entre limites de 500 a 50 mg/kg de caju em diferentes matrizes. A extração do ADN é um passo determinante na qualidade dos extratos, pelo que em geral o uso de RNase facilitou a amplificação do alvo com LD relativos menores. Das matrizes testadas, as misturas modelo de massa e respetivos biscoitos de caju parecem exercer menor efeito negativo na amplificação do alvo, mesmo após o processamento térmico dos mesmos. Os sistemas Ana o 2 e Ana o 3 foram os que apresentaram maior reprodutibilidade de resultados.

Deteção de caju por PCR em tempo real

Um dos objetivos do presente trabalho consistiu no desenvolvimento de metodologias de PCR quantitativas para a identificação de alergénios do caju. Nesse âmbito, após uma primeira abordagem qualitativa com a finalidade de otimizar as condições de reação e avaliar o comportamento e especificidade de cada conjunto de *primers* desenhados para o efeito, procedeu-se à fase de quantificação e otimização dos sistemas de PCR em

tempo real. A primeira estratégia visou o estudo do melhor marcador de ADN recorrendo ao desenvolvimento do método de PCR em tempo real com recurso ao uso de um corante de fluorescência universal, nomeadamente o corante EvaGreen. Para confirmar a identidade dos fragmentos amplificados, cada sistema de PCR em tempo real com corante EvaGreen incluiu uma análise das curvas de desnaturação (*melting*).

Dado que não existem diretrizes específicas para o desenvolvimento de métodos analíticos para a deteção e quantificação de alergénios por PCR em tempo real, cada ensaio de foi avaliado segundo critérios de aceitação definidos e adaptados das diretrizes MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (Bustin *et al.*, 2009) e da *European Network of GMO Laboratories* (ENGL, 2015). Estes definem vários parâmetros, nomeadamente um coeficiente de correlação (R^2) igual ou superior a 0,98%, uma eficiência de PCR entre os 90% e 110%, assim como um declive entre -3,6 e -3,1. A determinação do limite de deteção (LD) é definida como a quantidade mínima de analito que pode ser detetada com 95% de confiança. As curvas de calibração devem apresentar pelo menos cinco concentrações de analito alvo diferentes, as quais devem abranger pelo menos três ordens de grandeza. A repetibilidade é avaliada através dos desvios padrão relativos entre cada valor Cq de cada réplica de uma mesma amostra sendo recomendado não exceder 25%. Quanto ao desempenho da amplificação, este é avaliado a partir do cálculo da eficiência pela fórmula seguinte:

$$E (\%) = 10^{(-\frac{1}{\text{declive}})} - 1$$

Sistema com corante EvaGreen

As condições de temperatura e composição das misturas reações de cada sistema estão representadas nas Tabelas 14 e 15. Aplicou-se a análise de temperatura de *melting* após os ciclos de amplificação, a todos os ensaios para verificação dos amplicões formados. Para cada par de *primers* procedeu-se então aos ensaios com as diluições seriadas de 1/10 do extrato 100% caju (100.000-0,1 pg) e com os extratos das misturas modelo de caju em massa (PCM) a 50 ng/μL de ADN.

Gene Ana o 1

Limite de deteção absoluto

O sistema de PCR em tempo real com os *primers* Ana1-F/Ana1-R permitiu a amplificação de ADN de caju até 10 pg, cobrindo cinco ordens de magnitude. Todas as réplicas apresentaram uma temperatura de desnaturação de 80,40±0,20°C (Figura 41),

confirmando a presença de um único conjunto de produtos de PCR formados. As

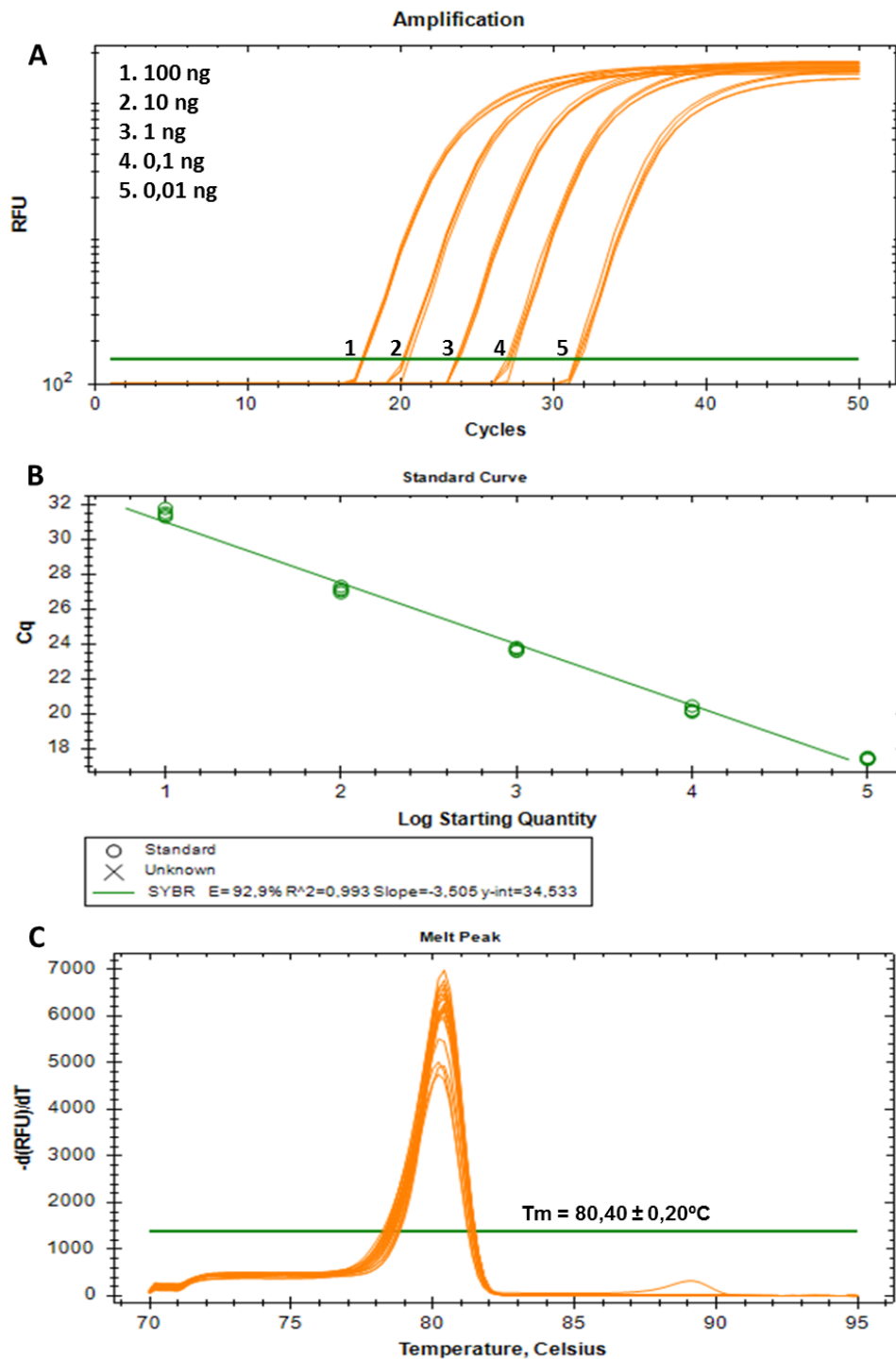


Figura 41 – Curvas de amplificação (A), respectiva curva de calibração (B) e curvas de *melting* (C) obtidas por PCR em tempo real da diluição seriada do extrato de ADN de caju com os *primers* Ana1-F/Ana1-R.

concentrações de 1 e 0,1 pg de caju não estão reportadas, pois somente 2 das 4 réplicas foram amplificadas com desvios à linearidade da reação. Para este sistema, o LD

absoluto foi estabelecido em 10 pg com elevada performance: eficiência de 92,9 % e declive de -3,505 com um coeficiente de correlação de 0,993 (Figura 41), parâmetros que estão de acordo com os critérios de aceitação definidos para este tipo de ensaios (Bustin, *et al.*, 2009; ENGL, 2015).

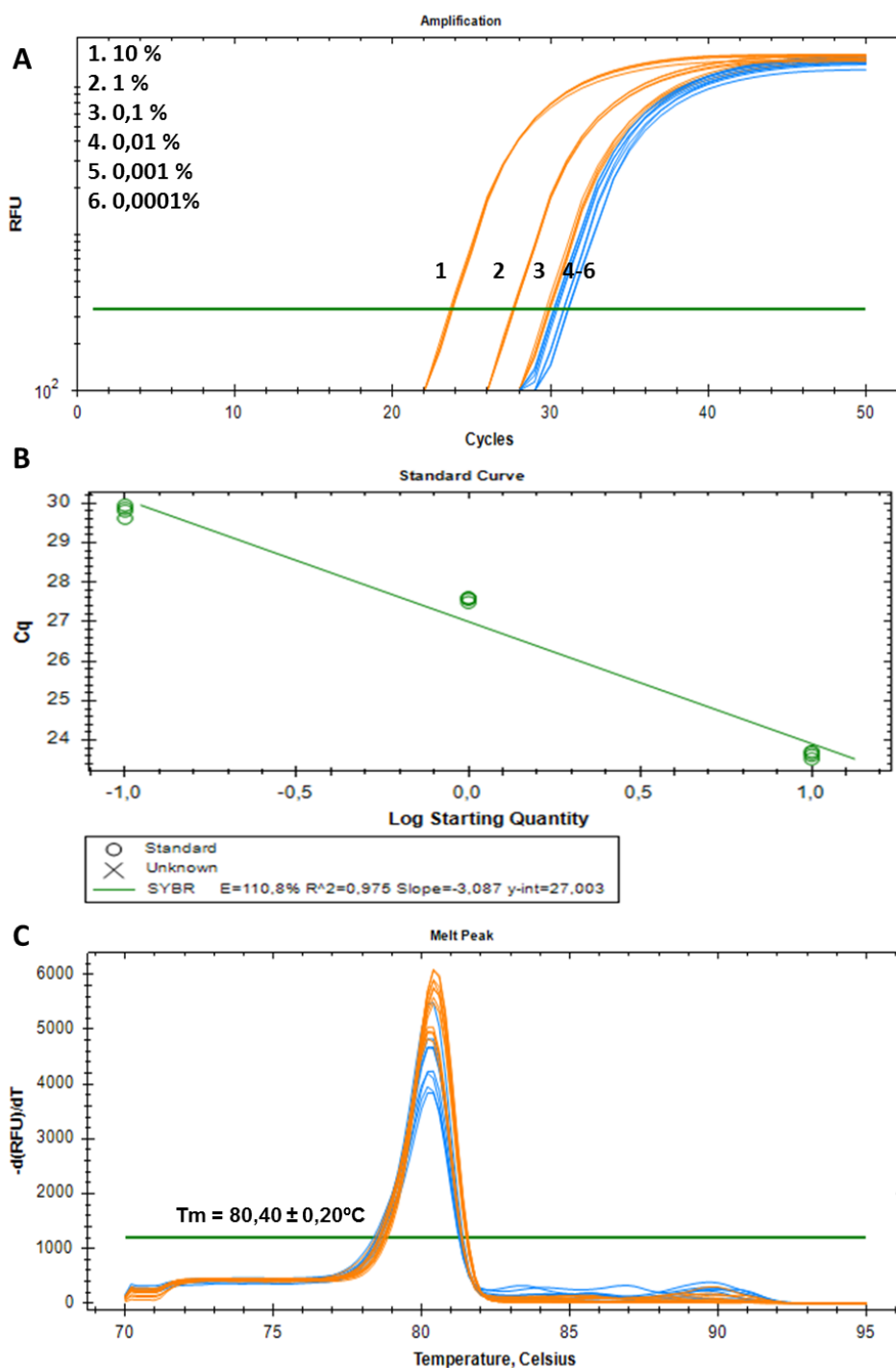


Figura 42 – Curvas de amplificação (A), respetiva curva de calibração (B) e curvas de *melting* (C) obtidas por PCR em tempo real dos extratos das misturas modelo de caju em massa (PCM) extraídos com RNase (diluídos a 50 ng/μL) com os *primers* Ana1-F/Ana1-R.

Limite de detecção relativo

O LD relativo foi determinado com as misturas modelo de caju em massa (PCM) até à concentração de 0,1% (1.000 mg/kg) de caju. Para este sistema era esperado uma sensibilidade mais elevada, no entanto os pontos com menor concentração não apresentaram o gradiente esperado, tendo afetado a linearidade da reação. A amplificação não específica das misturas modelo com quantidades de 0,01-0,0001% de caju em massa não deu origem a fragmentos diferentes dado que os produtos formados apresentaram a mesma temperatura de *melting* dos fragmentos alvos ($80,40 \pm 0,20^\circ\text{C}$) (Figura 42). Estes resultados confirmam os dados da PCR qualitativa representados na Figura 22, onde também não foi possível estabelecer um gradiente de concentrações, como era esperado.

Gene Ana o 2

Limite de detecção absoluto

Procedeu-se de igual modo para o sistema Ana2-F/Ana2-R, o qual apresentou melhor LD absoluto (1 pg) (Figura 43). A análise de *melting* permitiu confirmar a identidade dos produtos, com todas as réplicas a amplificarem com uma temperatura de *melting* de $83,20 \pm 0,20^\circ\text{C}$. O sistema apresentou parâmetros muito adequados de performance ($R^2=0,994$, declive de -3,351 e eficiência de 98,8%), estando de acordo com os intervalos definidos para este tipo de metodologia (Bustin *et al.*, 2009; ENGL, 2015).

Limite de detecção relativo

Quanto à avaliação do LD relativo (Figura 44), observou-se que a partir de 0,01% de caju em massa ocorreu amplificação de um outro alvo (fragmentos com temperatura de *melting* diferente). Tal como no sistema Ana o 1, o LD relativo considerado foi de 0,1%. A curva de calibração obtida apresentou um coeficiente de correlação dentro dos critérios de aceitação ($R^2 = 0,998$), mas com um declive e uma eficiência baixos (declive de -3,941; eficiência de 79,4 %). Este facto pode estar associado com a presença das bandas de arrastamento que se observavam na PCR qualitativa (ex. Figura 29) para estes *primers*, sugerindo a necessidade de um terceiro *primer* (sonda) para conferir maior especificidade à reação.

