

Detecção de avelã como potencial alergénio em chocolates por técnicas de biologia molecular

Vítor Hugo da Silva Melo

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para
obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar*

Orientado por:

Doutora Isabel Maria Sousa Gomes Mafra

Prof.^a Doutora Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho

**Bragança
2011**

Trabalho realizado no Laboratório de Bromatologia e Hidrologia da
Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto,
sob orientação da Doutora Isabel Maria Sousa Gomes Mafra
e co-orientação da Prof.^a Doutora Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho

Agradecimentos

A realização de todas as componentes desta dissertação é resultado da colaboração directa e indirecta de um conjunto de pessoas, as quais merecem o meu maior apreço e gratidão. Desta forma não posso deixar de agradecer:

À minha orientadora, Doutora Isabel Mafra, pelos conselhos, sugestões e conhecimentos científicos que me transmitiu nestes meus primeiros passos na área da Biologia Molecular. Por todo o acompanhamento imprescindível durante todo o trabalho desenvolvido, pelas oportunidades, pela simpatia, apoio, paciência e motivação que sempre transmitiu. Muito obrigado por tudo!

À Professora Doutora Beatriz Oliveira, pela simpatia e boa disposição, pelo acolhimento e esforço demonstrado para facultar todos os meios e condições para a conclusão deste trabalho. Obrigado!

À minha co-orientadora, Professora Doutora Letícia Estevinho, pela disponibilidade, ajuda e simpatia. Obrigado!

À Doutora Joana Amaral, por todos os conhecimentos transmitidos ao longo destes anos, pelas oportunidades proporcionadas, por toda a motivação, confiança e optimismo transmitidos. Agradeço ainda toda a ajuda prestada e todos os conselhos que me ajudaram, sempre, a seguir o melhor caminho. Muito obrigado!

À Joana, por toda a ajuda prestada ao longo de todo o trabalho, pelo apoio, pelos conhecimentos científicos transmitidos e pelo companheirismo. Muito obrigado!

À Graciete e ao Telmo, pela preocupação, ajuda e companheirismo que sempre me transmitiram ao longo destes meses de trabalho. Gostei de vos conhecer!

Aos meus amigos, sem excepções, pela preocupação, incentivo, apoio, companheirismo e amizade. Obrigado por estarem sempre prontos a ajudar. Como refere a letra da célebre música académica “Amigos para sempre...”.

Aos meus pais e irmã, por estarem sempre presentes nos momentos que mais precisei, pelo apoio e preocupação, por tudo o que me proporcionaram e continuam a proporcionar e por todos os bons conselhos. Tudo o que alcancei até hoje, a vocês o devo! Muito obrigado!

À minha mais que tudo, Cristina, pelo apoio, preocupação, amor, amizade e companhia nas viagens que fizemos todos os dias para o laboratório. Obrigado por toda a ajuda e paciência dispensadas no decorrer da realização deste trabalho. Pelos bons e maus momentos que passamos, pelas alegrias e tristezas. Obrigado por estares sempre ao meu lado! Obrigado por estares comigo a percorrer este caminho!

Resumo

A avelã está incluída nos oito grupos de alimentos responsáveis por cerca de 90% das alergias alimentares mediadas pela IgE. Deste modo, a Comissão Europeia obriga a rotulagem de ingredientes potencialmente alergénicos, através da Directiva 2007/68/CE. De acordo com o exposto, a detecção de vestígios de avelã em produtos alimentares torna-se essencial para salvaguardar a saúde dos consumidores alérgicos. O recurso a técnicas de biologia molecular, como a Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR), constitui uma opção bastante confiável para a detecção de quantidades muito baixas de um determinado ingrediente potencialmente alergénico.

Com o presente trabalho procedeu-se à optimização da técnica da PCR para a detecção de avelã em chocolates. Deste modo, tornou-se necessária a comparação de diversos métodos para a extracção adequada de ADN de avelã em chocolates modelo. Numa primeira etapa do trabalho, usando *primers* específicos para a avelã, foi possível atingir um limite de detecção de 0,005% (50 ppm) de avelã numa matriz de massa de trigo, visando a optimização das técnicas moleculares utilizadas. Com o uso de misturas de referência de avelã em chocolate pretendeu-se, numa segunda etapa, a comparação de diferentes métodos de extracção de ADN: CTAB, Wizard[®] Magnetic DNA Purification System for Food, NucleoSpin[®] Food e uso parcial do *kit* Wizard[®] Plus Minipreps DNA Purification System. O método baseado no uso do *kit* NucleoSpin[®] Food foi o que evidenciou melhor eficiência em termos de reprodutibilidade e sensibilidade na amplificação por PCR convencional e PCR em tempo real com sondas TaqMan[™], permitindo a detecção de 0,005% (50 ppm) de avelã em chocolate.

Relativamente à detecção de avelã em amostras de chocolates comerciais, foi possível detectar, por ambas as técnicas de PCR, quantidades muito baixas de avelã em chocolates que não rotulavam a avelã como ingrediente, mas que continha a menção “pode conter vestígios de...”. Assim, pode afirmar-se que as amostras de chocolate em questão foram eventualmente contaminadas com pequenas quantidades de avelã, durante o processo de produção. Os resultados obtidos por PCR em tempo real confirmaram em geral as rotulagens das amostras de chocolate, mesmo os chocolates que não amplificaram positivamente para a avelã.

Os resultados demonstram ainda que um método eficaz de extracção de ADN é a base para a obtenção de níveis de sensibilidade adequados, para detecção e quantificação de ingredientes potencialmente alergénicos, em matrizes alimentares complexas, como o chocolate.

Palavras-chave: avelã, alergénios, chocolate, extracção de ADN, PCR

Abstract

Hazelnut is included in one of the eight food groups responsible for approximately 90% of IgE-mediated food allergies. Thus, European Commission obligates the labeling of potential allergenic ingredients in foods, through the Directive 2007/68/CE. Accordingly the detection of hazelnut traces in food products becomes useful to protect allergic consumers' health. The use of molecular biology techniques, as Polymerase Chain Reaction (PCR), is a rather reliable option to detect very low amounts of a potential allergenic ingredient.

With the present work the optimization of PCR technique, aiming the detection of hazelnut in chocolate model, was achieved. Therefore, it was necessary to compare different DNA extraction methods of hazelnut in chocolate. In a first step, using hazelnut specific primers, it was possible to reach a limit of detection of 0.005% (50 ppm) of hazelnut in wheat dough. In a second step, reference mixtures of hazelnut in chocolate were used to compare different DNA extraction methods: CTAB, Wizard[®] Magnetic DNA Purification System for Food, NucleoSpin[®] Food and partial use of the Wizard[®] Plus Minipreps DNA Purification System kit. The protocol based on NucleoSpin[®] Food kit proved to be more reproducible and sensitive both in conventional PCR and real-time PCR amplification with TaqMan[™] probes, allowing a limit of detection of 0,005% (50 ppm) of hazelnut in chocolate.

Concerning the detection of hazelnut in commercial chocolate samples, it was possible to detect, by both PCR techniques, traces of hazelnut in chocolates that were not labelled as containing hazelnut, but with the declaration of "may contain traces of...". So, it can be claim that these chocolate samples were eventually contaminated with low amounts of hazelnut, during the production process. In general, the real-time PCR results confirmed the label statements, even those which were negative for hazelnut.

The results of this study show that a reliable DNA extraction method is the basis for achieving adequate levels of sensitivity, for the detection and quantification of potential allergenic ingredients in complex food matrices, such as chocolate.