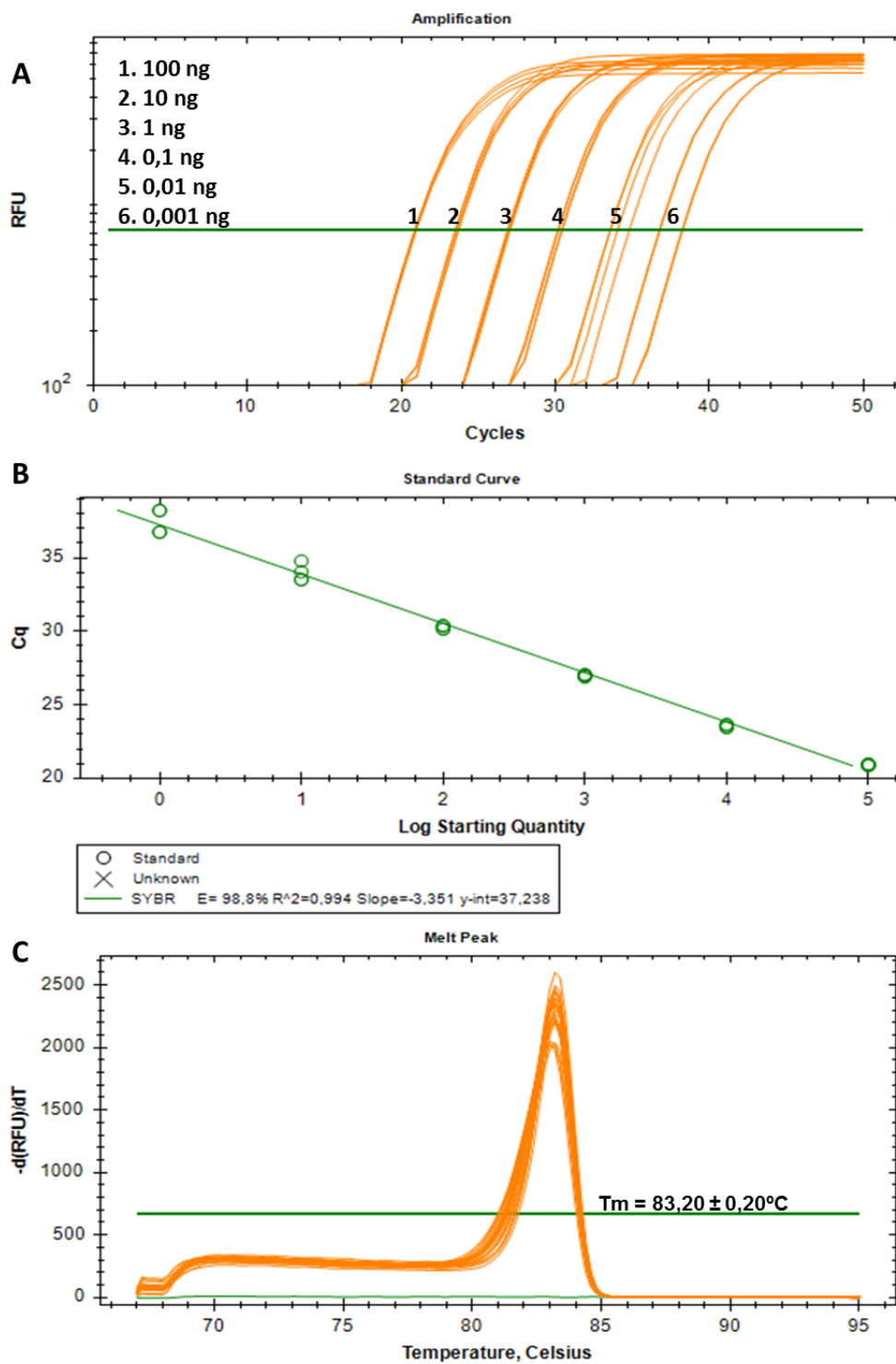


Figura 43 – Curvas de amplificação (A), respetiva curva de calibração (B) e curvas de *melting* (C) obtidas por PCR em tempo real da diluição seriada do extrato de ADN de caju com os *primers* Ana2-F/Ana2-R.

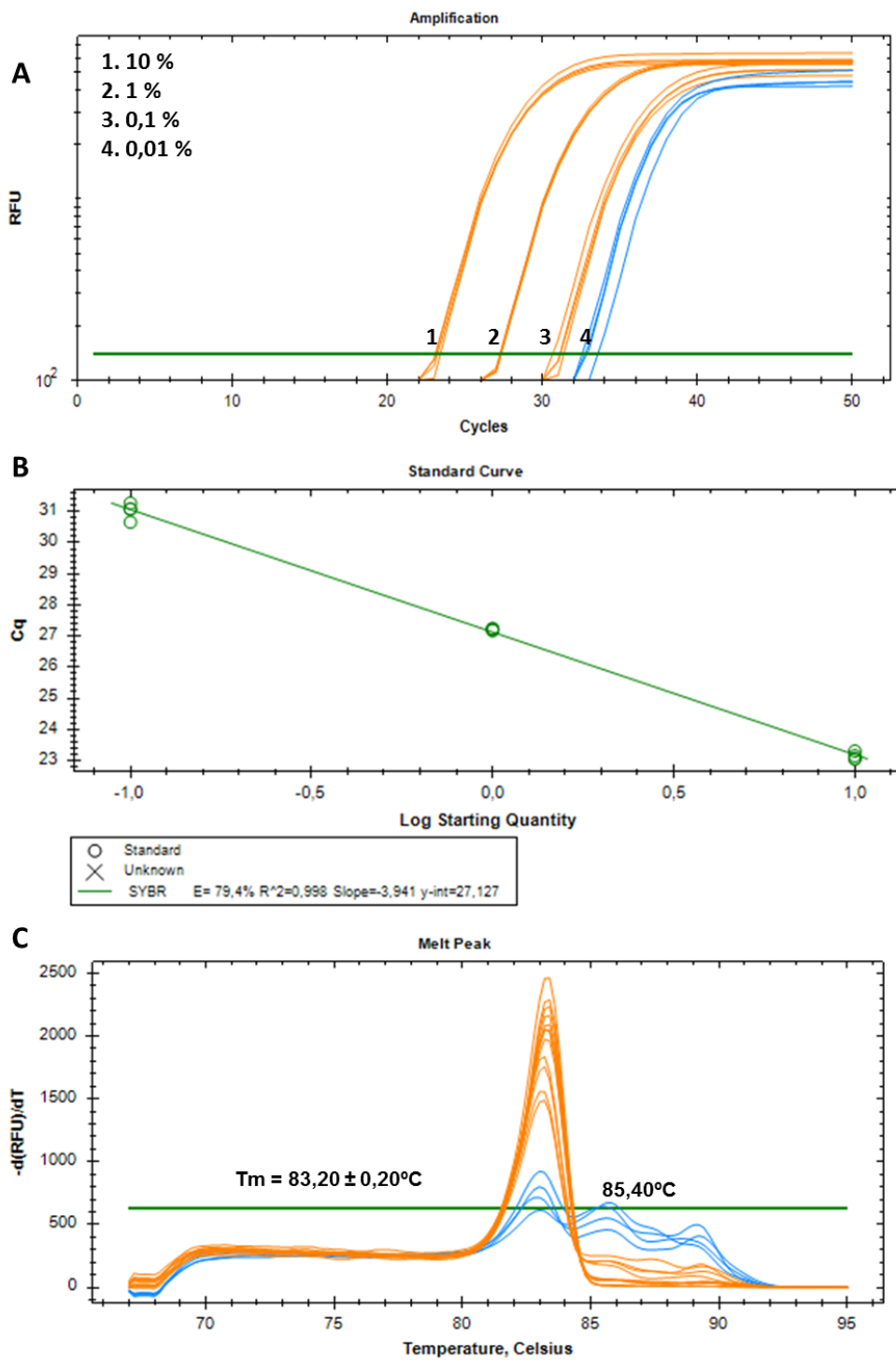


Figura 44 – Curvas de amplificação (A), respetiva curva de calibração (B) e curvas de *melting* (C) obtidas por PCR em tempo real dos extratos das misturas moído de caju em massa (PCM) (extraídas com RNase) com os *primers* Ana2-F/Ana2-R.

Gene Ana o 3

Limite de detecção absoluto

Quanto ao sistema Ana3-F/Ana3-R, o LD absoluto foi semelhante ao sistema Ana2-F/Ana2-R (1 pg de ADN de caju) (Figura 45), evidenciando uma performance de acordo com os critérios de aceitação (Bustin *et al.*, 2009; ENGL, 2015). Todas as réplicas amplificaram positivamente com uma temperatura de *melting* de $83,80 \pm 0,20^{\circ}\text{C}$, o que confirmou a identidade dos produtos alvo. Estes resultados são concordantes com os observados em PCR qualitativa.

Limite de detecção relativo

Quanto à sensibilidade relativa (Figura 46), esta assemelha-se à do sistema precedente com um LD de 0,1% (1.000 mg/kg) e com amplicões com temperaturas de *melting* de $83,20 \pm 0,20^{\circ}\text{C}$, que confirmam a amplificação do fragmento alvo. Abaixo de 0,1% ocorreu amplificação positiva de fragmentos, mas a análise de *melting* evidencia a produção de um conjunto diferente de amplicões com um *melting* de $88,60^{\circ}\text{C}$, que não correspondem ao alvo.

A utilização de um corante universal como o EvaGreen não permitiu o desenvolvimento de sistemas de PCR em tempo real quantitativos adequados para os diferentes genes do caju, uma vez que a presença de fragmentos não específicos invalida a sua aplicação. A amplificação absoluta do caju foi muito sensível com os sistemas propostos, atingindo valores de 10^{-1} pg que correspondem a 20^{-2} cópias de ADN de caju (considerando que uma cópia haploide de ADN de caju é 0,51 pg) (Dhanara *et al.*, 2002). No entanto, em termos de detecção relativa os sistemas parecem ser afetados pelo efeito de matriz. Para obviar estes problemas, foram desenhadas sondas para os sistemas que apresentavam maior sensibilidade (Ana o 2 e Ana o 3), visando o desenvolvimento de métodos quantitativos mais eficientes. Em termos absolutos, as sensibilidades obtidas dos diferentes sistemas com EvaGreen foram ligeiramente inferiores aos reportados por Pafundo *et al.* (2010). Num sistema semelhante, usando corante SYBR Green em multiplex com alvo no gene que codifica o alergénio Ana o 1, os autores reportaram um LD absoluto de 0,5 pg de ADN de caju.

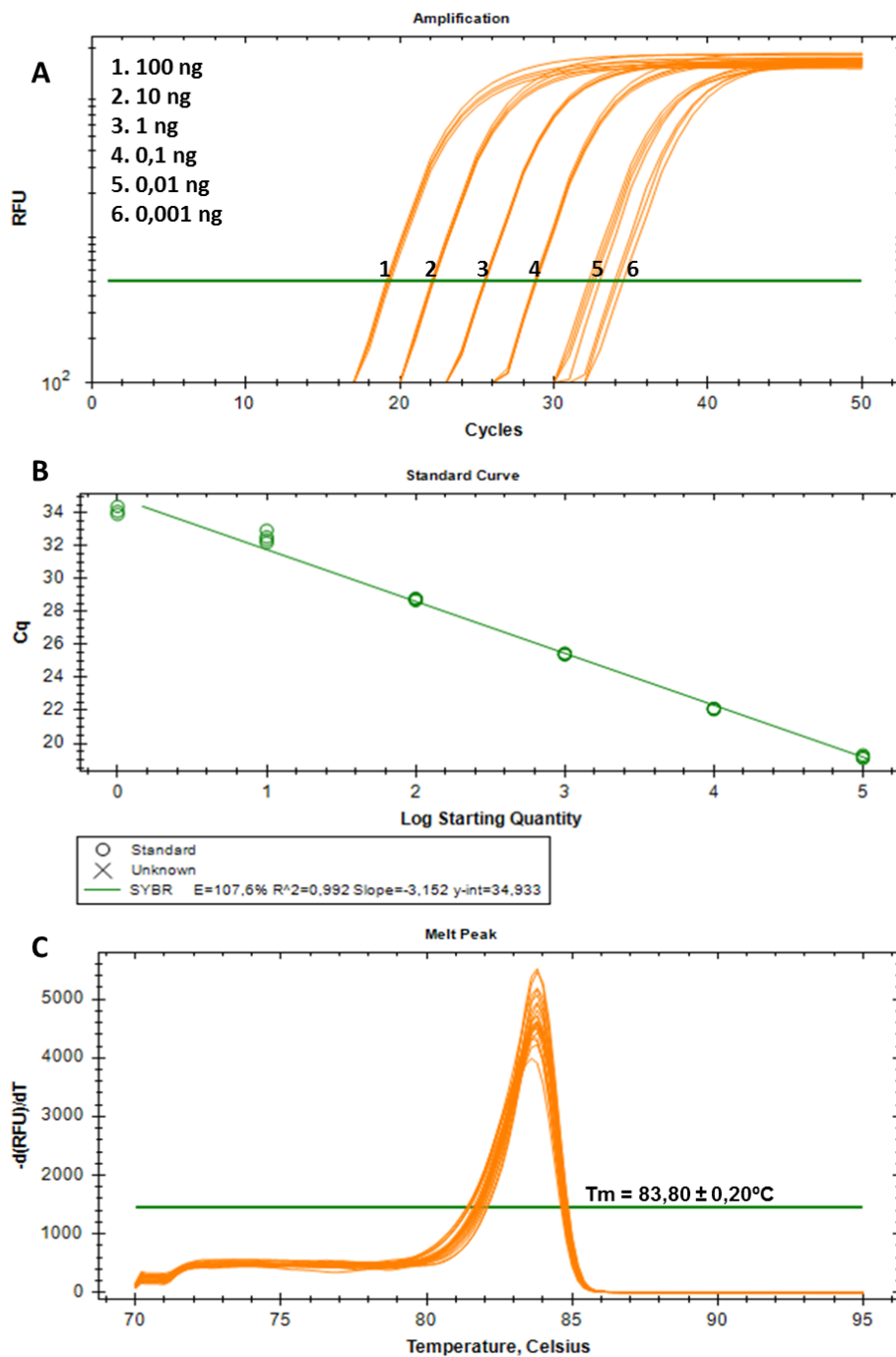


Figura 45 - Curvas de amplificação (A), respectiva curva de calibração (B) e curvas de *melting* (C) obtidas por PCR em tempo real das diluições seriadas do extrato 100% de caju para determinação do limite de detecção absoluto.

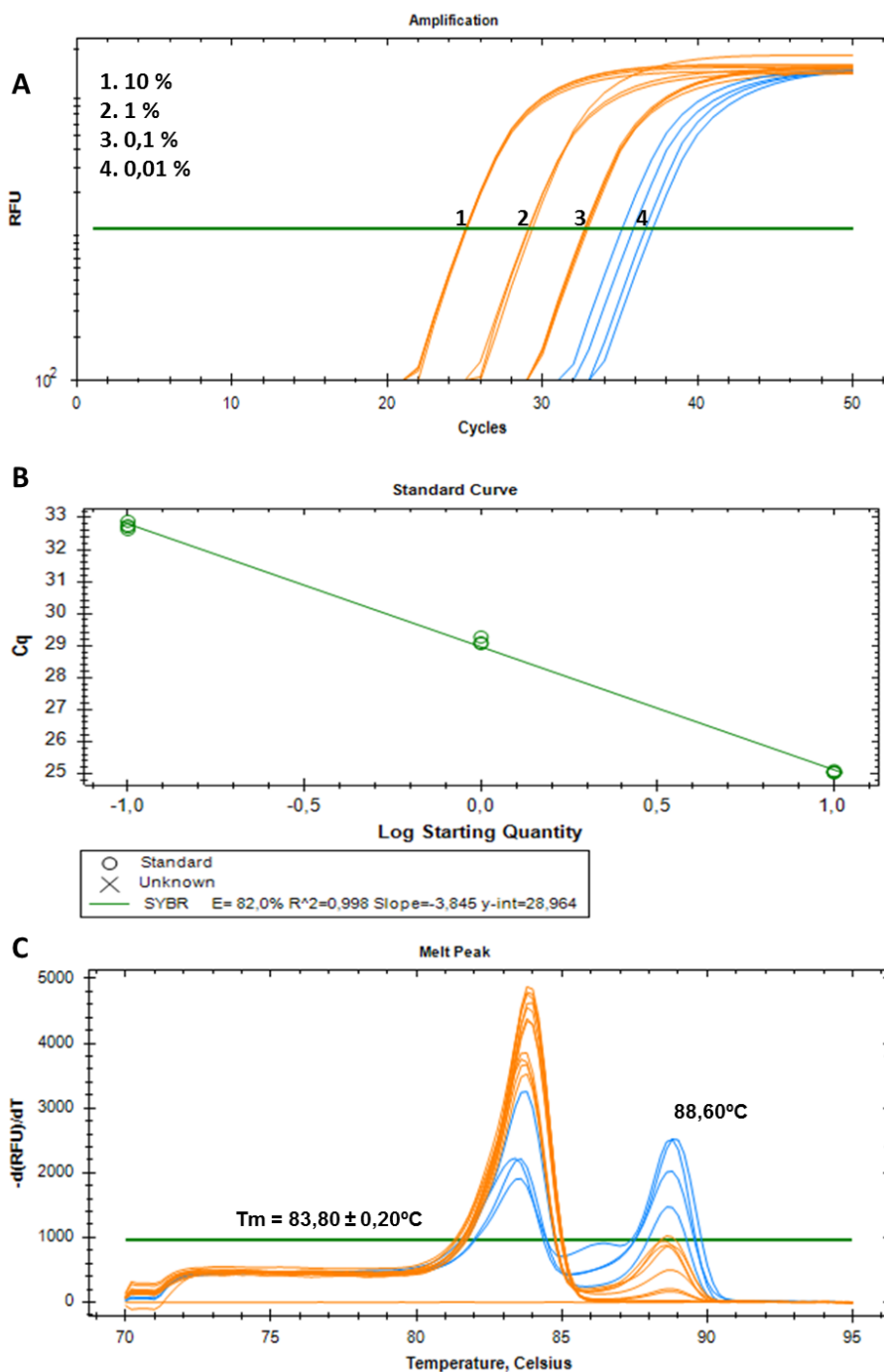


Figura 46 - Curvas de amplificação (A), respetiva curva de calibração (B) e curvas de *melting* (C) obtidas por PCR em tempo real dos extratos das misturas modelo de caju em massa (PCM) extraídos com RNase, para determinação do limite de deteção relativo.

Sistema com sondas TaqMan™

Contrariamente ao corante de fluorescência que se liga a todas as cadeias de ácidos nucleicos de cadeia dupla, as sondas marcadas funcionam como um terceiro oligonucleótido que se deve ligar à cadeia alvo para ocorrer a emissão de sinal de

fluorescência. Recorrendo ao uso de sondas de hidrólise desenhadas especificamente para se ligarem ao fragmento alvo dos sistemas Ana2-F/Ana2-R e Ana3-F/Ana3-R, dois métodos de PCR em tempo real foram propostos. As sensibilidades absoluta e relativa foram determinadas da mesma forma que para os sistemas de PCR em tempo real com o corante EvaGreen, usando os extratos de ADN de caju com diluição seriada e misturas modelo de caju em massa (PCM) (diluídos a 50 ng/ μ L). Para avaliar o efeito da matriz foram também testadas as misturas de caju em farinha de trigo (PCW). Para este conjunto de misturas modelo de caju em farinha de trigo não foi usada RNase para a sua extração, sendo testadas com concentração de 50 ng/ μ L.

Procedeu-se à normalização dos métodos, recorrendo à amplificação simultânea de um gene de referência endógeno (18S rARN) com um dos genes específicos (Ana o 2 ou Ana o 3). O gene endógeno foi amplificado em cada uma das amostras em duplicado e em paralelo com a amplificação específica do caju. Obtiveram-se curvas de calibração onde estão representados os diferenciais entre os Cq das amplificações específica e universal de cada mistura de PCR associada à mesma mistura modelo, em relação ao logaritmo em base 10 da concentração em caju: $f(\log(\text{mg/kg})) = \Delta\text{Cq}$.

Gene Ana o 2

Limite de deteção absoluto

Procedeu-se à amplificação das sete diluições seriadas de ADN de caju (100.000-0,1 pg). A amplificação do fragmento do gene que codifica para o alergénio Ana o 2 revelou-se efetiva, demonstrando um LD absoluto de 1 pg de ADN de caju (2 cópias de ADN genómico de caju). A reação decorreu com elevada performance apresentando valores de coeficiente de correlação de 0,990, declive de -3,235 e eficiência de 103,7% (Figura 47), os quais estão de acordo com os parâmetros definidos para este tipo de metodologia (Bustin *et al.* 2009; ENGL, 2015). De salientar que ocorreu amplificação de apenas 1 das 4 réplicas da diluição com 0,1 pg de ADN de caju, pelo que esta concentração não pode ser definida como LD absoluto.

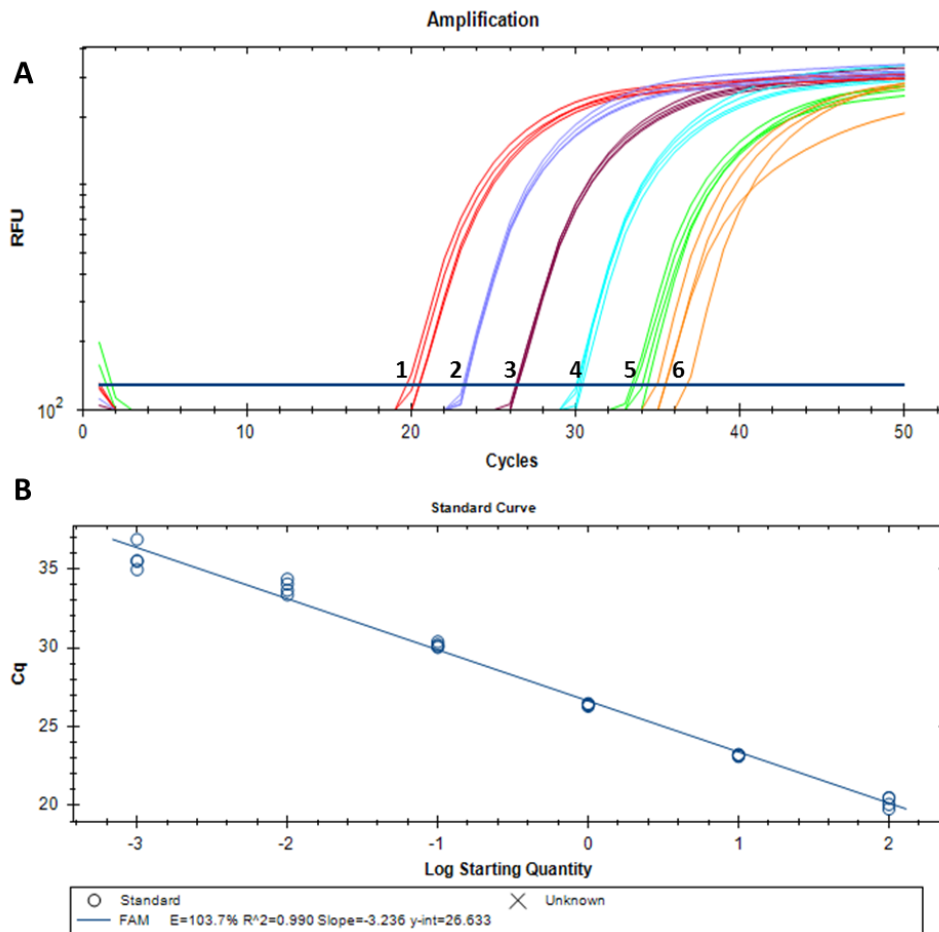


Figura 47 – Curvas de amplificação (A) e respetiva curva de calibração (B) obtidas por PCR em tempo real com os *primers* Ana 2-F/Ana2-R e sonda Ana2-P utilizando as diluições seriadas de ADN de caju ($n=4$ réplicas). 1-6: 100.000 pg; 10.000 pg; 1.000 pg; 100 pg; 10pg e 1 pg de ADN.

Limite de deteção relativo

Para a determinação do LD relativo foram testadas diferentes concentrações das misturas modelo de caju em massa (PCM). Com extratos diluídos a 50 ng/mL ocorreu amplificação positiva até 0,01% de caju em massa (100 mg/kg). Observa-se que o perfil das curvas se altera entre as misturas 1% e 0,1%, aparecendo mais “achatadas”. De salientar que o controlo negativo confirma a ausência de contaminação dos extratos. A curva de calibração obtida apresenta coeficiente de correlação excelente ($R^2 = 0,989$), no entanto, uma eficiência e um declive fora dos intervalos recomendados (Figura 48).

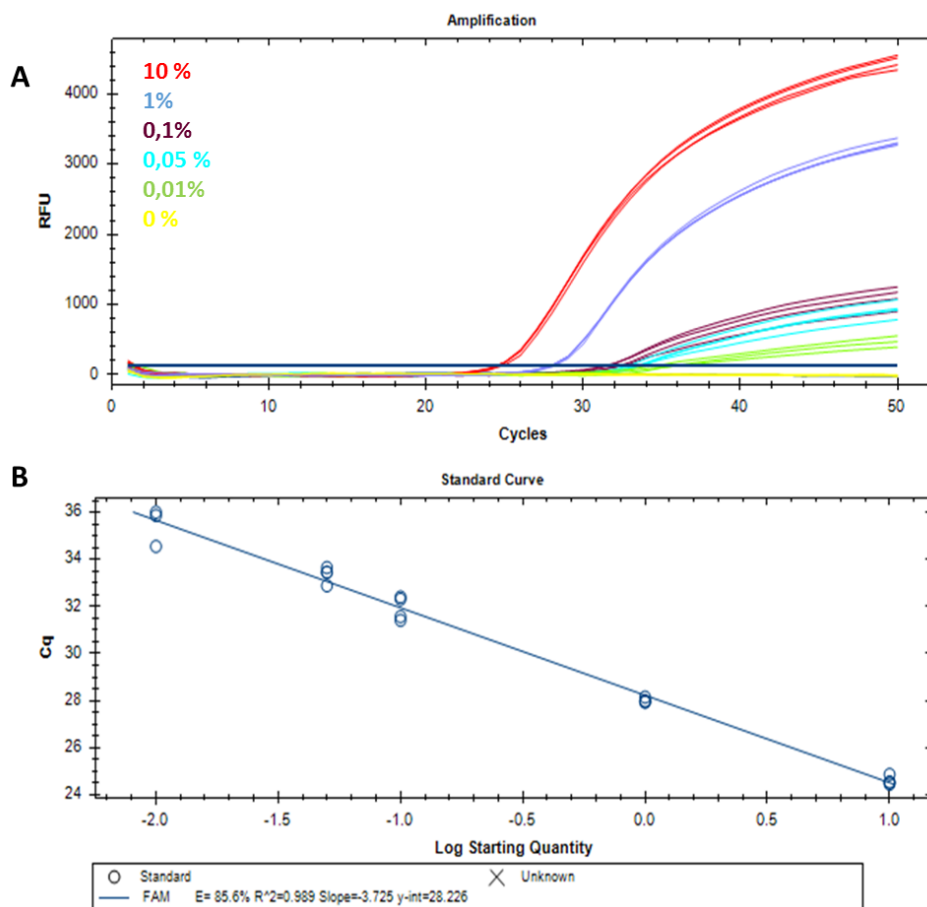


Figura 48 – Curvas de amplificação (A) e respetiva curva de calibração (B) obtidas por PCR em tempo real com os primers Ana 2-F/Ana2-R e sonda Ana2-P utilizando as misturas de referência PCM a 50 ng/μL de ADN ($n=4$ réplicas).

Com o objetivo de se avaliar o efeito da matriz testaram-se extratos de 50 ng/μL das misturas modelo de caju em farinha de trigo (PCW). Nesta reação apenas 1 em 4 réplicas da concentração 50 mg/kg amplificou positivamente pelo que o LD relativo foi definido em 100 mg/kg (Figura 49). A performance da reação foi elevada com os parâmetros da curva de calibração dentro dos intervalos recomendados. De acordo com estes resultados, o efeito matriz parece ser mais evidente no caso da farinha de trigo do que nas misturas com massa.

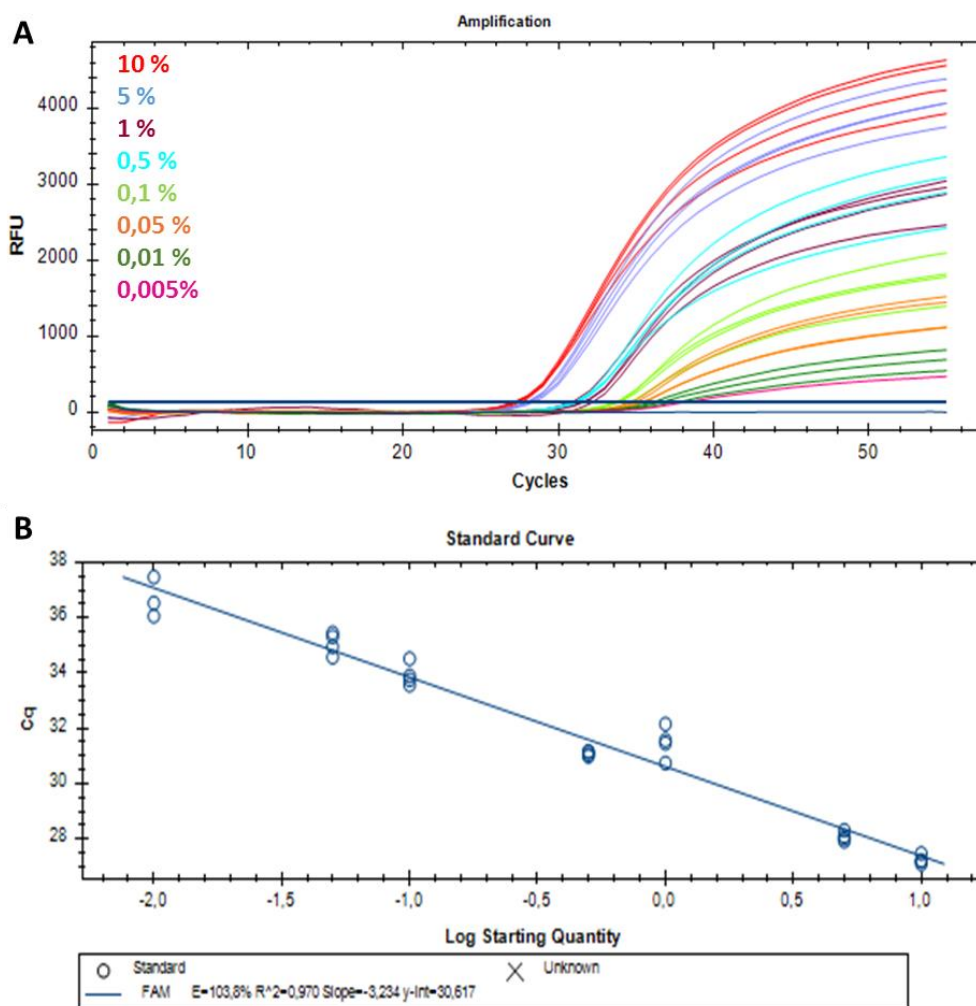


Figura 49 – Curvas de amplificação (A) e respetiva curva de calibração (B) obtidas por PCR em tempo real com os *primers* Ana 2-F/Ana2-R e sonda Ana2-P utilizando os extratos a 50 ng/μL de ADN das misturas modelo de caju em farinha de trigo (PCW) ($n=4$ réplicas).

Normalização e validação do método

As misturas modelo do caju em farinha de trigo foram amplificadas em 2 reações separadas, mas em simultâneo, com alvo num gene eucariota universal (18S rARN) e no gene Ana o 2. A normalização do sistema foi efetuada com base no cálculo de ΔCq ($\Delta Cq = Cq$ (gene específico) – Cq (gene endógeno universal)), permitindo obter uma curva de calibração com parâmetros adequados para a quantificação de caju até um limite de quantificação de 0,01% (100 mg/kg) (Figura 50 e Tabela 21).

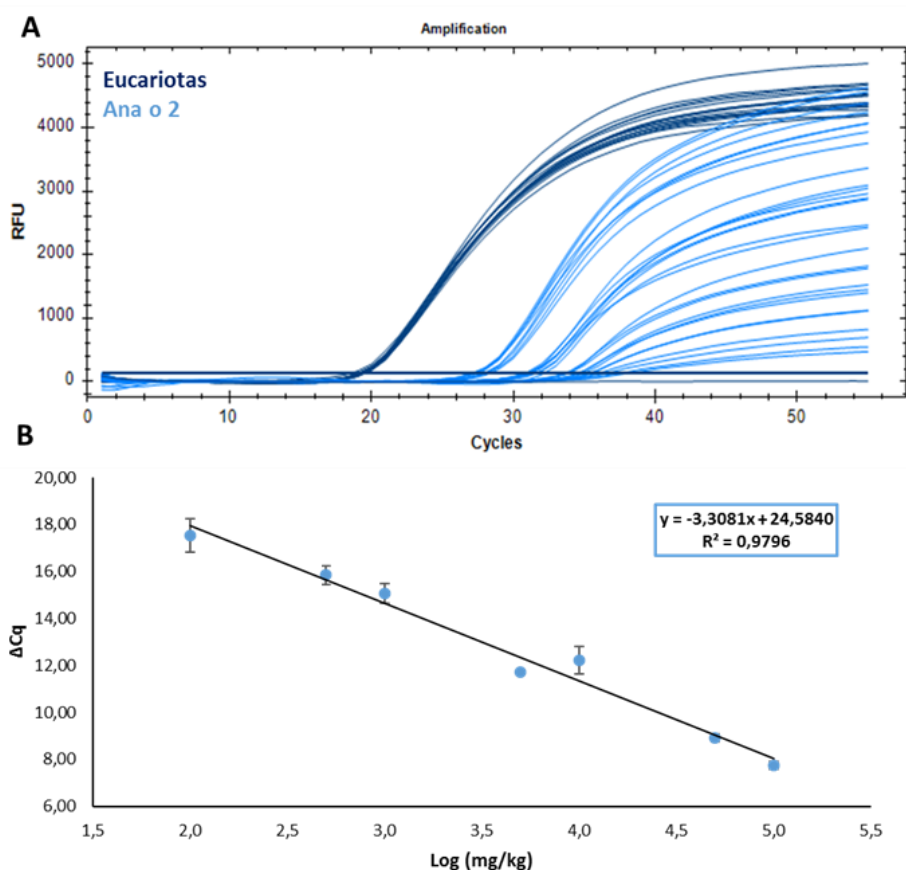


Figura 50 – Curvas de amplificação (A) e respetiva curva de calibração normalizada (B) obtida por PCR em tempo real com os *primers* Ana 2-F/Ana2-R e sonda Ana2-P utilizando os extratos a 50 ng/μL de ADN das misturas modelo de caju em farinha (PCW), para determinação do limite de deteção relativo.