Keywords: hazelnut, allergens, chocolate, DNA extraction, PCR

Lista de Abreviaturas

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ARN – Ácido ribonucleico

ARNase – Ribonuclease

Ct – *Cycle Threshold*

CTAB – Brometo de cetiltrimetilamónio (*Cetyltrimethylammonium bromide*)

dNTP – Desoxirribonucleótido trifosfato

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção com enzimas fixadas (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*)

FAO – Organização para a Agricultura e Alimentação (*Food and Agriculture Organization*)

FDA – Administração de Alimentos e Medicamentos (*Food and Drug Administration*)

HACCP – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo (*Hazard analysis critical control points*)

IgE – Imunoglobulina E

IUIS – União Internacional das Sociedades de Imunologia (*International Union of Immunological Societies*)

LC – Cromatografia Líquida (*Liquid Chromatography*)

LFD – Tiras de Fluxo Lateral (*Lateral Flow Devices*)

MS – Espectrometria de Massa (*Mass Spectrometry*)

nsLTP – Proteínas de transferência inespecífica de lípidos (*non-specific Lipid Transfer Proteins*)

pb – pares de bases

PCR – Reacção em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

PR – Proteínas relacionadas com a patogénese (*Pathogenesis-related protein*)

PVP – Polivinilpirrolidona

UV – Ultravioleta

WHO – Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)

Índice Geral

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	v
Lista de Abreviaturas	vii
1. Objectivos e âmbito do trabalho	1
2. Fundamentos teóricos	3
2.1. Avelã (<i>Corylus avellana</i>)	3
2.2. Alergia alimentar	3
2.3. A Avelã como alergénio	5
2.4. Rotulagem e a indústria alimentar	7
2.5. Métodos de detecção de alergénios	9
2.5.1. Métodos baseados na análise de proteínas	9
2.5.2. Métodos baseados na análise de ADN	11
2.5.2.1. Extracção e purificação de ADN	12
2.5.2.2. PCR convencional	15
2.5.2.3. PCR em tempo real	18
2.5.2.4. PCR-ELISA	21
2.6. Aplicação de técnicas baseadas na PCR para a detecção de avelã em alimentos	21
3. Metodologia experimental	25
3.1. Descrição das amostras	25
3.2. Preparação das misturas padrão	29
3.3. Extracção de ADN	30
3.3.1. Método CTAB-PVP	31
3.3.2. Método NucleoSpin® Food kit	32
3.3.3. Método Wizard® Magnetic DNA	33
3.3.4. Método Wizard	34
3.3.5. Método Wizard ARNase	34
3.3.6. Método Wizard-PVP	34
3.3.7. Método Wizard-PVP ARNase	35
3.4. Análise do ADN extraído	35
3.5. Amplificação do ADN por PCR	35
3.5.1. Oligonucleótidos	35
3.5.2. PCR convencional	36
3.5.3. PCR em tempo real	37

4. Resultados e discussão	39
4.1. Optimização da detecção de avelã por PCR	39
4.2. Comparação dos métodos de extracção de avelã em chocolate	40
4.2.1. Método CTAB-PVP	41
4.2.2. Método NucleoSpin® Food kit	43
4.2.3. Método Wizard® Magnetic DNA	44
4.2.4. Método Wizard	46
4.2.5. Método Wizard ARNase	47
4.2.6. Método Wizard-PVP	49
4.2.7. Método Wizard-PVP ARNase	51
4.2.8. Análise comparativa dos métodos de extracção	52
4.3. Optimização da detecção de avelã em chocolate	55
4.4. Aplicação na detecção de avelã em chocolates comerciais	57
5. Conclusões finais	63
6. Referências bibliográficas	65

Índice de Tabelas

Tabela 1: Classificação de alergénios em famílias de proteínas	7
Tabela 2: Métodos de extracção de ADN aplicados a chocolates e outros alimentos descritos na literatura	13
Tabela 3: Resumo dos trabalhos publicados referentes à aplicação da PCR na detecção de avelã em alimentos	23
Tabela 4: Descrição da rotulagem das amostras de chocolates comerciais	26
Tabela 5: Misturas binárias de referência de avelã em massa pevide	29
Tabela 6: Misturas binárias de referência de avelã em chocolate	30
Tabela 7: Oligonucleótidos usados em PCR convencional e PCR em tempo real	36
Tabela 8: Componentes da mistura para PCR convencional	36
Tabela 9: Condições utilizadas na PCR convencional	36
Tabela 10: Componentes da mistura de PCR em tempo real	37
Tabela 11: Condições utilizadas na PCR em tempo real	38
Tabela 12: Concentração e pureza dos extractos de avelã em massa pevide obtidos pelo método Wizard	39
Tabela 13: Concentração e pureza dos extractos de ADN a partir dos padrões extraídos pelo método CTAB-PVP	41
Tabela 14: Concentração e pureza dos extractos de ADN a partir dos padrões extraídos pelo método NucleoSpin® Food kit.....	43
Tabela 15: Concentração e pureza dos extractos de ADN a partir dos padrões extraídos pelo método Wizard® Magnetic DNA	45
Tabela 16: Concentração e pureza dos extractos de ADN a partir dos padrões extraídos pelo método Wizard.....	46
Tabela 17: Concentração e pureza dos extractos de ADN a partir dos padrões extraídos pelo método Wizard ARNase	48
Tabela 18: Concentração e pureza dos extractos de ADN a partir dos padrões extraídos pelo método Wizard-PVP	49
Tabela 19: Concentração e pureza dos extractos de ADN a partir dos padrões extraídos pelo método Wizard-PVP ARNase.....	51
Tabela 20: Comparação dos valores médios de rendimento e pureza dos extractos de ADN, limites de detecção das técnicas de PCR, eficiência e coeficiente de correlação das curvas padrão obtidas por PCR em tempo real para os sete protocolos de extracção testados	52
Tabela 21: Valores médios de Ct obtidos para os primeiros e últimos níveis de amplificação por PCR em tempo real em cada método de extracção	54
Tabela 22: Concentração e pureza dos extractos de ADN a partir dos padrões extraídos pelo método NucleoSpin®	55
Tabela 23: Concentração e pureza das amostras de chocolates comerciais extraídas pelo método NucleoSpin®	58
Tabela 24: Resumo dos resultados obtidos por PCR convencional e PCR em tempo real para a detecção e semi quantificação de avelã em amostras de chocolates comerciais	61

Índice de Figuras

Figura 1: Mecanismo da reacção alérgica mediada pela IgE (adaptado de Taylor, 2006)	4
Figura 2: Representação simples do protocolo do NucleoSpin® Food kit (Adaptado de: Macherey-Nagel, 2011)	14
Figura 3: Esquematização das etapas da PCR (adaptado de: Mafra & Oliveira, 2005).....	16
Figura 4: Exemplo de construção gráfica da PCR em tempo real (adaptado de: Holzhauser, 2006).....	18
Figura 5: Mecanismo de funcionamento das sondas TaqMan® (adaptado de: Mafra & Oliveira, 2005).....	20
Figura 6: Electroforese em gel de agarose dos padrões de avelã em massa pevide amplificados por PCR usando os <i>primers</i> Nocc2 F/Nocc1 Rbis, específicos para a avelã ([extractos]=25ng/μL). M – marcador molecular; 1 – Massa pevide com 0% de avelã; 2 a 13 – 50%, 10%, 5%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, 0,005%, 0,001%, 0,0005%, 0,0001% de avelã em massa pevide; CN – controlo negativo.	40
Figura 7: Electroforese em gel de agarose dos padrões de avelã em chocolate amplificados por PCR usando os <i>primers</i> Nocc2 F e Nocc1 Rbis, específicos para a avelã ([extractos]=20ng/μL). M – marcador molecular; 1 a 5 – 10%, 1%, 0,1%, 0,05%, 0,01% de avelã em chocolate, extraída pelo método CTAB-PVP; B – branco de extracção; CN – controlo negativo.	42
Figura 8: Curva de calibração dos padrões de avelã em chocolate amplificados por PCR em tempo real usando os <i>primers</i> Nocc2 F/ Nocc1 Rbis e a sonda TaqMan™ Nocc1 P (concentração dos extractos: 20ng/μL). 1 a 4 – 10%, 1%, 0,1%, 0,05% de avelã em chocolate, extraída pelo método CTAB-PVP.	42
Figura 9: Electroforese em gel de agarose dos padrões de avelã em chocolate amplificados por PCR usando os <i>primers</i> Nocc2 F/Nocc1 Rbis, específicos para a avelã ([extractos]=10 ng/μL). M – marcador molecular; 1 a 5 – 10%, 1%, 0,1%, 0,05%, 0,01% de avelã em chocolate, extraída pelo método NucleoSpin®; B – branco de extracção; CN – controlo negativo.	44
Figura 10: Curva de calibração dos padrões de avelã em chocolate amplificados por PCR em tempo real usando os <i>primers</i> Nocc2 F/Nocc1 Rbis e a sonda TaqMan™ Nocc1 P ([extractos]=10 ng/μL). 1 a 5 – 10%, 1%, 0,1%, 0,05%, 0,01% de avelã em chocolate, extraída pelo método NucleoSpin®.....	44
Figura 11: Electroforese em gel de agarose dos padrões de avelã em chocolate amplificados por PCR usando os <i>primers</i> Nocc2 F/Nocc1 Rbis, específicos para a avelã (extractos]=10 ng/μL). M – marcador molecular; 1 a 5 – 10%, 1%, 0,1%, 0,05%, 0,01% de avelã em chocolate, extraída pelo método Wizard® Magnetic; B – branco de extracção; CN – controlo negativo.	45
Figura 12: Curva de calibração dos padrões de avelã em chocolate amplificados por PCR em tempo real usando os <i>primers</i> Nocc2 F/Nocc1 Rbis e a sonda TaqMan™ Nocc1 P (extractos]=10 ng/μL). 1 a 3 – 10%, 1%, 0,1% de avelã em chocolate, extraída pelo método Wizard® Magnetic.	45
Figura 13: Electroforese em gel de agarose dos padrões de avelã em chocolate amplificados por PCR usando os <i>primers</i> Nocc2 F/Nocc1 Rbis, específicos para a avelã ([extractos]=10 ng/μL). M – marcador molecular; 1 a 5 – 10%, 1%, 0,1%, 0,05%, 0,01% de avelã em chocolate, extraída pelo método Wizard; B – branco de extracção; CN – controlo negativo.	46
Figura 14: Curva de calibração dos padrões de avelã em chocolate amplificados por PCR em tempo real usando os <i>primers</i> Nocc2 F/Nocc1 Rbis e a sonda TaqMan™ Nocc1 P ([extractos]=10 ng/μL). 1 a 5 – 10%, 1%, 0,1%, 0,05%, 0,01% de avelã em chocolate, extraída pelo método Wizard.....	47
Figura 15: Electroforese em gel de agarose dos padrões de avelã em chocolate amplificados por PCR usando os <i>primers</i> Nocc2 F/Nocc1 Rbis, específicos para a avelã ([extractos]=10	