Tabela 21 - Resultados normalizados obtidos por PCR em tempo real com os *primers* Ana 2-F/Ana2-R e sonda Ana2-P (amplificação específica) e os *primers* EG-F/EG-R e sonda EG-P (gene endógeno universal) para as misturas de caju em farinha de trigo (PCW)

Caju (%)	ΔCq ± DP
10	7,74 ± 0,16 (4/4)
5	8,93 ± 0,17 (4/4)
1	12,22 ± 0,58 (4/4)
0,5	11,74 ± 0,08 (4/4)
0,1	15,06 ± 0,41 (4/4)
0,05	15,85 ± 0,39 (4/4)
0,01	17,55 ± 0,72 (4/4)
Coeficiente de correlação (R ²)	0,9796
Declive	-3,081
Eficiência da PCR (%)	100,6

Valores entre parêntesis correspondem (número de réplicas positivas/número de réplicas total).

A técnica foi validada com quatro misturas cegas preparadas (8%, 4%, 2,5% e 0,25%), que foram determinadas na mesma corrida como amostras desconhecidas, amplificando com os *primers* do gene endógeno em duplicado e com os *primers* específicos ao alergénio Ana o 2 em quadruplicado. A determinação da concentração das misturas cegas permitiu validar o sistema proposto, cujos resultados estimados estão representados na Tabela 22. Três das misturas cegas apresentaram erros inferiores a 25%, o que está de acordo com os critérios de validação para este tipo de ensaios. O caso da mistura de 8,0% ter apresentado um erro tão elevado pode ter resultado de algum erro experimental, dado que se apresenta no valor de concentração testado mais elevado.

Tabela 22 - Estimativa das percentagens de caju adicionadas em amostras cegas de caju em farinha de trigo a partir das PCR com os *primers* Ana2-F/Ana2-R e sonda Ana3-P.

Amostra cega	Valor real (mg/kg)	Valor estimado (média±DP) (mg/kg)*	Coefficiente de variação (%)	Erro (%)**
PCW13	80000	50976 ± 4707	5,9	-36,28
PCW14	40000	37267 ± 3528	8,8	-6,83
PCW15	25000	24367 ± 2226	8,9	-2,53
PCW16	2500	2354 ± 252	10,1	-5,83

* média dos resultados obtidos dos dois ensaios ($n = 4$) ± desvio padrão; ** Erro (%) = ((valor estimado-valor real)/valor real) x 100, CV – coeficiente de variação.

Gene Ana o 3

Limite de deteção absoluto

Procedeu-se à amplificação das sete diluições seriadas de ADN de caju (100.000-0,1 pg) com alvo no gene que codifica o alergénio Ana o 3, sendo o LD absoluto semelhante ao obtido no sistema Ana o 2, ou seja, 1 pg de ADN de caju (2 cópias de ADN genómico do caju). A reação apresentou uma eficiência de 88,7%, declive de -3,627 e correlação de 0.989 (Figura 51), os quais estão muito próximos dos valores recomendados (Bustin *et al.*, 2009; ENGL, 2015).

Estes resultados são comparáveis aos valores de LD de 0,5 pg (Ehlert *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011) e 1,25 pg de ADN de caju (Brzezinski, 2006; Piknova *et al.*, 2007) descritos na literatura para sistemas de PCR em tempo real com sondas específicas.

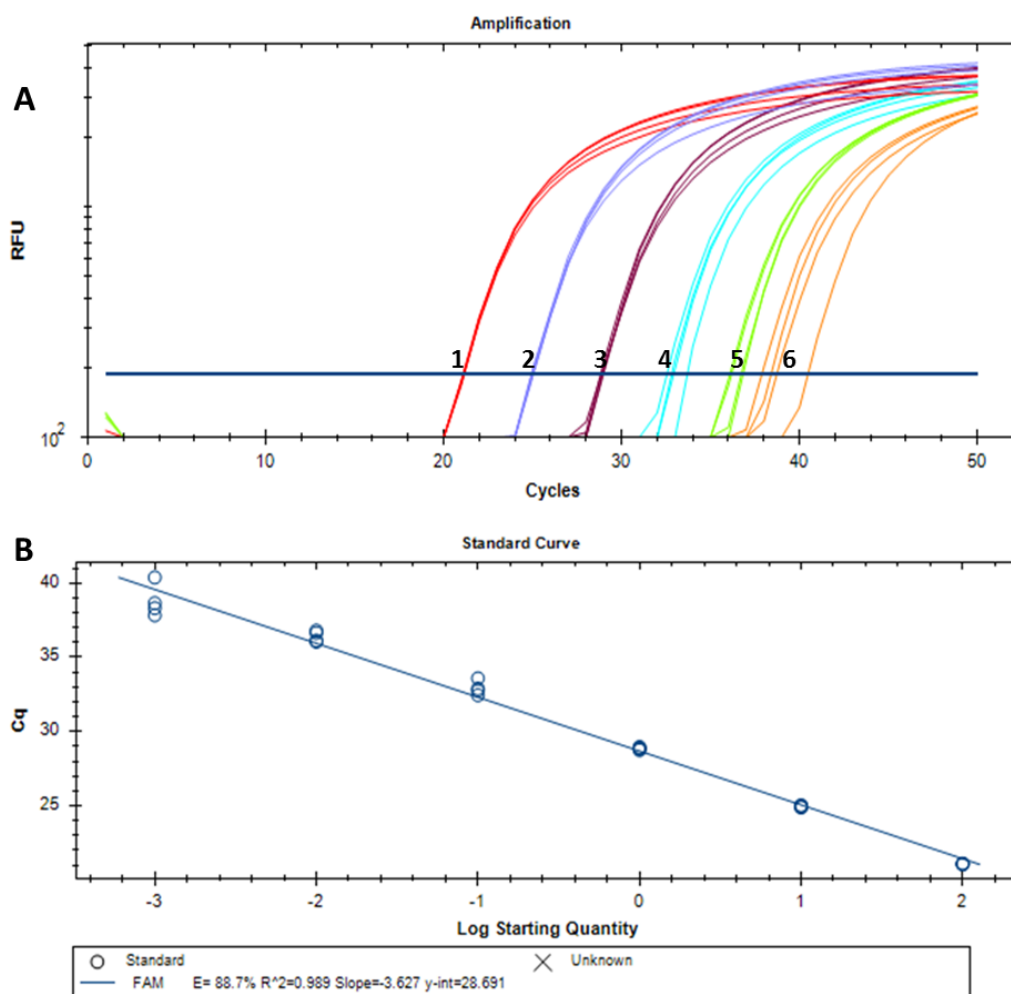


Figura 51 – Curvas de amplificação (A) e respetiva curva de calibração (B) obtidas por PCR em tempo real com os *primers* Ana 3-F/Ana3-R e sonda Ana3-P utilizando as diluições seriadas de ADN de caju ($n=4$ réplicas). 1-6: 100.000 pg; 10.000 pg; 1.000 pg; 100 pg; 10pg e 1 pg de ADN.

Limite de deteção relativo

O LD relativo foi testado com dois conjuntos de misturas modelo: caju em massa (PCM) e caju em farinha de trigo (PCW) para avaliar o efeito da matriz. O LD relativo efetivo foi de 500 mg/kg, sendo que apenas 3 das 4 réplicas da mistura de 100 mg/kg foram positivas. A curva de calibração apresentou uma eficiência inferior a 90%, mas com correlação de $R^2=0.981$ (Figura 52).

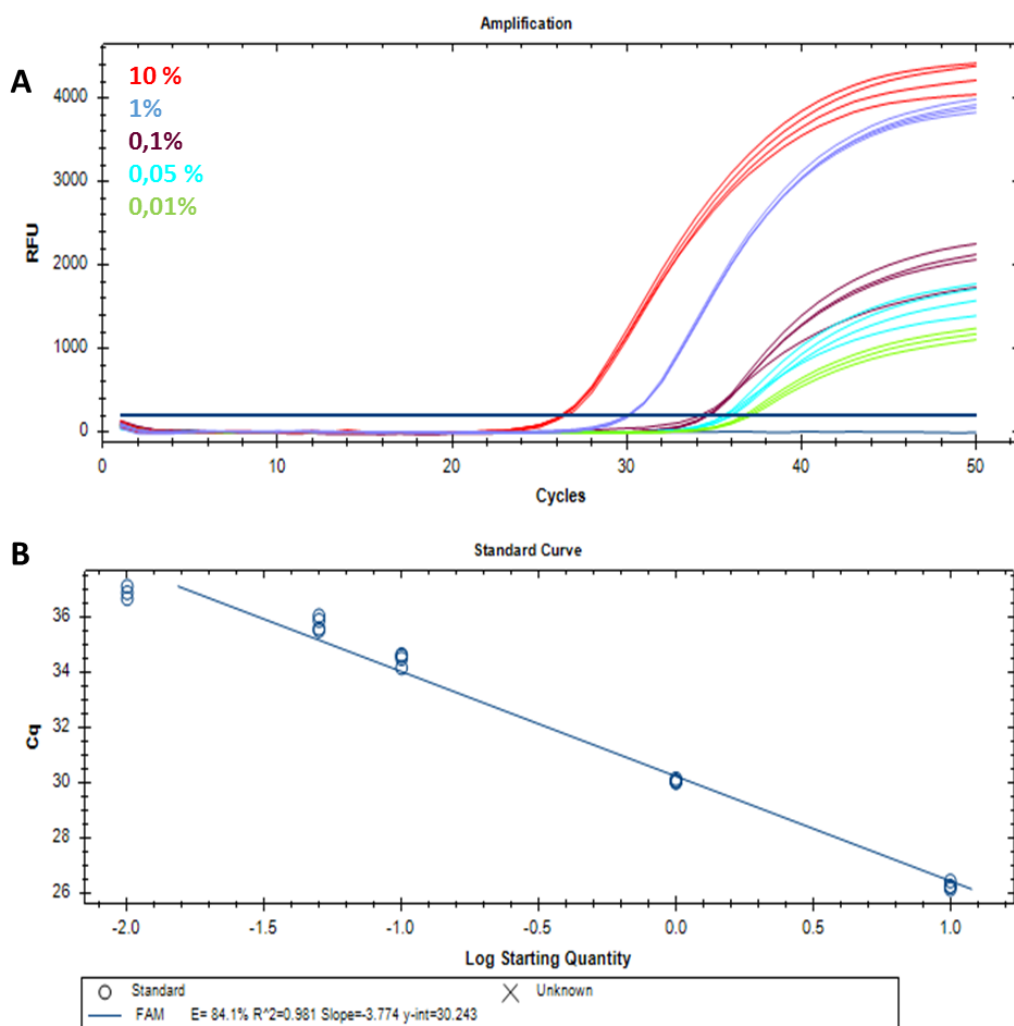


Figura 52 – Curvas de amplificação (A) e respetiva curva de calibração (B) obtidas por PCR em tempo real com os *primers* Ana 3-F/Ana3-R e sonda Ana3-P utilizando os extratos das misturas modelo de caju em massa (PCM) a 50 ng/μL ($n=4$ réplicas).

Para avaliar o efeito de matriz sobre o sistema, efetuou-se a avaliação do LD relativo do sistema com os extratos das misturas modelo de caju em farinha de trigo (PCW) a 50 ng/μL. A performance do método foi adequada com parâmetros de eficiência, declive e correlação dentro dos intervalos recomendados (Bustin, *et al.*, 2009; ENGL, 2015). Considerando que apenas 1 das 4 réplicas das amostras de 100 e 50 mg/kg amplificaram positivamente, o LD relativo foi estabelecido em 500 mg/kg de caju em farinha de trigo (Figura 53).

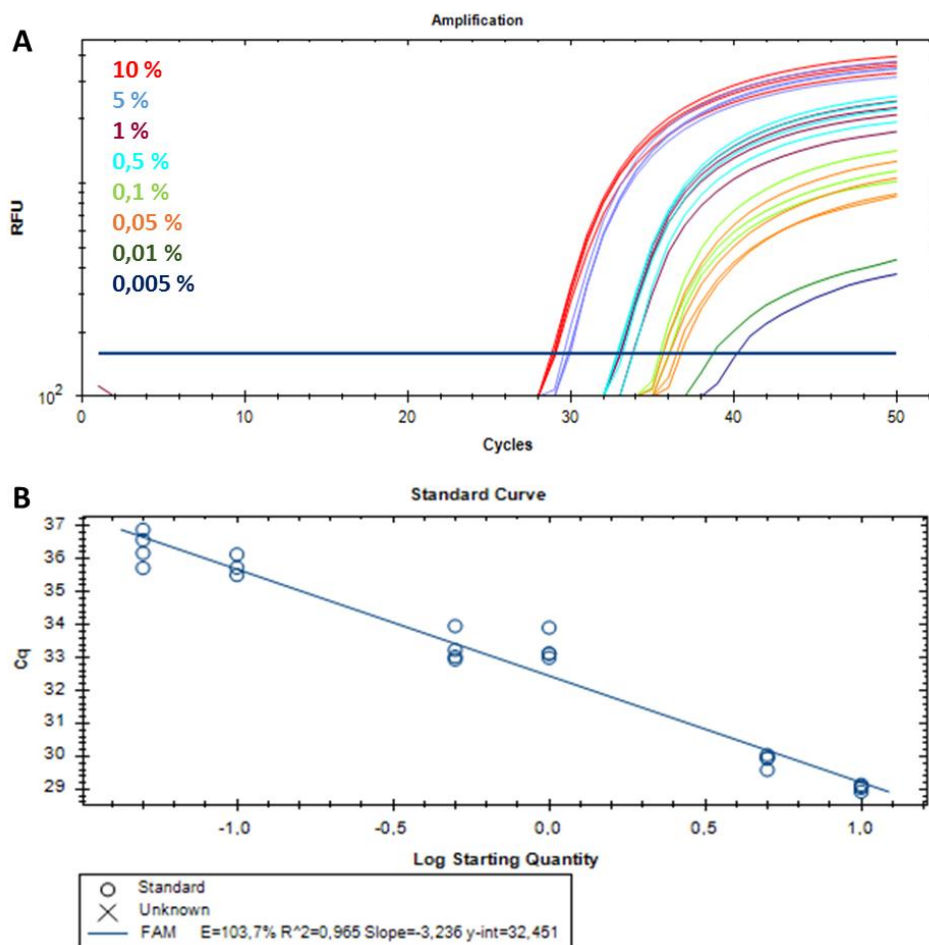


Figura 53 - Curvas de amplificação (A) e respetiva curva de calibração (B) obtidas por PCR em tempo real com os *primers* Ana3-F/Ana3-R e sonda Ana3-P utilizando os extratos a 50 ng/μL de ADN das misturas modelo de caju em farinha (PCW) ($n=4$ réplicas).

Normalização e validação do método

A normalização do método foi obtida com a amplificação simultânea de um gene eucariota universal (18S rARN) e do gene específico Ana o 3 das misturas modelo de caju em farinha de trigo (Figura 54). Os parâmetros do sistema normalizado foram de acordo com os valores recomendados, tendo-se confirmado o LD relativo de 500 mg/kg. De salientar que nas misturas de 100, 50 e 10 mg/kg amplificaram 6, 4 e 3, respetivamente das 8 réplicas, sugerindo que nas condições adequadas o sistema poderá atingir uma sensibilidade de 10 mg/kg. Para a construção da curva de calibração normalizada apenas as concentrações com 100% das réplicas positivas foram consideradas (Figura 54 e Tabela 23).

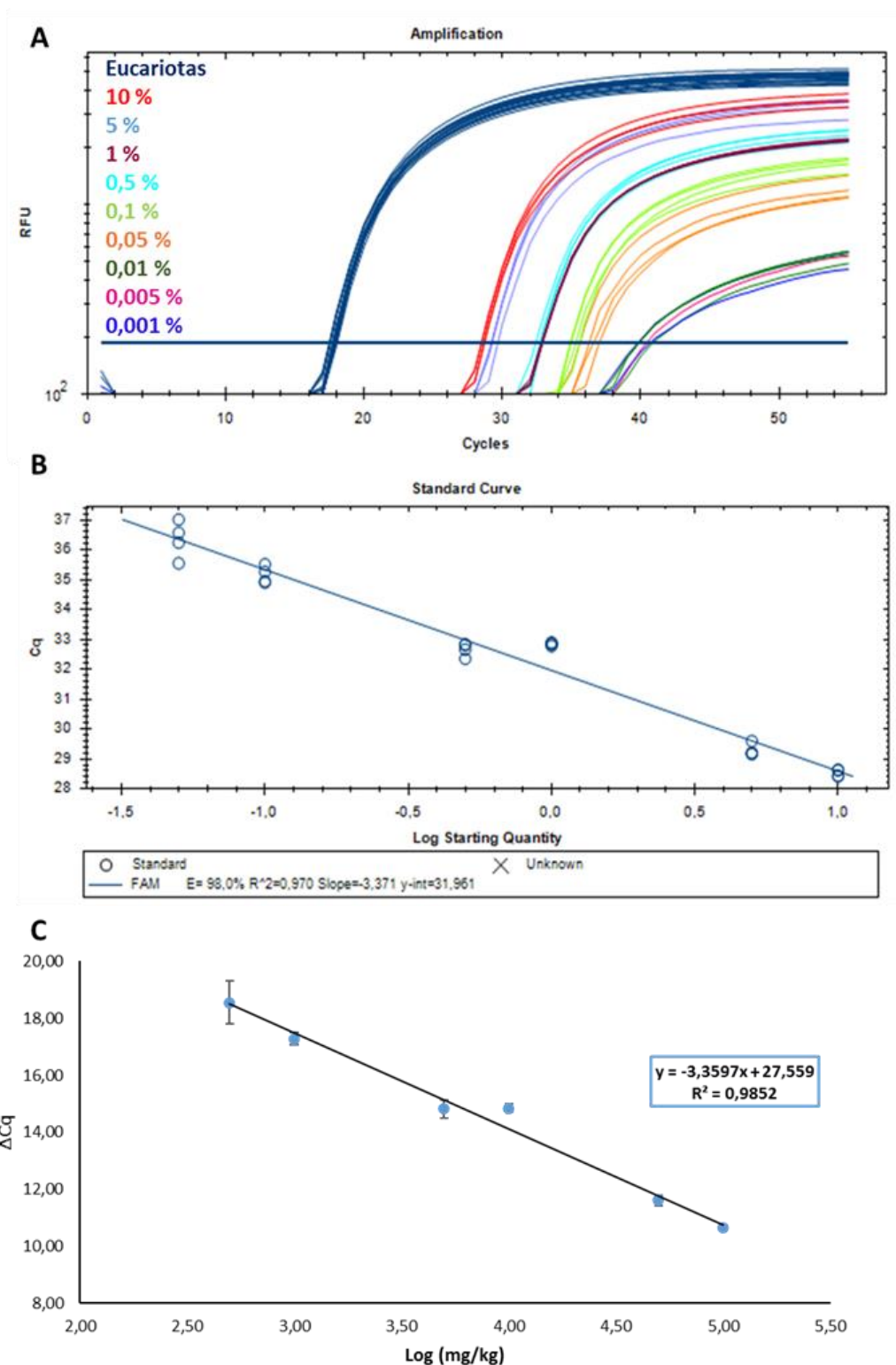


Figura 54 – Curvas de amplificação (A) e respectivas curvas de calibração não normalizada (B) e normalizada (C) obtidas a partir dos ensaios de PCR em tempo real com os *primers* Ana3-F/Ana3-R e sonda Ana3-P com os extratos a 50 ng/μL de ADN das misturas modelo de caju em farinha de trigo (PCW), para normalização do sistema.

Tabela 23 - Resultados normalizados obtidos por PCR em tempo real com os *primers* Ana 3-F/Ana3-R e sonda Ana3-P (amplificação específica) e os *primers* EG-F/EG-R e sonda EG-P (gene endógeno universal) para as misturas de caju em farinha de trigo (PCW)

Caju (%)	$\Delta Cq \pm DP$
10	10,66 \pm 0,08 (8/8)
5	11,61 \pm 0,18 (8/8)
1	14,84 \pm 0,15 (8/8)
0,5	14,81 \pm 0,31 (8/8)
0,1	17,28 \pm 0,22 (8/8)
0,05	18,55 \pm 0,74 (8/8)
<hr/>	
Coefficiente de correlação (R^2)	0,9852
Declive	-3,3597
Eficiência da PCR (%)	98,4

Valores entre parêntesis correspondem (número de réplicas positivas/número de réplicas total).

O método foi validado com quatro misturas cegas (8%, 4%, 2,5% e 0,25%), que foram determinadas amplificando com os *primers* do gene endógeno em duplicado e com os *primers* específicos ao alergénio Ana o 3 em quadruplicado. Os resultados permitiram validar o sistema proposto, pois os valores estimados apresentaram erros inferiores a 25%, o que está de acordo com os critérios de validação para este tipo de ensaios.

Tabela 24 – Estimativa das percentagens de caju adicionadas em amostras cegas de caju em farinha de trigo a partir das PCR com os *primers* Ana3-F/Ana3-R e sonda Ana3-P.

Amostra cega	Valor real (mg/kg)	Valor estimado (média \pm DP) (mg/kg)*	CV (%)	Erro (%)**
PCW13	80000	67879 \pm 3273	4,8	-15,15
PCW14	40000	41909 \pm 9937	23,7	4,77
PCW15	25000	23118 \pm 7322	31,7	-7,53
PCW16	2500	2361 \pm 352	14,9	-5,57

* média dos resultados obtidos dos dois ensaios ($n=8$) \pm desvio padrão; ** Erro (%) = ((valor estimado-valor real)/valor real) x 100, CV – coeficiente de variação.

Os valores de LD relativos obtidos de 100 mg/kg (Ana o 2) e 500 mg/kg (Ana o 3) são superiores aos 10 mg/kg com misturas modelo de caju em farinha de milho reportados por Wang *et al.* (2011) para um sistema multiplex com alvo no Ana o 3. No caso das misturas modelo de caju em farinha de trigo (PCW), ocorreram amplificações de algumas réplicas até ao nível 50 mg/kg e 10 mg/kg. Comparativamente, o método de PCR em tempo real com sondas descrito por Lopez-Calleja *et al.* (2015) para a quantificação

específica de caju em farinha de trigo alega um LD relativo de 0,1 mg/kg, que é muito inferior aos descritos neste estudo. Os genes Ana o 2 e Ana o 3 são genes unicópia enquanto a região ITS é multicópia, pelo que os limites de deteção não deverão ser comparados.

Aplicação dos modelos de quantificação propostos a misturas modelo de biscoitos de caju

Na vertente de se aplicar os métodos desenvolvidos na análise de alimentos reais, prepararam-se e testaram-se biscoitos modelo de caju. Com o intuito de se avaliar o efeito de processamento na performance quantitativa dos sistemas de PCR em tempo real os biscoitos de caju foram analisados como matriz crua (massas antes de cozerem) e processada após cozedura em forno a 180°C durante 15 min.

PCR em tempo real com sondas TaqMan™ no gene Ana o 2

Efetou-se numa primeira abordagem a avaliação das massas modelo para biscoitos de caju (BCM) a 50 ng/μL de ADN ($n=4$), obtendo-se as curvas de amplificação e respetiva curva de calibração apresentadas na Figura 55. De seguida, avaliaram-se os biscoitos modelo de caju (BC) nas mesmas condições (Figura 56). Relativamente às massas cruas (Figura 55), o sistema permitiu amplificar o caju com um LD relativo de 100 mg/kg. No caso dos biscoitos (Figura 56), o LD relativo foi superior ao das misturas cruas, atingindo os 500 mg/kg. Em cada um dos ensaios os parâmetros das curvas de validação estão de acordo com os intervalos recomendados apresentando coeficientes de correlação de 0,982 e 0,991, declives de -3,347 e 3,392 com eficiências de 99,0% e 97,1%, respetivamente para as massas e respetivos biscoitos. No caso dos biscoitos, o sistema amplificou de 50% e 100% das réplicas de 100 mg/kg e 50 mg/kg, respetivamente, sugerindo que o LD para este sistema poderá ainda ser otimizado.

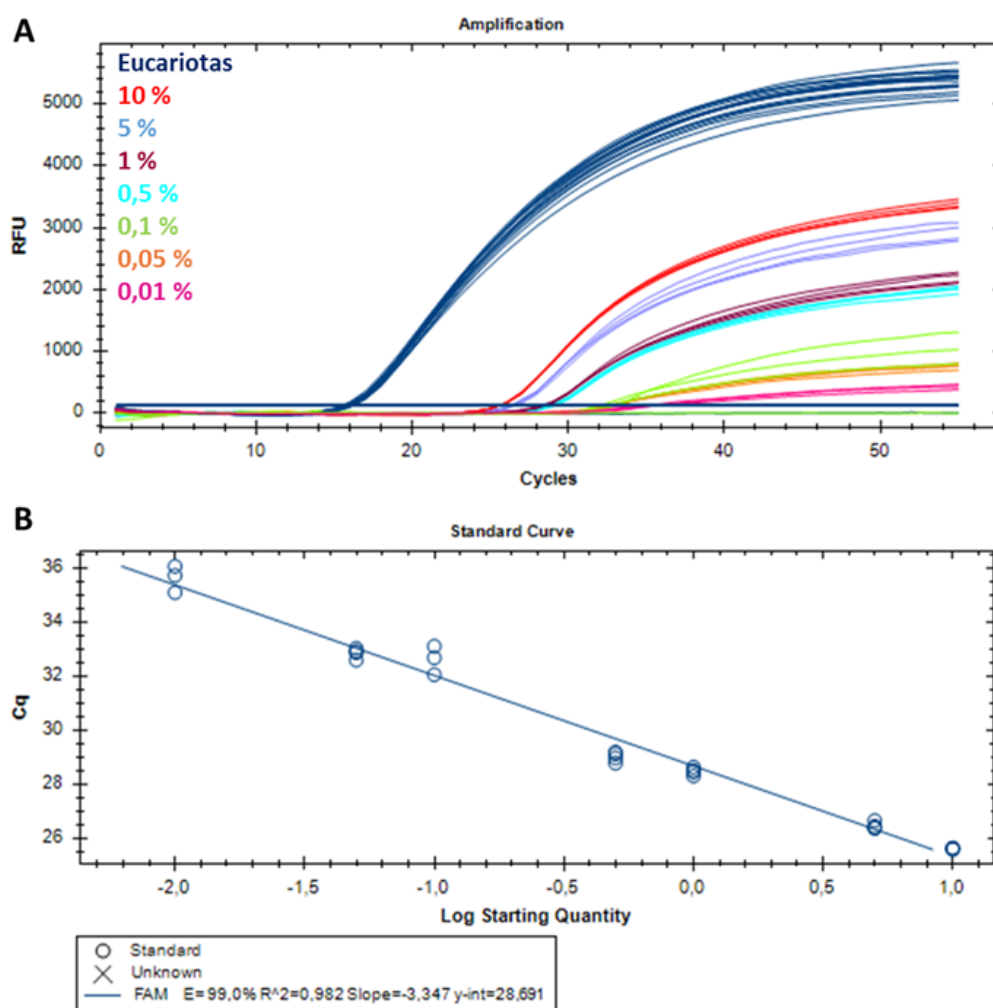


Figura 55 - Curvas de amplificação (A) e respetiva curva de calibração não normalizada (B) obtidas por PCR em tempo real com os *primers* Ana2-F/Ana2-R e sonda Ana2-P utilizando os extratos das massas para biscoitos de caju (BCM) 50 ng/μL ($n=4$ réplicas).

Normalização e validação do método

Procedeu-se ao tratamento dos resultados obtidos da amplificação eucariota e do gene específico Ana o 2, utilizando o método do ΔCq . Ambas as curvas de calibração normalizadas obtidas para as massas cruas e respetivos biscoitos (Figura 57) possuem um coeficiente de correlação, um declive e uma eficiência dentro dos parâmetros recomendados (Tabela 25) (Bustin *et al.*, 2009; ENGL, 2015). De referir que com este sistema, os LD relativos foram diferentes para o caso das amostras cruas e processadas, tendo-se obtido uma aparente maior sensibilidade (100 mg/kg) para as misturas modelo cruas. Este fenómeno poderá resultar da ação do calor durante o processo de cozedura a 180°C durante 15 min, provocando a degradação do ADN.

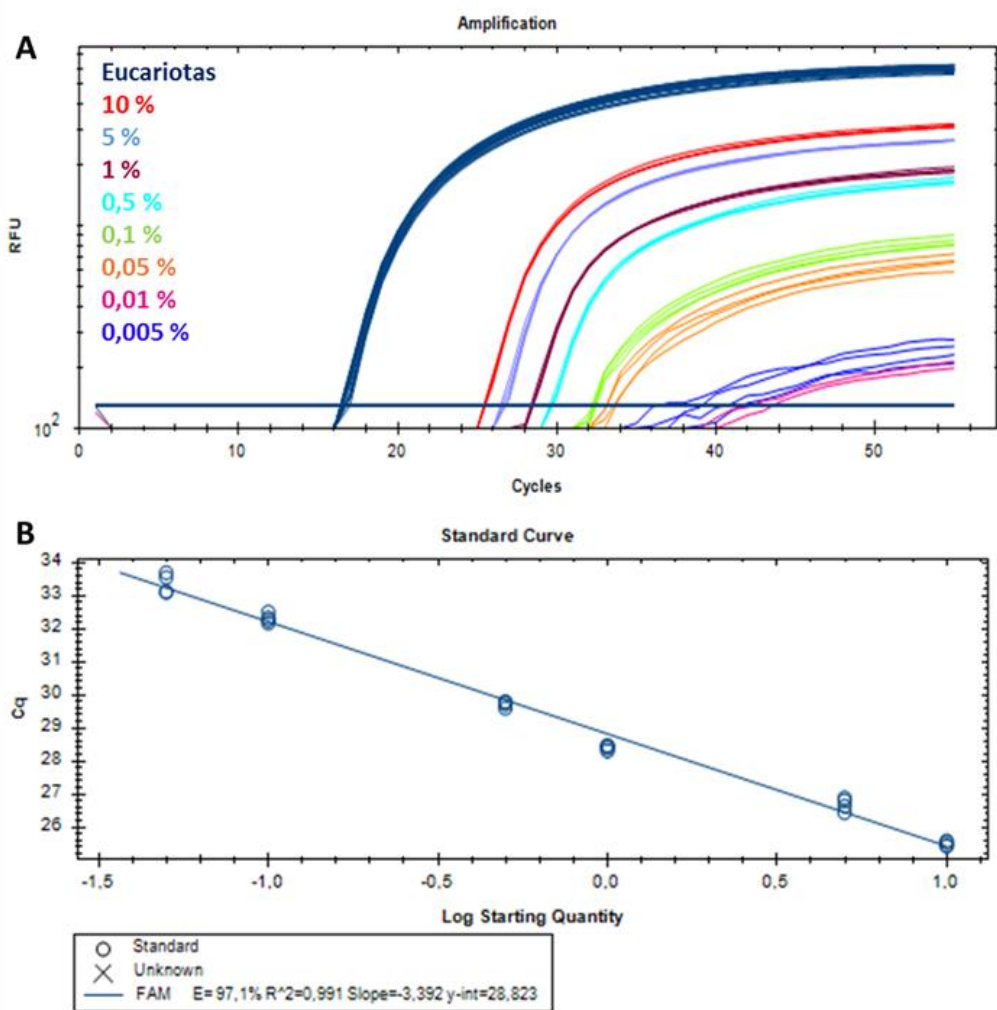


Figura 56 - Curvas de amplificação (A) e respetiva curva de calibração não normalizada (B) obtidas por PCR em tempo real com os *primers* Ana2-F/Ana2-R e sonda Ana2-P utilizando os extratos dos biscoitos de caju (BC) 50 ng/μL ($n=4$ réplicas).