ng/ μ L). M – marcador molecular; 1 a 5 – 10%, 1%, 0,1%, 0,05%, 0,01% de avelã em chocolate, extraída pelo método Wizard ARNase; B – branco de extracção; CN – controlo negativo.....	48
Figura 16: Curva de calibração dos padrões de avelã em chocolate amplificados por PCR em tempo real usando os <i>primers</i> Nocc2 F/Nocc1 Rbis e a sonda TaqMan™ Nocc1 P ([extractos]=10 ng/ μ L). 1 a 4 – 10%, 1%, 0,1%, 0,05% de avelã em chocolate, extraída pelo método Wizard ARNase.	49
Figura 17: Electroforese em gel de agarose dos padrões de avelã em chocolate amplificados por PCR usando os <i>primers</i> Nocc2 F/Nocc1 Rbis, específicos para a avelã ([extractos]=10 ng/ μ L). M – marcador molecular; 1 a 5 – 10%, 1%, 0,1%, 0,05%, 0,01% de avelã em chocolate, extraída pelo método Wizard-PVP; B – branco de extracção; CN – controlo negativo.....	50
Figura 18: Curva de calibração dos padrões de avelã em chocolate amplificados por PCR em tempo real usando os <i>primers</i> Nocc2 F/Nocc1 Rbis e a sonda TaqMan™ Nocc1 P ([extractos]=10 ng/ μ L). 1 a 4 – 10%, 1%, 0,1%, 0,05% de avelã em chocolate, extraída pelo método Wizard-PVP.	50
Figura 19: Electroforese em gel de agarose dos padrões de avelã em chocolate amplificados por PCR usando os <i>primers</i> Nocc2 F/Nocc1 Rbis, específicos para a avelã ([extractos]=10 ng/ μ L). M – marcador molecular; 1 a 5 – 10%, 1%, 0,1%, 0,05%, 0,01% de avelã em chocolate, extraída pelo método Wizard-PVP ARNase; B – branco de extracção; CN – controlo negativo.....	51
Figura 20: Curva de calibração dos padrões de avelã em chocolate amplificados por PCR em tempo real usando os <i>primers</i> Nocc2 F/Nocc1 Rbis e a sonda TaqMan™ Nocc1 P ([extractos]=10 ng/ μ L). 1 a 4 – 10%, 1%, 0,1%, 0,05% de avelã em chocolate, extraída pelo método Wizard-PVP ARNase.....	52
Figura 21: Electroforese em gel de agarose dos padrões de avelã em chocolate amplificados por PCR usando os <i>primers</i> Nocc2 F/Nocc1 Rbis, específicos para a avelã ([extractos]=10 ng/ μ L). M – marcador molecular; 1 – chocolate com 0% de avelã; 2 a 12 – 10%, 5%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, 0,005%, 0,001%, 0,0005%, 0,0001% de avelã em chocolate; CN – controlo negativo.	56
Figura 22: Representação gráfica do sinal de fluorescência em função do número de ciclos da PCR em tempo real da amplificação dos padrões de avelã em chocolate, usando os <i>primers</i> Nocc2 F/ Nocc1 Rbis e a sonda TaqMan™ Nocc1 P.	57
Figura 23: Curva de calibração dos padrões de avelã em chocolate amplificados por PCR em tempo real usando os <i>primers</i> Nocc2 F/Nocc1 Rbis e a sonda TaqMan™ Nocc1 P ([extractos]=10 ng/ μ L). 1 a 8 – 10%, 5%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, 0,005% de avelã em chocolate.....	57
Figura 24: Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR (100pb) de chocolates comerciais usando os <i>primers</i> Nocc2 F/Nocc1 Rbis, específicos para a avelã ([extractos]=10ng/ μ L). M – marcador molecular; Linha 1 – A1; Linhas 2 a 5 – A3 a A6; Linhas 6 a 8 – A8 a A10; Linha 9 – A12; Linhas 10 a 20 – A15 a A25; Linha 21 – A2; Linha 22 – A7; Linha 23 – A11; Linhas 24 a 25 – A13 a A14 (de acordo com a tabela 4); C ₁ – 0,1% avelã; C ₂ – 0,01% avelã; CN – controlo negativo.....	59
Figura 25: Representação gráfica do sinal de fluorescência em função do número de ciclos da PCR em tempo real da amplificação dos chocolates comerciais e padrões de avelã em chocolate, usando os <i>primers</i> Nocc2 F/Nocc1 Rbis e a sonda TaqMan™ Nocc1 P.	59
Figura 26: Curva de calibração dos padrões de avelã em chocolate e respectivos chocolates comerciais, amplificados por PCR em tempo real usando os primers Nocc2 F/Nocc1 Rbis e a sonda TaqMan™ Nocc1 P. ([extractos]=10 ng/ μ L). 1 a 6 – 10%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, 0,005% de avelã em chocolate.	60

1. Objectivos e âmbito do trabalho

O consumo de avelã contribui com diversos efeitos benéficos para a saúde, mas em contrapartida, pode traduzir-se num risco severo para indivíduos alérgicos. Desta forma, a ingestão de quantidades muito baixas deste fruto pode provocar reacções imunológicas adversas, variando em grau de intensidade (leves a potencialmente fatais).

As quantidades vestigiais de avelã presentes em alimentos podem advir da contaminação cruzada durante o processo produtivo. Como forma de contornar este problema, a indústria alimentar, em especial a de chocolates, utiliza uma rotulagem de precaução, com a menção “pode conter vestígios de...”, quando o fabrico de diversos chocolates partilham a mesma área e equipamentos. Contudo, a utilização desta rotulagem está a torna-se abusiva, uma vez que é praticamente impossível encontrar, no mercado, um simples chocolate de leite que não contenha esta menção de precaução.