Tabela 25 - Resultados normalizados obtidos por PCR em tempo real com os *primers* Ana2-F/Ana2-R e sonda Ana2-P (amplificação específica) e os *primers* EG-F/EG-R e sonda EG-P (gene endógeno universal) para as misturas modelo de massa e biscoitos de caju.

Misturas modelo	Não processadas	Processadas
Caju (%)	Δ Cq \pm DP	Δ Cq \pm DP
10	9,52 \pm 0,02 (4/4)	9,01 \pm 0,08 (4/4)
5	10,40 \pm 0,13 (4/4)	9,95 \pm 0,20 (4/4)
1	12,38 \pm 0,14 (4/4)	11,87 \pm 0,08 (4/4)
0,5	13,15 \pm 0,18 (4/4)	13,00 \pm 0,09 (4/4)
0,1	16,86 \pm 0,53 (4/4)	15,87 \pm 0,14 (4/4)
0,05	16,97 \pm 0,19 (4/4)	16,48 \pm 0,30 (4/4)
0,01	19,83 \pm 0,49 (4/4)	-
Coeficiente de correlação (R ²)	0,9872	0,9937
Declive	-3,4900	-3,3362
Eficiência da PCR (%)	93,4	99,4

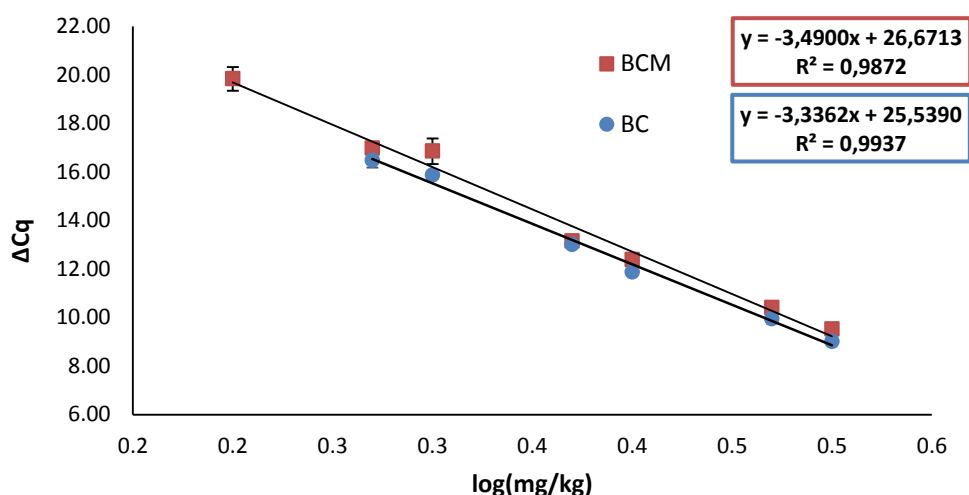


Figura 57 – Comparação das curvas de calibração normalizadas obtidas por PCR em tempo real utilizando os extratos das massas (BCM) e respectivos biscoitos (BC).

Quanto à validação da técnica, apenas duas amostras de cada ensaio apresentaram erros relativos abaixo dos 25%: BCM 14 e BCM15 (Tabela 26); BC13 e BC14 (Tabela 27). Considerando que cada mistura modelo de biscoitos de caju resultou da mesma amostragem, o erro associado a cada ponto devia ser repetido, o que não é o caso. Nos pontos de menor concentração pode haver maior dispersão de resultados, no entanto, as amostras BCM 14 e 15 apresentam erros relativos inferiores a 25% em relação ao valor real de cada amostra. Dado que a mistura de 4% de biscoito de caju foi preparada por diluição seriada (Tabela 7), sendo retirada uma porção de mistura (que foi imediatamente congelada a -20°C) e o restante processado a 180°C durante 15 min, os erros associados à sua determinação pelas respectivas curvas de calibração deveriam ser semelhantes.

Tabela 26 - Estimativa das percentagens de caju adicionadas em amostras cegas de massas de biscoitos de caju a partir das PCR com os *primers* Ana2-F/Ana2-R e sonda Ana2-P.

Amostra cega	Valor real (mg/kg)	Valor estimado (média ± DP) (mg/kg)*	Coefficiente de variação (%)	Erro (%)**
BCM12	80000	53624 ± 2307	2,9	-32,97
BCM13	40000	27293 ± 1970	4,9	-31,77
BCM14	20000	15960 ± 1695	8,5	-20,20
BCM15	2000	1863 ± 390	6,4	-6,83

*média ± desvio padrão (n=4); ** Erro (%) = ((valor estimado-valor real)/valor real) x 100, CV – coeficiente de variação.

Tabela 27 – Estimativa das percentagens de caju adicionadas em amostras cegas de biscoitos de caju processados a partir das PCR com os *primers* Ana2-F/Ana2-R e sonda Ana2-P.

Amostra cega	Valor real (mg/kg)	Valor estimado (média ± DP) (mg/kg)*	Coefficiente de variação (%)	Erro (%)**
BC12	80000	53307 ± 3511	4,4	-33,37
BC13	40000	31912 ± 2729	6,8	-20,22
BC14	20000	17558 ± 991	5,0	-12,21
BC15	2000	1302 ± 281	14,1	-34,92

*média ± desvio padrão (n=4); ** Erro (%) = ((valor estimado-valor real)/valor real) x 100, CV – coeficiente de variação.

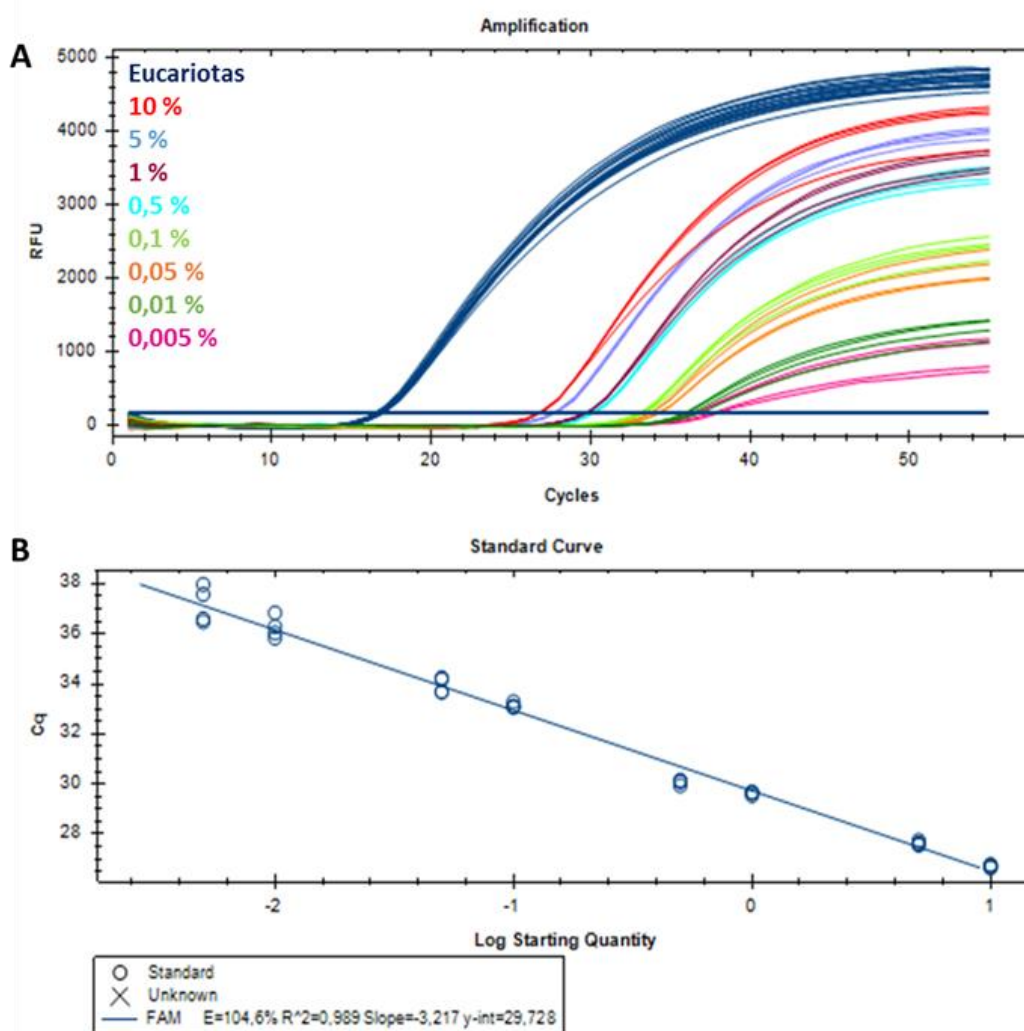


Figura 58 – Curvas de amplificação (A) e respetiva curva de calibração não normalizada (B) obtidas por PCR em tempo real com os *primers* Ana3-F/Ana3-R e sonda Ana3-P utilizando os extratos a 50 ng/μL das massas para biscoitos de caju (BCM) (n=4 réplicas).

PCR em tempo real com sondas TaqMan™ no gene Ana o 3

O sistema Ana3-F/Ana3-R amplificou o alvo caju com LD relativos efetivos de 50 mg/kg para as massas e respetivos biscoitos de caju (Figuras 58 e 59), com parâmetros de performance de cada ensaio dentro dos critérios recomendados (Bustin *et al.*, 2009; ENGL, 2015).

As misturas modelo com 10 mg/kg de caju amplificaram 4 das 8 réplicas no caso das massas cruas, e 3 das 8 réplicas nos biscoitos, sugerindo que o sistema poderá ter maior sensibilidade.

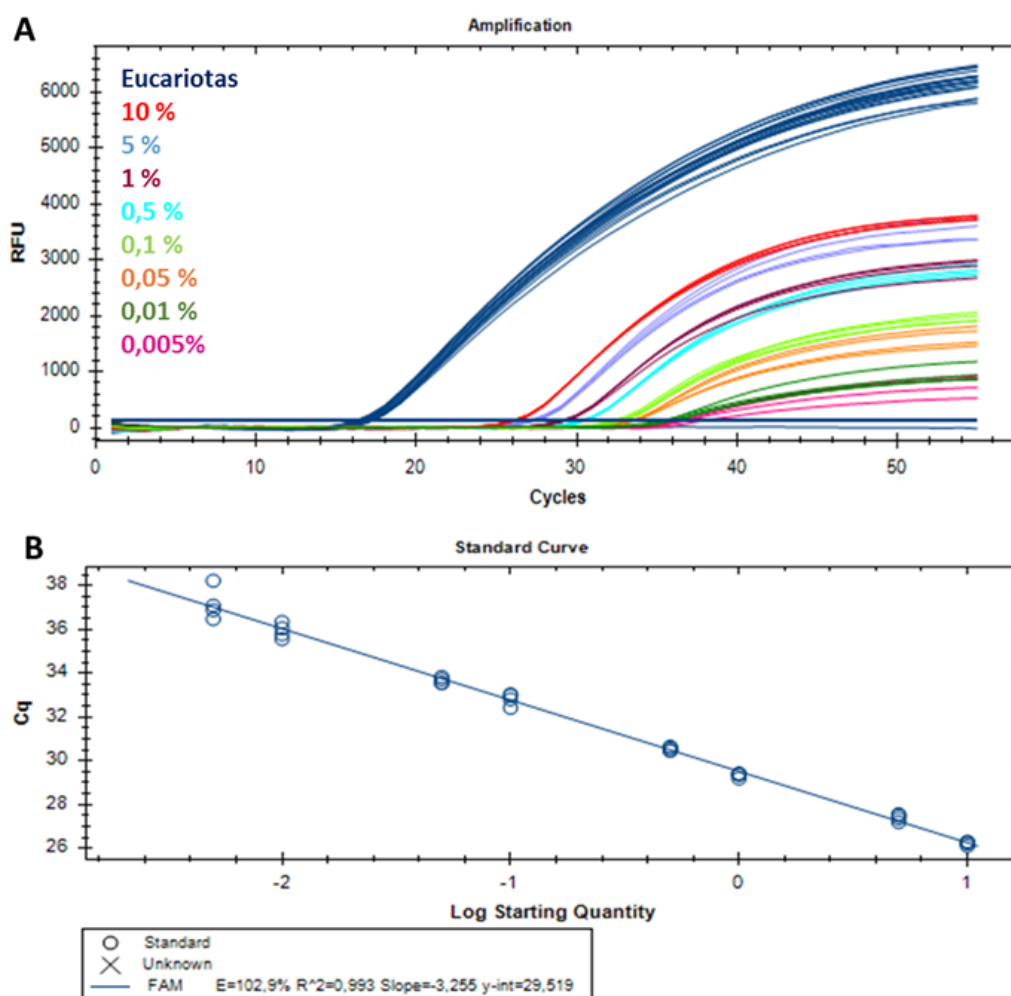


Figura 59 – Curvas de amplificação (A) e respetiva curva de calibração não normalizada (B) obtidas por PCR em tempo real com os *primers* Ana3-F/Ana3-R e sonda Ana3-P utilizando os extratos a 50 ng/μL dos biscoitos modelo de caju (BC) ($n=4$ réplicas).

Normalização e validação do método

Quanto à normalização e validação do método, analisaram-se os resultados de pelo método do ΔCq para construir as curvas de calibração normalizadas associadas às

massas modelo cruas (BC) e respectivos biscoitos de caju (BC) (Tabela 28, Figura 60). Ambas as curvas de calibração normalizadas apresentaram bons parâmetros de coeficiente de correlação, declive e eficiência de reação, estando de acordo com os critérios recomendados (Bustin *et al.*, 2009; ENGL, 2015).

Tabela 28 – Resultados normalizados obtidos por PCR em tempo real com os *primers* Ana3-F/Ana3-R e sonda Ana3-P (amplificação específica) e os *primers* EG-F/EG-R e sonda EG-P (gene endógeno universal) para as misturas modelo de massas e respectivos biscoitos de caju.

Misturas modelo	Não processadas	Processadas
Caju (%)	$\Delta Cq \pm DP$	$\Delta Cq \pm DP$
10	10,18 \pm 0,27 (8/8)	9,59 \pm 0,09 (8/8)
5	10,87 \pm 0,14 (8/8)	10,27 \pm 0,20 (8/8)
1	13,12 \pm 0,24 (8/8)	12,52 \pm 0,16 (8/8)
0,5	13,69 \pm 0,14 (8/8)	13,65 \pm 0,36 (8/8)
0,1	16,58 \pm 0,22 (8/8)	16,26 \pm 0,23 (8/8)
0,05	17,31 \pm 0,57 (8/8)	16,68 \pm 0,42 (8/8)
0,01	19,47 \pm 0,72 (8/8)	18,93 \pm 0,29 (8/8)
0,005	21,69 \pm 1,27 (8/8)	21,17 \pm 0,90 (8/8)
Coeficiente de correlação (R^2)	0,9894	0,9909
Declive	-3,3731	-3,3825
Eficiência da PCR (%)	97,9	97,5

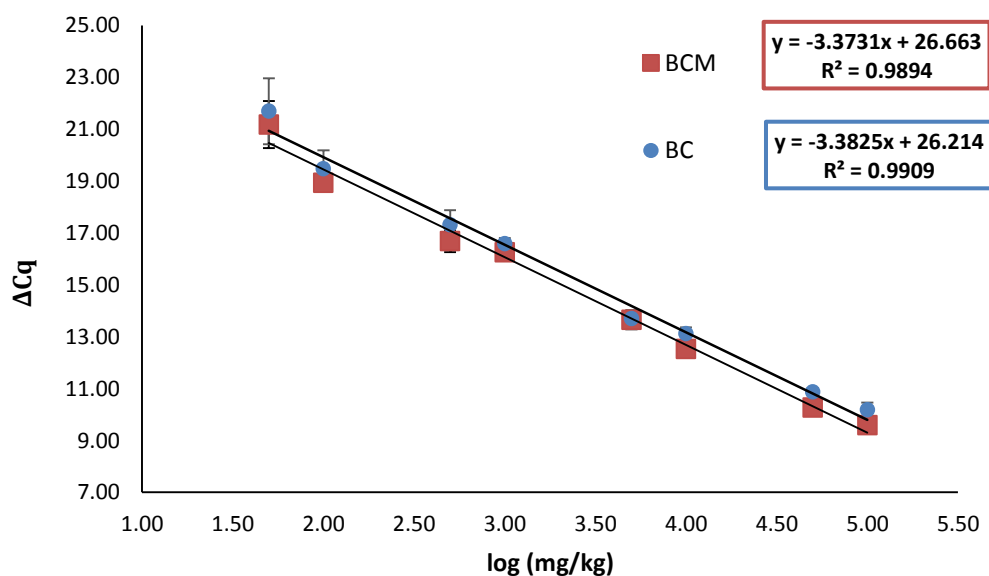


Figura 60 – Comparação das curvas de calibração normalizadas obtidas por PCR em tempo real utilizando os extratos das misturas modelo de massas e respectivos biscoitos de caju.

As estimativas das misturas cegas para biscoitos apresentaram erros relativos inferiores a 25% em comparação com os valores reais (Tabela 29), pelo que confirma a exatidão do método para a quantificação em matriz não processada. Quanto à validação do método para os biscoitos de caju, os valores obtidos para 4% e 2% apresentaram um erro relativo inferior a 25% (Tabela 30). Estes resultados não eram esperados, mas foram concordantes com os valores de erro apresentados para o sistema Ana o 2.

Tabela 29 - Estimativa das percentagens de caju adicionadas em massas cegas para biscoitos de caju a partir das PCR com os *primers* Ana3-F/Ana3-R e sonda Ana3-P.

Amostra cega	Valor real (mg/kg)	Valor estimado (média±DP) (mg/kg)*	Coefficiente de variação (%)	Erro (%)**
BCM12	80000	62572 ± 2798	4,5	-21,79
BCM13	40000	35201 ± 4117	11,7	-12,00
BCM14	20000	16292 ± 1922	11,8	-18,54
BCM15	2000	1676 ± 390	23,3	-16,54

* média dos resultados obtidos dos dois ensaios ($n = 8$) ± desvio padrão; ** Erro (%) = ((valor estimado-valor real)/valor real) x 100, CV – coeficiente de variação.

Tabela 30 - Estimativa das percentagens de caju adicionadas em biscoitos de caju cegos a partir das PCR com os *primers* Ana3-F/Ana3-R e sonda Ana3-P.

Amostra cega	Valor real (mg/kg)	Valor estimado (média±DP) (mg/kg)*	Coefficiente de variação (%)	Erro (%)**
BC12	80000	54632 ± 5815	10,6	-31,71
BC13	40000	32154 ± 3566	11,1	-19,61
BC14	20000	15117 ± 1433	9,5	-24,41
BC15	2000	1425 ± 53	3,7	-28,73

* média dos resultados obtidos dos dois ensaios ($n = 8$) ± desvio padrão; ** Erro (%) = ((valor estimado-valor real)/valor real) x 100, CV – coeficiente de variação.

Os resultados obtidos por normalização dos dois sistemas na quantificação do caju em misturas modelo de biscoitos são comparáveis com os reportados na literatura com alvo no gene Ana o 3. Existem dois métodos de PCR para a quantificação de caju em modelos reais processados com LD relativo de 100 mg/kg, limite superior ao obtido com os dois sistemas (Ana2-F/R; Ana3-F/R) (Brzezinski 2006; Pikhova *et al.*, 2007). Três outros referem LD relativos entre 2 e 32 mg/kg, inferiores aos alcançados neste trabalho (Ehlert *et al.*, 2009, 2008; Koppel *et al.*, 2012).

CONCLUSÃO

Neste trabalho, foram propostos métodos baseados na PCR qualitativa para a detecção de alergénios do caju com alvo em três genes que codificam para as proteínas alergénicas Ana o 1, Ana o 2 e Ana o 3. Em termos qualitativos absolutos, todos os sistemas permitiram a amplificação de 1 pg de ADN de caju (que corresponde a 2 cópias de ADN genómico do caju), tendo este sido considerado como o limite de detecção absoluto. Em termos de detecção relativa, cada sistema apresentou um comportamento distinto, variando entre sensibilidades de 500 a 50 mg/kg de caju em diferentes matrizes. Das matrizes testadas, as misturas modelo de massas e respetivos biscoitos de caju parecem exercer menor efeito negativo na amplificação do alvo, mesmo após o processamento térmico dos mesmos. Os sistemas Ana o 2 e Ana o 3 foram os que apresentaram maior reprodutibilidade de resultados, assim como melhores sensibilidades.

Usando os mesmos marcadores genéticos, foram também propostos três sistemas de PCR em tempo real com o corante de fluorescência EvaGreen. Contudo, estes sistemas apresentaram falta de reprodutibilidade para a detecção relativa de caju em matrizes complexas, como resultado de amplificações de fragmentos não-alvo e baixa sensibilidade, pelo que não foram considerados metodologias adequadas para a quantificação do caju.

Dois sistemas de PCR em tempo real com recurso a sondas de hidrólise foram desenvolvidos com alvo nos marcadores genéticos Ana o 2 e Ana o 3, permitindo a detecção e quantificação do caju com sensibilidades absolutas (1 pg) e relativas adequadas (100 e 500 mg/kg, respetivamente) em matrizes complexas. A normalização dos métodos, recorrendo à amplificação simultânea de um gene de referência endógeno (18S rARN) e de um gene específico (Ana o 2 ou Ana o 3), permitiu o desenvolvimento de dois métodos quantitativos para o caju. Estes métodos foram validados com a amplificação de misturas modelo de caju em farinha de trigo como amostras desconhecidas, tendo-se verificado uma boa exatidão e precisão dos métodos por análise dos erros relativos (<25%). Estes sistemas normalizados e validados foram também aplicados com sucesso às misturas modelo de massas e biscoitos de caju. O sistema com melhor performance para este tipo de amostras correspondeu ao Ana o 3, o qual não pareceu ser afetado pelo grau de processamento das misturas, tendo-se estabelecido uma sensibilidade de 50 mg/kg de caju em massas e respetivos biscoitos.

Em sumário, neste trabalho foram apresentados métodos qualitativos como técnicas rápidas para a detecção de caju em alimentos. Para a quantificação de caju foram

desenvolvidos com sucesso dois métodos quantitativos normalizados que podem ser aplicáveis a diferentes matrizes alimentares contendo caju.

BIBLIOGRAFIA

- Allen, K. J., Remington, B. C., Baumert, J. L., Crevel, R. W. R., Houben, G. F., *et al.* (2014). Allergen reference doses for precautionary labeling (VITAL 2.0): Clinical implications. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(1): 156-164.
- ALLERGEN. World Health Organization and International Union of Immunological Societies (WHO/IUIS) allergen Nomenclature Sub-committee official site for the systematic allergen nomenclature. 2016 [cited 2016 June]. Available from: <http://www.allergen.org/>.
- Alves, R., Barroso, M., González-García, M., Oliveira, M., & Delerue-Matos, M. (2015). New trends in food allergens detection: towards biosensing strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.
- Barg, W., Medrala, W., & Wolanczyk-Medrala, A. (2011). Exercise-Induced Anaphylaxis: An Update on Diagnosis and Treatment. *Current Allergy and Asthma Reports*, 11(1): 45-51.
- Barre, A., Jacquet, G., Sordet, C., Culerrier, R., & Rouge, P. (2007). Homology modelling and conformational analysis of IgE-binding epitopes of Ara h 3 and other legumin allergens with a cupin fold from tree nuts. *Molecular Immunology*, 44(12): 3243-3255.
- Barre, A., Sordet, C., Culerrier, R., Rance, F., Didier, A., *et al.* (2008). Vicilin allergens of peanut and tree nuts (walnut, hazelnut and cashew nut) share structurally related IgE-binding epitopes. *Molecular Immunology*, 45(5): 1231-1240.
- Bignardi, C., Elviri, L., Penna, A., Careri, M., & Mangia, A. (2010). Particle-packed column versus silica-based monolithic column for liquid chromatography-electrospray-linear ion trap-tandem mass spectrometry multiallergen trace analysis in foods. *Journal of Chromatography A*, 1217(48): 7579-7585.
- Bignardi, C., Mattarozzi, M., Penna, A., Sidoli, S., Elviri, L., *et al.* (2013). A Rapid Size-Exclusion Solid-Phase Extraction Step for Enhanced Sensitivity in Multi-Allergen Determination in Dark Chocolate and Biscuits by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods*, 6(4): 1144-1152.
- Boyce, J. A., Assa'ad, A., Burks, A. W., Jones, S. M., Sampson, H. A., *et al.* (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(6 Suppl): S1-58.
- Breiteneder, H., & Ebner, C. (2000). Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106(1): 27-36.
- Breiteneder, H., & Mills, E. N. C. (2005). Plant food allergens - structural and functional aspects of allergenicity. *Biotechnology Advances*, 23(6): 395-399.
- Breiteneder, H., & Radauer, C. (2004). A classification of plant food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113(5): 821-830.
- Brzezinski, J. L. (2006). Detection of cashew nut DNA in spiked baked goods using a real-time polymerase chain reaction method. *Journal of Aoac International*, 89(4): 1035-1038.
- Burks, A. W., Tang, M. M., Sicherer, S., Muraro, A., Eigenmann, P. A., *et al.* (2012). ICON: Food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129(4): 906-920.

- Bustin, S., Benes, V., Garson, J., Hellemans, J., Huggett, J., *et al.* (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4): 611-622.
- Chapman, M. D., Pomes, A., Breiteneder, H., & Ferreira, F. (2007). Nomenclature and structural biology of allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119(2): 414-420.
- Cho, C. Y., Nowatzke, W., Oliver, K., & Garber, E. A. E. (2015). Multiplex detection of food allergens and gluten. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(14): 4195-4206.
- Clark, A. T., Anagnostou, K., & Ewan, P. W. (2007). Cashew nut causes more severe reactions than peanut: case-matched comparison in 141 children. *Allergy*, 62(8): 913-916.
- CODEX-STAN-1. Amended in 1991, 1999, 2001, 2003, 2005, 2008 and 2010 regarding the general standard for the labelling of pre-packaged foods. FAO/WHO Standards: Official Codex Standards 1985; 1985 [cited 2015 November]. Available from: <http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/>.
- Costa, J., Carrapatoso, I., Oliveira, M., & Mafra, I. (2014). Walnut allergens: molecular characterization, detection and clinical relevance. *Clinical and Experimental Allergy*, 44(3): 319-341.
- Costa, J., Mafra, I., Carrapatoso, I., & Oliveira, M. (2012). Almond Allergens: Molecular Characterization, Detection, and Clinical Relevance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(6): 1337-1349.
- Costa, J., Mafra, I., Carrapatoso, I., & Oliveira, M. (2015). Hazelnut allergens: molecular characterization, detection and clinical relevance. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*.
- Costa, J., Mafra, I., Kuchta, T., & Oliveira, M. (2012). Single-Tube Nested Real-Time PCR as a New Highly Sensitive Approach to Trace Hazelnut. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(33): 8103-8110.
- Costa, J., Mafra, I., & Oliveira, M. (2012). High resolution melting analysis as a new approach to detect almond DNA encoding for Pru du 5 allergen in foods. *Food Chemistry*, 133(3): 1062-1069.
- Costa, J., Oliveira, M., & Mafra, I. (2013). Novel approach based on single-tube nested real-time PCR to detect almond allergens in foods. *Food Research International*, 51(1): 228-235.
- Crevel, R. W. R., Ballmer-Weber, B. K., Holzhauser, T., Hourihane, J. O., Knulst, A. C., *et al.* (2008). Thresholds for food allergens and their value to different stakeholders. *Allergy*, 63(5): 597-609.
- Crevel, R. W. R., Baumert, J., Baka, A., Houben, G., Knulst, A., *et al.* (2014). Development and evolution of risk assessment for food allergens. *Food and Chemical Toxicology*, 67: 262-276.
- Crevel, R. W. R., Baumert, J., Luccioli, S., Baka, A., Hattersley, S., *et al.* (2014). Translating reference doses into allergen management practice: Challenges for stakeholders. *Food and Chemical Toxicology*, 67: 277-287.
- Cunsolo, V., Muccilli, V., Saletti, R., & Foti, S. (2014). Mass spectrometry in food proteomics: a tutorial. *Journal of Mass Spectrometry*, 49(9): 768-784.
- Davoren, M., & Peake, J. (2005). Cashew nut allergy is associated with a high risk of anaphylaxis. *Archives of Disease in Childhood*, 90(10): 1084-1085.

- de Leon, M. P., Glaspole, I. N., Drew, A. C., Rolland, J. M., O'Hehir, R. E., *et al.* (2003). Immunological analysis of allergenic cross-reactivity between peanut and tree nuts. *Clinical and Experimental Allergy*, 33(9): 1273-1280.
- de Silva, I. L., Mehr, S. S., Tey, D., & Tang, M. L. K. (2008). Paediatric anaphylaxis: a 5 year retrospective review. *Allergy*, 63(8): 1071-1076.
- Dhanaraj, A. L., Rao, E., Swamy, K. R. M., Bhat, M. G., Prasad, D. T., *et al.* (2002). Using RAPDs to assess the diversity in Indian cashew (*Anacardium occidentale* L.) germplasm. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 77(1): 41-47.
- Directive 2003/89/EC of November 2003 amending Directive 2000/13/EC regarding indication of the ingredients present in foodstuffs. *Official Journal of European Union*, L308: 15-18.
- Directive 2007/68/EC of 27 November 2007 amending Annex IIIa to Directive 2000/13/EC as regards certain food ingredients. *Official Journal of European Commission*, L310: 11-14.
- Eddy, N. O., Ukpong, J. A., & Ebenso, E. E. (2011). Lipids Characterization and Industrial Potentials of Pumpkin Seeds (*Telfairia occidentalis*) and Cashew Nuts (*Anacardium occidentale*). *E-Journal of Chemistry*, 8(4): 1986-1992.
- Ehlert, A., Demmel, A., Hupfer, C., Busch, U., & Engel, K. H. (2009). Simultaneous detection of DNA from 10 food allergens by ligation-dependent probe amplification. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 26(4): 409-418.
- Ehlert, A., Hupfer, C., Demmel, A., Engel, K. H., & Busch, U. (2008). Detection of Cashew Nut in Foods by a Specific Real-time PCR Method. *Food Analytical Methods*, 1(2): 136-143.
- ENGL. Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing - European Network of GMO Laboratories (ENGL): European Union Reference Laboratory; 2015 [cited 2016 January]. Available from: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/guidancedocs.htm>.
- Entink, R. H. K., Remington, B. C., Blom, W. M., Rubingh, C. M., Kruizinga, A. G., *et al.* (2014). Food allergy population thresholds: An evaluation of the number of oral food challenges and dosing schemes on the accuracy of threshold dose distribution modeling. *Food and Chemical Toxicology*, 70: 134-143.
- Faeste, C. K., Ronning, H. T., Christians, U., & Granum, P. E. (2011). Liquid Chromatography and Mass Spectrometry in Food Allergen Detection. *Journal of Food Protection*, 74(2): 316-345.
- FAOSTAT. The Statistics Division of the Food and Agriculture Organization of the United Nations: Economic and Social Development Department, Rome, Italy.; 2016 [updated 2014; cited 2016 February]. Available from: <http://faostat.fao.org/>.
- Fernandez, C., Fiandor, A., MartinezGarate, A., & Quesada, J. M. (1995). Allergy to pistachio: Crossreactivity between pistachio nut and other Anacardiaceae. *Clinical and Experimental Allergy*, 25(12): 1254-1259.
- Fleischer, D. M., Conover-Walker, M. K., Matsui, E. C., & Wood, R. A. (2005). The natural history of tree nut allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116(5): 1087-1093.
- García-Cañas, V., Cifuentes, A., & González, R. (2004). Detection of Genetically Modified Organisms in Foods by DNA Amplification Techniques. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(6): 425-436.