Devido a este facto, a detecção de vestígios de avelã em produtos alimentares torna-se útil e essencial para salvaguardar a saúde dos consumidores alérgicos. Assim, o recurso a técnicas de biologia molecular, como a Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR), constitui uma alternativa aos tradicionais métodos imunológicos. Porém, o sucesso da sua aplicação em matrizes alimentares, como o chocolate, depende essencialmente de um método de extracção de ADN eficaz. Por analogia, a escolha de um método de extracção eficaz traduz-se na obtenção de extractos de ADN com elevada qualidade e integridade para aplicação em PCR.

De acordo com o exposto, pretendeu-se com este trabalho otimizar um método efectivo para a extracção de ADN de avelã em chocolate. Para isso, vários métodos comerciais e não comerciais foram testados e comparados tendo em conta a qualidade e integridade dos extractos e o nível de amplificação por PCR (Secção 4.2).

Um outro objectivo consistiu na optimização das técnicas de PCR (qualitativa e em tempo real), para a detecção de vestígios de avelã em padrões de chocolate (Secção 4.1). Posteriormente, essas técnicas foram aplicadas em amostras comerciais de chocolates, que continham avelã como ingrediente ou que eventualmente tenham sido contaminadas com quantidades muito baixas de avelã (Secção 4.4).

A escolha do tema desta dissertação centrou-se, então, na necessidade do desenvolvimento de métodos de detecção de alérgenos cada vez mais sensíveis, de forma a monitorizar a contaminação cruzada na indústria alimentar. Um outro ponto tido em consideração foi o facto de não existirem publicações científicas acerca da comparação de métodos de extracção de ADN de frutos de casca rija em chocolate.

2. Fundamentos teóricos

2.1. Avelã (*Corylus avellana*)

A avelã, fruto da aveleira que pertence à família Betulaceae e ao género *Corylus*, trata-se de um fruto de casca rija amplamente consumido em todo o Mundo (Alasalvar et al., 2008; Píknová et al., 2008).

Segundo a base de dados estatísticos da FAO, a Turquia é o principal produtor de avelã, detendo aproximadamente 65% da produção mundial, seguida da Itália, Estados Unidos da América, Azerbaijão e Geórgia com 14%, 6%, 4% e 3% da produção total global, respectivamente. Em relação a Portugal, a contribuição mundial é inferior a 0,1%, sendo a região de Trás-os-Montes a região com maior produção nacional.

Devido às suas características organolépticas, a avelã é usada como matéria-prima na formulação de produtos alimentares, como chocolate, lacticínios, cereais e gelados, com o intuito de adicionar sabor e textura (Amaral et al., 2006; Píknová et al., 2008).

Tal como a maioria dos alimentos, a avelã contém todos os principais macronutrientes da dieta alimentar. Vários estudos demonstram que cerca de 100 g de avelã contém aproximadamente 60 g de lípidos, 17 g de hidratos de carbono e 15 g de proteínas (Alasalvar et al., 2003; Amaral et al., 2006; Oliveira et al., 2008; Savage et al., 1998; Vujevic et al., 2010). Assim, devido ao seu elevado teor em gordura, a avelã é uma excelente fonte de energia e desempenha um papel importante na saúde e nutrição humana, dado que este fruto é muito rico em ácidos gordos monoinsaturados. Este tipo de ácidos gordos têm sido associados a efeitos benéficos para a saúde, tais como, prevenção da ocorrência de acidentes cardiovasculares, aterosclerose e artrite. Por este motivo, os frutos de casca rija foram reconhecidos pela FDA como alimentos “protectores do coração” (Alasalvar et al., 2003; Amaral et al., 2006; Köksal et al., 2006; Oliveira et al., 2008).

Apesar dos efeitos benéficos apontados, a avelã é considerada um alimento potencialmente alergénico, pelo que a sua ingestão pode incorrer numa ameaça para alguns consumidores, visto tratar-se de um alimento que poderá provocar reacções adversas em pessoas alérgicas.

2.2. Alergia alimentar

As alergias alimentares correspondem a reacções adversas do sistema imunitário, desenvolvidas após ingestão de um alimento. O componente alimentar capaz de provocar tais reacções é designado de alergénio (Ramesh, 2008; van Hengel, 2007).

As alergias podem ser classificadas em alergias mediadas ou não mediadas pela Imunoglobulina E (IgE). Geralmente, as mediadas pela IgE provocam reacções agudas

imediatas, enquanto as não mediadas provocam reacções subagudas ou crónicas tardias. Desta forma, as reacções mediadas pela IgE merecem uma maior ênfase, pelo facto de provocarem implicações graves em indivíduos sensibilizados e envolverem uma multiplicidade de alimentos.

Nas reacções alérgicas mediadas pela IgE, a primeira exposição do sistema imunológico a um determinado alergénio alimentar provoca a estimulação dos anticorpos IgE. Esses anticorpos acoplam-se à superfície dos mastócitos (presentes no tecido conjuntivo) ou dos basófilos (presentes no sangue). Este processo é designado de sensibilização e não ocorre qualquer sintoma nos indivíduos que ingeriram o alimento alergénico. Aquando de uma nova exposição ao mesmo alergénio, os anticorpos IgE reconhecem o alergénio e a membrana celular do mastócito ou do basófilo é quebrada, promovendo a libertação de histamina e outros mediadores químicos que provocam as mais diversas reacções alérgicas (Nicoletti et al., 2007; Taylor, 2006). Essas reacções manifestam-se através de sintomas cutâneos (urticária, eczema, dermatite), síndrome de alergia oral (inchaço dos lábios, palato e laringe), sintomas respiratórios (asma, rinite, espirros), sintomas gastrointestinais (inchaço da cavidade oral, vómitos, cólicas, diarreia), sintomas cardiovasculares (ritmo cardíaco anormal, pressão arterial muito baixa) e mais gravemente através de choque anafiláctico (Besler, 2001a). A figura 1 esquematiza de forma simples o mecanismo de reacção mediado pela IgE.

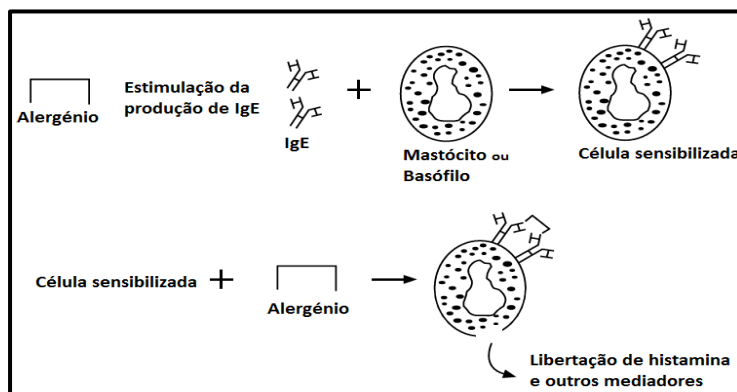


Figura 1: Mecanismo da reacção alérgica mediada pela IgE (adaptado de Taylor, 2006)

Apesar de desenvolverem sintomas semelhantes, a alergia e a intolerância alimentar não podem ser confundidas, uma vez que a intolerância alimentar, ao contrário da alergia alimentar, não envolve reacções adversas do sistema imunitário. Desta forma, a intolerância pode ser provocada, por exemplo, por reacções a aditivos alimentares ou pela falta de uma enzima que degrade um determinado ingrediente de um alimento. Neste caso, desenvolve-

se uma inflamação crónica e os sintomas associados não se manifestam de imediato (Jedrychowski et al., 2010b; Taylor, 2006; Ramesh, 2008).

De acordo com a literatura, as alergias alimentares são consideradas um problema de saúde pública grave e que apesar da incerteza da sua incidência, os números apontam para 2-4% na população adulta e 6-8% na população infantil (Sampson, 1999; Sampson, 2003; Sicherer & Sampson, 2006).

As alergias alimentares podem ser divididas em duas classes. As de classe 1 desenvolvem-se mais frequentemente nas crianças, sendo os alérgenos resistentes à digestão gástrica, uma vez que o processo de sensibilização ocorre no tracto gastrointestinal. As de classe 2 são mais comuns nos adultos e desenvolvem-se pela exposição a alérgenos inalantes e as reacções alérgicas inerentes estão relacionadas com a síndrome de alergia oral (Jedrychowski et al., 2010a; Ramesh, 2008).