- Garcia, F., Moneo, I., Fernandez, B., Garcia-Menaya, J. M., Blanco, J., *et al.* (2000). Allergy to Anacardiaceae: Description of cashew and pistachio nut allergens. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology*, 10(3): 173-177.
- Gaskin, F. E., Niemann, L. M., Hefle, S. L., & Taylor, S. L. (2009). Validated Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Detection of Undeclared Cashew Nut Residues in Foods. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123(2): S245-S245.
- Gaskin, F. E., & Taylor, S. L. (2011). Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Detection of Cashew Nut in Foods. *Journal of Food Science*, 76(9): T218-T226.
- Gendel, S. M. (2012). Comparison of international food allergen labeling regulations. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 63(2): 279-285.
- Grigg, A. H., Celine, & Davis, C. M. (2009). Cashew Allergy Compared to Peanut Allergy in a US Tertiary Care Center. *Pediatric Asthma, Allergy & Immunology*, 22(3): 101-104.
- GRIN-USDA. Germplasm Resources Information Network - United States Department of Agriculture: United States Department of Agriculture, Betsville, MD, USA; 2010 [updated Mars 2010; cited 2016 June]. Available from: <http://www.ars-grin.gov/>.
- Guan, X. Y., Noble, K. A., Tao, Y. Q., Roux, K. H., Sathe, S. K., *et al.* (2015). Epitope mapping of 7S cashew antigen in complex with antibody by solution-phase H/D exchange monitored by FT-ICR mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 50(6): 812-819.
- Harrer, A., Egger, M., Gadermaier, G., Erler, A., Hauser, M., *et al.* (2010). Characterization of plant food allergens: An overview on physicochemical and immunological techniques. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(1): 93-112.
- Hasegawa, M., Inomata, N., Yamazaki, H., Morita, A., Kirino, M., *et al.* (2009). Clinical features of four cases with cashew nut allergy and cross-reactivity between cashew nut and pistachio. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*, 58(2): 209-215.
- Jenkins, J. A., Griffiths-Jones, S., Shewry, P. R., Breiteneder, H., & Mills, E. N. C. (2005). Structural relatedness of plant food allergens with specific reference to cross-reactive allergens: An in silico analysis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115(1): 163-170.
- Johnson, J., Malinovsky, A., Alving, K., Lidholm, J., Borres, M. P., *et al.* (2014). Ten-year review reveals changing trends and severity of allergic reactions to nuts and other foods. *Acta Paediatrica*, 103(8): 862-867.
- Johnson, P., Sancho, A., Crevel, R. W. R., & Mills, E. N. C. (2011). Detection of Allergens in Foods. In L. M. L. N. a. A. J. v. Hengel (Ed.), *Food allergens: Analysis Instrumentation and Methods*, (pp. 13-27): Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, FL, USA.
- Koppel, R., van Velsen-Zimmerli, F., & Bucher, T. (2012). Two quantitative hexaplex real-time PCR systems for the detection and quantification of DNA from twelve allergens in food. *European Food Research and Technology*, 235(5): 843-852.
- Kumar, S., Verma, A. K., Das, M., & Dwivedi, P. D. (2012). Molecular mechanisms of IgE mediated food allergy. *International Immunopharmacology*, 13(4): 432-439.
- Lack, G. (2008). Epidemiologic risks for food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(6): 1331-1336.

- Le, T. M., Lindner, T. M., Pasmans, S. G., Guikers, C. L. H., van Hoffen, E., *et al.* (2008). Reported food allergy to peanut, tree nuts and fruit: comparison of clinical manifestations, prescription of medication and impact on daily life. *Allergy*, 63(7): 910-916.
- Lopez-Calleja, I. M., de la Cruz, S., Gonzalez, I., Garcia, T., & Martin, R. (2015). Development of real-time PCR assays to detect cashew (*Anacardium occidentale*) and macadamia (*Macadamia intergrifolia*) residues in market analysis of processed food products. *Lwt-Food Science and Technology*, 62(1): 233-241.
- Luccioli, S. (2012). Food allergy guidelines and assessing allergic reaction risks: a regulatory perspective. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 12(3): 323-330.
- Mattison, C. P., Desormeaux, W. A., Wasserman, R. L., Yoshioka-Tarver, M., Condon, B., *et al.* (2014). Decreased Immunoglobulin E (IgE) Binding to Cashew Allergens following Sodium Sulfite Treatment and Heating. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(28): 6746-6755.
- Mattison, C. P., Grimm, C. C., & Wasserman, R. L. (2014). In vitro digestion of soluble cashew proteins and characterization of surviving IgE-reactive peptides. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58(4): 884-893.
- McWilliam, V., Koplin, J., Lodge, C., Tang, M., Dharmage, S., *et al.* (2015). The Prevalence of Tree Nut Allergy: A Systematic Review. *Current Allergy and Asthma Reports*, 15(9): 13.
- Mills, E. N. C., Jenkins, J., Marigheto, N., Belton, P. S., Gunning, A. P., *et al.* (2002). Allergens of the cupin superfamily. *Biochemical Society Transactions*, 30: 925-929.
- Mills, E. N. C., & Mackie, A. R. (2008). The impact of processing on allergenicity of food. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 8(3): 249-253.
- Mills, E. N. C., Sancho, A. I., Rigby, N. M., Jenkins, J. A., & Mackie, A. R. (2009). Impact of food processing on the structural and allergenic properties of food allergens. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(8): 963-969.
- Monaci, L., & Visconti, A. (2009). Mass spectrometry-based proteomics methods for analysis of food allergens. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 28(5): 581-591.
- Moneret-Vautrin, D. A. (2008). Epidemiology of food allergy. *Revue Francaise D Allergologie Et D Immunologie Clinique*, 48(3): 171-178.
- Moreno, F., & Clemente, A. (2008). 2S Albumin Storage Proteins: What Makes them Food Allergens? *The open biochemistry journal*, 2: 16-28.
- Moreno, F. J. (2007). Gastrointestinal digestion of food allergens: Effect on their allergenicity. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 61(1): 50-60.
- Pafundo, S., Gulli, M., & Marmiroli, N. (2010). Multiplex real-time PCR using SYBR (R) GreenER (TM) for the detection of DNA allergens in food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(5): 1831-1839.
- Pantoja-Uceda, D., Bruix, M., Santoro, J., Rico, M., Monsalve, R., *et al.* (2002). Solution structure of allergenic 2 S albumins. *Biochemical Society Transactions*, 30: 919-924.
- Pelz, B. J., & Bryce, P. J. (2015). Pathophysiology of Food Allergy. *Pediatric Clinics of North America*, 62(6): 1363-1375.
- Picariello, G., Mamone, G., Addeo, F., & Ferranti, P. (2011). The frontiers of mass spectrometry-based techniques in food allergenomics. *Journal of Chromatography A*, 1218(42): 7386-7398.

- Piknova, L., & Kuchta, T. (2007). Detection of cashew nuts in food by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Food and Nutrition Research*, 46(3): 101-104.
- Pilolli, R., Monaci, L., & Visconti, A. (2013). Advances in biosensor development based on integrating nanotechnology and applied to food-allergen management. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 47: 12-26.
- Prado, M., Ortea, I., Vial, S., Rivas, J., Calo-Mata, P., *et al.* (2015). Advanced DNA and protein-based methods for the detection of food allergens. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.
- Radauer, C., & Breiteneder, H. (2007). Evolutionary biology of plant food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120(3): 518-525.
- Radauer, C., Bublin, M., Wagner, S., Mari, A., & Breiteneder, H. (2008). Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(4): 847-852.
- Rance, F., Bidat, E., Bourrier, T., & Sabouraud, D. (2003). Cashew allergy: observations of 42 children without associated peanut allergy. *Allergy*, 58(12): 1311-1314.
- Raz, S. R., Liu, H., Norde, W., & Bremer, M. (2010). Food Allergens Profiling with an Imaging Surface Plasmon Resonance-Based Biosensor. *Analytical Chemistry*, 82(20): 8485-8491.
- Regulation (EU) No 1169/2011 of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers, amending Regulations (EC) No 1924/2006 and (EC) No 1925/2006 of the European Parliament and of the Council, and repealing Commission Directive 87/250/EEC, Council Directive 90/496/EEC, Commission Directive 1999/10/EC, Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council, Commission Directives 2002/67/EC and 2008/5/EC and Commission Regulation (EC) No 608/2004. *Official Journal of European Union*, L304: 18-63.
- Reitsma, M., Bastiaan-Net, S., Sforza, S., van der Valk, J. P. M., van Wijk, R. V., *et al.* (2016). Purification and Characterization of *Anacardium occidentale* (Cashew) Allergens Ana o 1, Ana o 2, and Ana o 3. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(5): 1191-1201.
- Rejeb, S. B., Abbott, M., Davies, D., Cleroux, C., & Delahaut, P. (2005). Multi-allergen screening immunoassay for the detection of protein markers of peanut and four tree nuts in chocolate. *Food Additives and Contaminants*, 22(8): 709-715.
- Robotham, J., Wang, F., Seamon, V., Teuber, S., Sathe, S., *et al.* (2005). Ana o 3, an important cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) allergen of the 2S albumin family. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115(6): 1284-1290.
- Robotham, J. M., Hoffman, G. G., Teuber, S. S., Beyer, K., Sampson, H. A., *et al.* (2009). Linear IgE-epitope mapping and comparative structural homology modeling of hazelnut and English walnut 11S globulins. *Molecular Immunology*, 46(15): 2975-2984.
- Rodriguez-Lazaro, D., & Hernandez, M. (2013). Real-time PCR in Food Science: Introduction. *Current Issues in Molecular Biology*, 15(2): 25-37.
- Ros, E. (2010). Health Benefits of Nut Consumption. *Nutrients*, 2(7): 652-682.
- Rouge, P., Thibau, F., Bourrier, T., Saggio, B., Culerrier, R., *et al.* (2011). Clinical relevance of IgE-binding cross-reactivity of allergens from cashew nut (*Anacardium occidentale*). *Revue Française D'Allergologie*, 51(1): 31-35.

- Sampson, H. A., Aceves, S., Bock, S. A., James, J., Jones, S., *et al.* (2014). Food allergy: A practice parameter update-2014. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134(5): 1016-1025.e1043.
- Schubert-Ullrich, P., Rudolf, J., Ansari, P., Galler, B., Fuhrer, M., *et al.* (2009). Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: an overview. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(1): 69-81.
- Sealey-Voyksner, J., Zweigenbaum, J., & Voyksner, R. (2016). Discovery of highly conserved unique peanut and tree nut peptides by LC-MS/MS for multi-allergen detection. *Food Chemistry*, 194: 201-211.
- Shahidi, F., & Tan, Z. (2008). Bioactive Compounds from Cashew Nut and Its Coproducts. In C. Alasalvar & F. Shahidi (Eds.), *Tree nuts: composition, phytochemicals, and health effects: an overview*: Boca Raton: Taylor & Francis Group, NY, USA.
- Shewry, P. R., & Halford, N. G. (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany*, 53(370): 947-958.
- Shewry, P. R., Napier, J. A., & Tatham, A. S. (1995). Seed storage proteins - structures and biosynthesis. *Plant Cell*, 7(7): 945-956.
- Sicherer, S. H., Furlong, T. J., Munoz-Furlong, A., Burks, A. W., & Sampson, H. A. (2001). A voluntary registry for peanut and tree nut allergy: Characteristics of the first 5149 registrants. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108(1): 128-132.
- Sicherer, S. H., & Sampson, H. A. (2010). Food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2): S116-S125.
- Sicherer, S. H., & Sampson, H. A. (2014). Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(2): 291-307.e295.
- Smith, C. J., & Osborn, A. M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *Fems Microbiology Ecology*, 67(1): 6-20.
- Su, M., Venkatachalam, M., Teuber, S. S., Roux, K. H., & Sathe, S. K. (2004). Impact of gamma-irradiation and thermal processing on the antigenicity of almond, cashew nut and walnut proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(10): 1119-1125.
- Taylor, S. L., Baumert, J. L., Kruizinga, A. G., Remington, B. C., Crevel, R. W. R., *et al.* (2014). Establishment of Reference Doses for residues of allergenic foods: Report of the VITAL Expert Panel. *Food and Chemical Toxicology*, 63: 9-17.
- Terras, F. R. G., Torrekens, S., Vanleuven, F., Osborn, R. W., Vanderleyden, J., *et al.* (1993). A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from Brassicaceae species. *FEBS Letters*, 316(3): 233-240.
- Teuber, S. S., Sathe, S. K., Peterson, W. R., & Roux, K. H. (2002). Characterization of the soluble allergenic proteins of cashew nut (*Anacardium occidentale* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22): 6543-6549.
- Untersmayr, E., & Jensen-Jarolim, E. (2008). The role of protein digestibility and antacids on food allergy outcomes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(6): 1301-1308.
- USDA. Food Composition Databases - Agricultural Research Service.: United States Department of Agriculture, Betsville, MD, USA; 2016 [cited 2016 June]. Available from: <https://ndb.nal.usda.gov/>.

- van der Valk, J. P. M., Dubois, A. E. J., van Wijk, R. G., Wichers, H. J., & de Jong, N. W. (2014). Systematic review on cashew nut allergy. *Allergy*, *69*(6): 692-698.
- van Hengel, A. J. (2007). Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *389*(1): 111-118.
- Vanga, S. K., Singh, A., & Raghavan, V. (2015). Review of conventional and novel food processing methods on food allergens. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*(just-accepted): 00-00.
- Venkatachalam, M., Monaghan, E. K., Kshirsagar, H. H., Robotham, J. M., O'Donnell, S. E., *et al.* (2008). Effects of processing on immunoreactivity of cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) seed flour proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(19): 8998-9005.
- Vetander, M., Helander, D., Flodstrom, C., Ostblom, E., Alfven, T., *et al.* (2012). Anaphylaxis and reactions to foods in children - a population-based case study of emergency department visits. *Clinical and Experimental Allergy*, *42*(4): 568-577.
- Vickery, B. P., Chin, S., & Burks, A. W. (2011). Pathophysiology of Food Allergy. *Pediatric Clinics of North America*, *58*(2): 363-376.
- Wang, F., Robotham, J., Teuber, S., Sathe, S., & Roux, K. (2003). Ana o 2, a major cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut allergen of the legumin family. *International Archives of Allergy and Immunology*, *132*(1): 27-39.
- Wang, F., Robotham, J., Teuber, S., Tawde, P., Sathe, S., *et al.* (2002). Ana o 1, a cashew (*Anacardium occidentale*) allergen of the vicilin seed storage protein family. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *110*(1): 160-166.
- Wang, W., Han, J., Wu, Y., Yuan, F., Chen, Y., *et al.* (2011). Simultaneous Detection of Eight Food Allergens Using Optical Thin-Film Biosensor Chips. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(13): 6889-6894.
- Wei, Y. H., Sathe, S. K., Teuber, S. S., & Roux, K. H. (2002). A sensitive sandwich ELISA for the detection of trace amount of cashew nut in foods. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *109*(1): S303-S303.
- Wei, Y. H., Sathe, S. K., Teuber, S. S., & Roux, K. H. (2003). A sensitive sandwich ELISA for the detection of trace amounts of cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(11): 3215-3221.
- Willison, L. N., Tawde, P., Robotham, J. M., Penney, R. M., Teuber, S. S., *et al.* (2008). Pistachio vicilin, Pis v 3, is immunoglobulin E-reactive and cross-reacts with the homologous cashew allergen, Ana o 1. *Clinical and Experimental Allergy*, *38*(7): 1229-1238.
- Wilson, K., & Walker, J. (2010). Molecular biology, bioinformatics and basic techniques. In K. Wilson & J. Walker (Eds.), *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*, 7th edition 7 ed., (pp. 178-187). United States of America: Cambridge University Press, NY, USA.
- Zuidmeer, L., Goldhahn, K., Rona, R. J., Gislason, D., Madsen, C., *et al.* (2008). The prevalence of plant food allergies: A systematic review. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *121*(5): 1210-1218.