Os alérgenos alimentares são normalmente proteínas ou glicoproteínas estáveis, de massa molecular entre 10 e 70kDa (Lehrer et al., 2002). O componente relevante da estrutura principal da proteína, em termos de alergia alimentar, é chamado de epítopo, que funciona como interface entre a estrutura proteica e o sistema imunológico. Em termos de configuração, podem ser considerados dois tipos de epítopos, os lineares e os conformacionais. Os lineares são constituídos por aminoácidos dispostos sequencialmente de forma linear. Os conformacionais são formados pela estrutura secundária, terciária e quaternária da proteína. Este último tipo é mais susceptível a ser alterado ou inactivado pelo processamento térmico (IPCS, 2009; Sathe & Sharma, 2009).

O processamento térmico a que os alimentos estão sujeitos pode afectar a integridade das proteínas, alterando a sua conformação tridimensional. Essa alteração pode, por um lado, afectar a ligação dos epítopos conformacionais ao anticorpo IgE, evitando as reacções alérgicas; mas por outro lado, pode induzir a formação de novos epítopos ou o aparecimento de outros que estejam escondidos na molécula proteica. Deste modo, o processamento térmico pode ser capaz de reduzir ou aumentar a capacidade alérgica das proteínas (Sathe & Sharma, 2009; van Hengel et al., 2007).

2.3. A Avelã como alérgeno

De acordo com o relatório da FAO, de 1995, a avelã está incluída nos oito grupos de alimentos responsáveis por cerca de 90% das alergias alimentares mediadas pela IgE (Holzhauser et al., 2002). As estimativas de incidência das alergias alimentares provocadas pela ingestão de avelã apontam para uma gama entre 1,8% e 4% (Pasaoglu et al., 2011; Zuidmeer et al., 2008).

As reacções alérgicas provocadas pelas proteínas da avelã podem ser desencadeadas pela ingestão de uma dose muito pequena de avelã. Até à data, a dose mínima que poderá desencadear tais reacções ainda não foi estabelecida, pois depende do tipo de alimento e de indivíduo para indivíduo. Mesmo assim, estima-se que doses entre 1 e 100 mg podem traduzir-se numa ameaça para indivíduos sensibilizados (D'Andrea et al., 2009; Holck et al., 2011; Taylor, 2006).

Segundo a base de dados conjunta da Organização Mundial de Saúde e da União Internacional das Sociedades de Imunologia (WHO/IUIS), encontram-se oficialmente reconhecidos, até ao momento, oito alergénios alimentares associados à avelã. Esses alergénios são designados de Cor a 1, Cor a 2, Cor a 8, Cor a 9, Cor a 11, Cor a 12, Cor a 13 e Cor a 14 (WHO/IUIS Database, 2011). O termo “Cor” advém das três primeiras letras do Género (*Corylus*), a letra “a” advém do restritivo da Espécie (*avellana*) a que pertence a avelã e o número diz respeito à ordem cronológica de purificação do alergénio e à homologia de alergénios de espécies relacionadas (Chapman, 2008; King et al., 1995).

Quando um alergénio apresenta tamanho, função biológica e sequência de aminoácidos semelhantes a outro alergénio da mesma espécie, considera-se que se trata de um isoalergénio. Cada isoalergénio pode sofrer várias mutações aquando da clonagem do ADN complementar dos alergénios, designadas de isoformas ou variantes. Desta forma, todos os alergénios da avelã têm reconhecidos diversos isoalergénios e isoformas. A título de exemplo, Cor a 1.0101 é a isoforma do isoalergénio Cor a 1.01 (Chapman, 2008; WHO/IUIS Database, 2011).

O alergénio Cor a 1, mais propriamente o isoalergénio Cor a 1.04 é considerado como alergénio “major” da avelã, dado que provoca reacções alérgicas em mais de 50% dos soros dos pacientes sujeitos a testes clínicos. Ao invés, o alergénio Cor a 11 é considerado alergénio “minor”, uma vez que menos de 20% dos soros dos pacientes apresentaram reacção alérgica (Chapman, 2008; Lauer et al., 2004). A isoforma Cor a 1.0401 está citada como o principal alergénio responsável pela maioria das alergias provocadas pela ingestão de avelã (Besler et al., 2001b).

Os alergénios da avelã podem ser classificados em famílias de proteínas (PR, profilinas, nsLTP, globulinas 11S e 7S, oleosinas e albuminas 2S) de acordo com as suas funções, estrutura e características (Jedrychowski et al., 2010a). As proteínas PR integram um grupo heterogéneo de 14 famílias de proteínas envolvidas no sistema de defesa das plantas. As profilinas representam uma família de pequenos alergénios (12-15 kDa) que estão relacionados com a reactividade cruzada com outros alergénios. As proteínas nsLTP (proteínas de transferência inespecífica de lípidos) de baixo peso molecular (7-9 kDa) estão estritamente relacionadas com as alergias alimentares de classe 1, devido à sua resistência à digestão gástrica. As globulinas e as albuminas compõem o principal grupo de proteínas

de armazenamento de sementes de várias espécies de plantas e podem classificar-se, segundo os coeficientes de sedimentação, em albuminas 2S e globulinas 11S (leguminas) e 7S (vicilinas). No que diz respeito ao peso molecular, as albuminas apresentam um peso molecular entre 15-17 kDa e as globulinas superior a 40 kDa. As oleosinas revelam-se um grupo de proteínas hidrofóbicas de baixo peso molecular (14-17 kDa) (Breiteneder & Ebner, 2000; Breiteneder & Radauer, 2004; Jedrychowski et al., 2010a).

Na tabela 1 encontram-se todos os alergénios da avelã divididos por famílias de proteínas.

Tabela 1: Classificação de alergénios em famílias de proteínas (adaptado de: WHO/IUIS Database, 2011)

Alergénios	Famílias de proteínas
Cor a 1	PR-10
Cor a 2	Profilinas
Cor a 8	nsLTP
Cor a 9	Globulinas 11S (Leguminas)
Cor a 11	Globulinas 7S (Vicilinas)
Cor a 12 Cor a 13	Oleosinas
Cor a 14	Albuminas 2S

2.4. Rotulagem e a indústria alimentar

Actualmente, o único método possível de contornar o problema das alergias alimentares consiste, efectivamente, na privação total do consumo de alimentos que contenham e/ou possam conter alergénios. Para isso, os consumidores necessitam de informações claras e precisas sobre os ingredientes dos produtos alimentares. Deste modo, a rotulagem desempenha um papel crucial na disponibilidade dessas informações.

Neste contexto, devido às recomendações da Comissão do *Codex Alimentarius* referentes à rotulagem de géneros alimentícios, a Comissão Europeia estabeleceu a Directiva 2000/13/CE, que obrigava a rotulagem dos ingredientes presentes nos géneros alimentícios. Mais tarde, esta Directiva foi alterada pela Directiva 2003/89/CE, que visava a declaração de 12 grupos de ingredientes potencialmente alergénicos, listados no Anexo III A. Esta Directiva surgiu de acordo com o parecer do Comité Científico da Alimentação Humana, relativo à incidência das alergias alimentares. Em 2006, através da Directiva 2006/142/CE foram incluídos mais 2 grupos de ingredientes (tremoço e moluscos) à lista até então publicada. Mais recentemente, a Directiva 2007/68/CE lista os 14 grupos de alimentos potencialmente alergénicos, incluindo algumas excepções como a exclusão de óleo e

gordura de soja totalmente refinados. Na lista dos 14 grupos potencialmente alergénicos podem destacar-se os frutos de casca rija (amêndoa, avelã, noz, castanha de caju), que devem ser sempre rotulados, quando presentes no produto final.

A regulamentação em questão visa, apenas, os ingredientes alergénicos que são deliberadamente incorporados nos produtos alimentares, embora haja probabilidade de ocorrer contaminação cruzada durante o processo produtivo (D'Andrea et al., 2009; Kirsch et al., 2009; Poms & Anklam, 2004; van Hengel, 2007).

A contaminação de pequenas quantidades de ingredientes alergénicos pode advir da limpeza ineficaz dos equipamentos partilhados, do transporte e do armazenamento dos alimentos supostamente livres de alergénios. Com efeito, os alergénios que estão, então, presentes nos alimentos como resultado da contaminação cruzada são designados de alergénios “escondidos” (Kirsch et al., 2009; Monaci & Visconti, 2010). A presença de tais alergénios não declarados poderá constituir um sério risco para a saúde dos indivíduos alérgicos. Como forma de contornar esta questão e para se prevenir de eventuais problemas, a indústria alimentar definiu uma rotulagem de precaução que indica a possível presença dos alergénios em questão, através de várias menções, tais como, “pode conter vestígios de...” e “produzido em ambiente onde...também é manipulado...” (van Hengel, 2007). Contudo, a utilização deste tipo de rotulagem pode ser abusiva, dado que, por exemplo, um simples chocolate de leite contém uma das menções de precaução. Assim, este tipo de rotulagem restringe inflexivelmente a escolha/consumo de alimentos, por parte de indivíduos alérgicos.

Com a utilização da rotulagem de precaução, a empresa que produziu o alimento evade-se genericamente da responsabilidade da possível contaminação cruzada e consequentes implicações graves provocadas em indivíduos sensibilizados. Neste sentido, a rotulagem de precaução só deverá ser implementada caso exista um risco considerável de contaminação cruzada de alergénios.

Como forma de minimizar ou eliminar a contaminação cruzada poderá ser desenvolvido um programa de controlo e gestão de alergénios. Esse programa deverá abranger todas as etapas de produção, desde a selecção das matérias-primas até à entrega ao consumidor, e a formação dos trabalhadores. Desta forma, o controlo de alergénios deverá integrar o programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo (HACCP).

Os procedimentos práticos de gestão e controlo de alergénios poderão incluir o armazenamento diferenciado das matérias-primas, a limpeza eficaz e rigorosa de linhas de produção e equipamentos partilhados, ou então, a construção de instalações exclusivas de armazenamento e confecção de produtos alergénicos. A questão é que alguns procedimentos poderão interferir com outros aspectos relacionados com a segurança alimentar, como o risco de contaminação microbiológica. Por exemplo, o recurso a uma

limpeza húmida das linhas de produção e equipamentos partilhados de produtos secos poderá, por um lado, ser eficaz na remoção de pequenas quantidades de alergénios, mas por outro, poderá comprometer a qualidade microbiológica dos produtos subsequentes (Betazzi et al., 2008; Crevel, 2007; Holck et al., 2011).

Deste modo, a implementação de um programa de controlo e gestão de alergénios deverá ser ponderado, de forma a garantir a segurança, não só dos consumidores sensibilizados, mas também dos consumidores em geral.

2.5. Métodos de detecção de alergénios

A monitorização da contaminação cruzada, durante e após a produção de alimentos, e a verificação da rotulagem podem ser feitas através da utilização de métodos analíticos, capazes de detectar quantidades muito pequenas de alergénios. Por regra, esses métodos baseiam-se na análise de proteínas e moléculas de ADN (Holzhauser et al., 2006; Taylor, 2006).

Os métodos analíticos baseados em ADN constituem uma alternativa promissora aos métodos baseados em proteínas, na detecção de alergénios alimentares, por diversas razões. A molécula de ADN é mais resistente a elevadas temperaturas, sofrendo pouca degradação no processamento térmico dos alimentos, quando comparada com as proteínas. Os métodos baseados no ADN caracterizam-se pela elevada especificidade e sensibilidade, permitindo a detecção de quantidades muito baixas de ADN. No entanto, ao contrário dos métodos baseados em proteínas, a detecção de alergénios com base na análise de ADN é feita de forma indirecta, uma vez que se detecta o gene que codifica a proteína alergénica (D'Andrea et al., 2011; Mafra et al., 2008b).

2.5.1. Métodos baseados na análise de proteínas

Os métodos de detecção de alergénios baseados na análise de proteínas podem dividir-se em métodos imunológicos e métodos cromatográficos. Os ensaios ELISA e as Tiras de Fluxo Lateral (LFD) tratam-se de métodos imunológicos, enquanto a Espectrometria de Massa (MS) corresponde a um método cromatográfico (Heick et al., 2011; Holck et al., 2011).

A extracção das proteínas da matriz alimentar desempenha um papel fundamental no processo de detecção de alergénios. Para a maioria das matrizes, a extracção com tampão de fosfato salino (PBS) é suficiente. Esta etapa pode ser afectada pela baixa solubilidade de proteínas desnaturadas ou por proteínas que fiquem agregadas à matriz alimentar (Westphal et al., 2004).

Os ensaios **ELISA** são amplamente utilizados em estudos bioquímicos, baseando-se na interacção específica entre o anticorpo e o antigénio. No caso da detecção de alergénios alimentares, o antigénio é o alergénio em estudo. Tipicamente, os ensaios ELISA são realizados numa microplaca de 96 poços. Entre cada etapa dos ensaios efectua-se, geralmente, uma lavagem para remover os reagentes que possam contribuir para falsos positivos. O sucesso destes ensaios depende dos anticorpos utilizados. Desta forma, a utilização de anticorpos policlonais permite o reconhecimento de uma mistura de epítops diferentes e maior tolerância a mudanças na estrutura do alergénio.

Existem diversas modalidades de ELISA, tais como, ELISA indirecta, competitiva e sanduiche. Nos ensaios **ELISA indirecta**, os antigénios são imobilizados na superfície do poço e incubados com um anticorpo específico. A este complexo anticorpo/antigénio é adicionado um segundo anticorpo com uma enzima conjugada. Após adição do substrato e ligação do segundo anticorpo dá-se uma reacção enzimática que provoca o desenvolvimento de cor. Nos ensaios **ELISA sanduiche**, os anticorpos encontram-se imobilizados no suporte que capturam especificamente os antigénios. Após isso, a detecção é efectuada da mesma forma que nos ensaios ELISA indirecta. No procedimento **ELISA competitiva**, o complexo anticorpo/antigénio é transferido para um poço que contém antigénios imobilizados no suporte sólido. Os antigénios em solução irão competir com os antigénios imobilizados. De seguida são adicionados anticorpos com enzima conjugada e a partir da reacção enzimática é possível determinar a quantidade do alergénio.

Os diferentes ensaios ELISA descritos podem fornecer uma avaliação qualitativa ou quantitativa, caracterizam-se por serem baratos, rápidos e sensíveis, mas podem ser afectados pela reactividade cruzada e matriz alimentar (Baumgartner et al., 2007; Holck et al., 2011.)

O método baseado em **Tiras de Fluxo Lateral** trata-se de uma versão simplificada dos ensaios ELISA, não requer instrumentação elaborada, é simples de usar e permite uma triagem rápida. Por estes motivos, é frequentemente utilizado na indústria alimentar (Holck et al., 2011). Este método tem como fundamento o uso de tiras de nitrocelulose que possuem dois anticorpos específicos imobilizados com um reagente corado. Desta forma, quando uma tira é mergulhada num tubo que contém a amostra a analisar, ocorre a solubilização dos anticorpos e a formação do complexo anticorpo/analito. Este complexo flui lateralmente ao longo da tira, por acção capilar, e quando atinge o segundo anticorpo liga-se e acumula-se, provocando o aparecimento de cor. Se o teste funcionar correctamente aparecerá uma linha colorida e se aparecerem duas bandas, significa que o resultado é positivo para o alergénio em estudo. Este tipo de teste fornece apenas uma informação qualitativa ou um limite semi-quantitativo (Diaz-Amigo, 2010; Mafra & Oliveira, 2005).

Os métodos imunológicos podem revelar-se pouco eficazes na análise de amostras de alimentos muito processados, visto que a estrutura das proteínas pode ser afectada pelo processamento térmico. Outra questão a ter em conta será a reactividade cruzada entre as proteínas alergénicas de espécies filogeneticamente semelhantes (D'Andrea et al., 2009; Heick et al., 2011; Holck et al., 2011).

De forma a superar os inconvenientes dos métodos imunológicos e até dos métodos moleculares, os **métodos baseados em MS** podem ser uma alternativa para a detecção, identificação, caracterização e quantificação de vários alergénios numa única análise.

O elemento chave destes métodos passa pela separação de peptídeos e proteínas, que pode ser feita por electroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) ou por cromatografia líquida (LC). Geralmente, a técnica LC permite tempos de análise muito curtos e separação eficaz de proteínas de elevada e baixa massa molecular. Por este motivo, a separação de proteínas por LC é favorecida na análise de proteínas alergénicas alimentares.

A análise por LC acoplada a MS/MS tem sido amplamente utilizada, tanto para a identificação de alergénios em alimentos, como na pesquisa de biomarcadores para a detecção de alergénios alimentares. O espectro obtido na espectrometria de massa é analisado contra uma base de dados que contém inúmeras sequências proteicas. Desta forma, é possível identificar de forma inequívoca as proteínas.

Esta tecnologia permite a detecção com elevada sensibilidade de múltiplos alergénios alimentares numa única análise, no entanto, é uma tecnologia extremamente cara que requer conhecimento e treino adequados (Heick et al., 2011; Holck et al., 2011; Monaci & Visconti, 2009; Monaci & Visconti, 2010).

2.5.2. Métodos baseados na análise de ADN

Geralmente, os métodos de detecção de alergénios baseados em ADN consistem no uso da técnica da PCR. Neste caso, a detecção qualitativa pode ser efectuada por PCR convencional e a detecção quantitativa/semi-quantitativa por PCR em tempo real e PCR-ELISA (Mafrá et al., 2008b; Monaci & Visconti, 2010; Poms & Anklam, 2004). A especificidade destes métodos é atestada pelo uso de *primers* (oligonucleótidos iniciadores da PCR) que se ligam a um gene que codifica uma proteína alergénica ou a um gene específico da espécie. Além destes, o uso de uma sonda específica em PCR em tempo real tem como objectivo aumentar a especificidade da técnica (Holck et al., 2011).

Estudos recentes demonstraram que os métodos baseados na análise de ADN mitocondrial permitem uma elevada sensibilidade, quando comparados com o ADN nuclear. No entanto, os métodos baseados na análise de ADN nuclear têm sido mais largamente

utilizados para a quantificação de alergénios, devido à sua elevada exactidão (Galan et al., 2011).

A primeira etapa para a aplicação dos métodos de biologia molecular consiste na extracção e purificação dos ácidos nucleicos. Portanto, consiste numa etapa crucial para o sucesso da amplificação por PCR que deverá ser executada de forma eficaz, de modo a que as etapas posteriores de manipulação de ADN não fiquem comprometidas (Somma, 2006).

2.5.2.1. Extracção e purificação de ADN

O sucesso e eficiência dos métodos baseados na análise de ADN dependem, fortemente, do método de extracção e purificação dos ácidos nucleicos. Deste modo, através de um método de extracção eficaz deverão obter-se extractos de ADN de alta qualidade e pureza, livres de inibidores da actividade da ADN polimerase, usada na etapa seguinte de PCR. A eliminação dos inibidores permite, assim, diminuir a probabilidade da ocorrência de falsos negativos na PCR (Di Pinto et al., 2007; Somma, 2006).

A extracção dos ácidos nucleicos, das mais diversas matrizes alimentares, pressupõe a lise celular, a inactivação de nucleases intercelulares e a separação dos ácidos nucleicos dos restantes compostos celulares. O processo de lise deve ser o mais rigoroso possível, de forma a romper as paredes/membranas celulares, mas sem danificar os ácidos nucleicos. A inactivação das nucleases intercelulares pode ser feita em conjunto com a lise da membrana, usando uma solução que contenha detergentes que solubilizem as membranas e sais que inactivem as nucleases. Após esta etapa, a separação dos restantes compostos celulares é facilitada, por via de um processo de centrifugação ou precipitação (Somma, 2006).

Na tabela 2 apresentam-se resumidos alguns dos métodos de extracção descritos na literatura para a extracção de ADN de chocolates e outras matrizes alimentares.

Os métodos baseados no CTAB, nos kits Wizard[®] Magnetic DNA Purification System for Food (Promega), NucleoSpin[®] Food (Macherey-Nagel), e no uso parcial do kit Wizard[®] Plus Minipreps DNA Purification System (Promega) constituíram um dos objectos de estudo desta dissertação.

Método CTAB

O método CTAB é indicado para extrair e purificar ADN de tecidos vegetais, uma vez que foi desenvolvido, especialmente, para eliminar polissacarídeos e compostos polifenólicos. Este método consiste em: (1) lise da membrana celular, (2) remoção dos contaminantes e (3) isolamento dos ácidos nucleicos. Assim, a lise é provocada pela acção

de calor com o auxílio de um tampão que contém EDTA, Tris-HCl e detergente iónico CTAB (brometo de cetiltrimetilamónio). Nestas condições, os polissacarídeos, compostos fenólicos e outros contaminantes são solubilizados pelo detergente. A adição de PVP (polivinilpirrolidona) ao tampão e β -mercaptoetanol à mistura poderá facilitar a eliminação mais eficaz dos compostos fenólicos.

A remoção dos contaminantes é efectuada por extracção líquido-líquido com recurso a clorofórmio, que provoca a formação de uma fase aquosa e uma orgânica. Na fase aquosa encontram-se os ácidos nucleicos e na orgânica os contaminantes. Após recuperação eficiente da fase aquosa, procede-se à adição de uma solução de precipitação que contém o detergente CTAB e NaCl em elevada concentração. A solução de NaCl provoca a precipitação dos ácidos nucleicos. A eliminação do detergente é feita com sucessivas lavagens com etanol (Somma, 2006).

Tabela 2: Métodos de extracção de ADN aplicados a chocolates e outros alimentos descritos na literatura

Métodos de Extracção	Produto analisado	Referências
Método baseado no CTAB	Avelã (a, b, h) Chocolates (a, b, c, d, h) Soja (e, f, i), Caju (g)	a) Arlorio et al. (2007)
DNeasy [®] Plant Mini Kit (QIAGEN)	Soja, Trigo, Aveia, Arroz (i) Avelã (j, k, l), Chocolates (j, k, l, p)	b) Schöringhumer et al. (2009) c) Gryson et al. (2004) d) Gryson et al. (2007)
GeneSpin [™] DNA Isolation Kit (GeneScan)	Soja (f), Chocolates (c)	e) Galan et al. (2011) f) Mafra et al. (2008a)
NucleoSpin [®] Food kit (Macherey-Nagel)	Soja (f, m) Farinha de milho (m)	g) Ehlert et al. (2008) h) Holzhauser et al. (2000)
QIAamp [®] DNA Stool Mini Kit (QIAGEN)	Avelã e Chocolates (j, n) Soja e Milho (m)	i) Datukishvili et al. (2010) j) D'Andrea et al. (2009) k) Piknová et al. (2008)
Ultraclean [®] Plant DNA kit (MO BIO Laboratories)	Avelã e Chocolates (a)	l) Herman et al. (2003) m) Di Bernardo et al. (2007)
Wizard [®] Magnetic DNA Purification System for Food (Promega)	Avelã (a), Chocolates (a, c, p)	n) D'Andrea et al. (2011) o) Köppel et al. (2010) p) Di Pinto et al. (2007)
Wizard [®] Plus Minipreps DNA Purification System (Promega)	Avelã, Amêndoa (o) Soja (f, o)	

Método Wizard® Magnetic DNA purification system

O *kit Wizard® Magnetic DNA purification system* foi desenvolvido para purificar e extrair ADN de uma variedade de amostras processadas, incluindo óleos e chocolates.

Após o processo de lise, os ácidos nucleicos em solução são capturados por partículas magnéticas, separando assim o ADN dos contaminantes. Nos vários passos de purificação, as partículas são completamente ressuspendidas, o que facilita a remoção mais eficaz dos contaminantes.

Num processo final, as partículas são mergulhadas numa solução de baixa concentração salina, que recupera o ADN extraído (Promega, 2009).

Método NucleoSpin® Food kit

O *NucleoSpin® Food kit* é indicado para o isolamento de ADN de amostras de produtos de origem vegetal ou animal, incluindo uma gama alargada de alimentos. O processo de lise é realizado com recurso a aquecimento, sais caotrópicos, agentes desnaturantes, detergentes e proteinase K. Devido à tecnologia de membranas de sílica, a recuperação de pequenos fragmentos de ADN de matrizes alimentares muito processadas torna-se rápida e eficaz. O protocolo deste método caracteriza-se por ser rápido e simples de executar. A figura 2 permite elucidar o processo de recuperação de ADN (Macherey-Nagel, 2011).

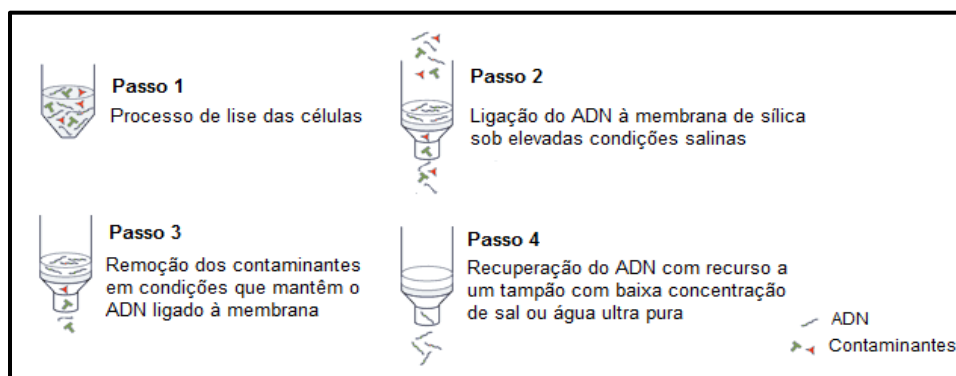


Figura 2: Representação simples do protocolo do NucleoSpin® Food kit (Adaptado de: Macherey-Nagel, 2011)

Método Wizard

O método Wizard baseia-se na utilização da resina e colunas do *kit Wizard® Plus Minipreps DNA*, de acordo com o protocolo descrito por Mafra et al. (2008a). O princípio deste método reside na ligação dos ácidos nucleicos à resina de sílica.

O processo de lise ocorre por aquecimento na presença de dodecilsulfato de sódio, incorporado na solução tampão, proteinase K e hidrocloreto de guanidina. Este último componente provocará a desnaturação das proteínas e a proteinase K fará a digestão enzimática e a eliminação das proteínas. Após este processo a resina de sílica é adicionada à solução. Depois de homogeneizada, a solução é transferida para as colunas do *kit Wizard*[®] Plus. À medida que a solução vai passando pela coluna, os ácidos nucleicos ficam retidos. A eliminação dos contaminantes é efectuada por sucessivas lavagens com isopropanol, enquanto o ADN permanece nas colunas, ligado à sílica.

A concentração e pureza dos ácidos nucleicos extraídos pelos diversos métodos, podem ser avaliadas por espectrofotometria UV, a diversos comprimentos de onda (230 nm, 260 nm, 280 nm e 320 nm). Desta forma, a concentração dos ácidos nucleicos pode ser determinada através do valor da absorvância lida a 260 nm, tendo como base a Lei de Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \times l \times C$$

em que, A corresponde à absorvância, ε à constante de absorvidade, l ao comprimento da cuvete e C à concentração. A utilização de cuvetes com 1 cm de percurso óptico e a absorvância lida a 260 nm igual a 1, pressupõe que a concentração de ADN de cadeia dupla seja de aproximadamente 50 $\mu\text{g/mL}$.

A pureza pode ser determinada tendo em consideração a razão entre $A_{260\text{nm}}$ e $A_{280\text{nm}}$, uma vez que as proteínas absorvem predominantemente a 280 nm. Então, para que uma amostra seja considerada pura a razão $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$ deverá ser, aproximadamente de 1,8. A razão entre $A_{260\text{nm}}$ e $A_{230\text{nm}}$ pode também ser um indicativo da pureza dos ácidos nucleicos (aproximadamente 2,0), uma vez que permite avaliar a contaminação por hidratos de carbono, fenóis ou compostos aromáticos. Os valores obtidos para $A_{320\text{nm}}$ servem para aferir a presença de interferentes ou material estranho em solução nas cuvetes utilizadas (Somma, 2006).

2.5.2.2. PCR convencional

O desenvolvimento da PCR deveu-se ao Prémio Nobel da Química, Kary Mullis, e à sua vasta equipa de investigação, em 1985. Esta técnica tem como princípio gerar múltiplas cópias de uma sequência alvo de ADN, com recurso a um par de oligonucleótidos (*primer reverse* e *primer forward*), que se ligam em zonas opostas da cadeia de ADN, e a uma polimerase termo estável. A reacção ocorre em três etapas distintas, que são determinadas por diferentes temperaturas, permitindo a desnaturação da cadeia dupla do ADN, a

hibridação dos *primers* e a extensão dos *primers* pela ADN polimerase (Somma & Querci, 2006b; The World of Food Science, 2011).

A etapa de desnaturação da cadeia dupla do ADN é realizada a uma temperatura que ronda os 95°C, que provoca a separação do ADN em cadeias simples e o aumento de bases desemparelhadas em solução.

Na etapa de hibridação, os *primers* ligam-se em zonas opostas da cadeia de ADN alvo. A temperatura desta etapa (geralmente 55-65°C) depende do conteúdo de C (citosina) e G (guanina) da sequência dos *primers*, ou seja, quanto maior o conteúdo em C e G, maior será a temperatura de hibridação (comummente designada de temperatura de *annealing*) e vice-versa. A aplicação de uma temperatura de *annealing* incorrecta pode provocar efeitos indesejados na amplificação dos fragmentos de ADN. Com efeito, se a temperatura for demasiado baixa poderá haver falta de especificidade da reacção; e se a temperatura for demasiado alta poderá não ocorrer a ligação total dos *primers* à cadeia do ADN. Na etapa de extensão, a ADN polimerase sintetiza as cadeias complementares a partir dos *primers*, na presença de dNTP, à temperatura óptima de 72°C. A duração desta etapa depende do tamanho da região de ADN que se pretende amplificar (quanto maior, mais tempo será necessário). A figura 3 esquematiza de forma simples as três etapas descritas.

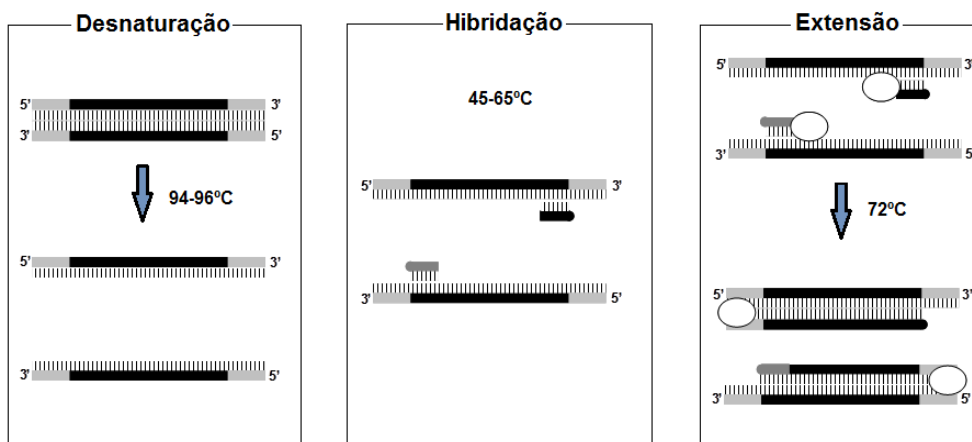


Figura 3: Esquematização das etapas da PCR (adaptado de: Mafra & Oliveira, 2005)

Tipicamente, as etapas de desnaturação, hibridação e extensão repetem-se durante 25 a 40 ciclos, para que se produzam cópias suficientes para a detecção do fragmento alvo. Se a amplificação por PCR for bem otimizada e eficiente, o número de cópias do fragmento é proporcional ao número de ciclos: $2^{\text{n}^\circ \text{ de ciclos}}$ (Holzhauser, et al., 2006; Somma & Querci, 2006b).

Para que as etapas descritas sejam desenvolvidas com sucesso deverão estar presentes, numa solução, os seguintes constituintes:

- Fragmento de ADN alvo;
- Par de *primers*;
- dNTP;
- Magnésio (Mg^{2+});
- ADN polimerase

Por norma, uma pequena quantidade de ADN alvo é suficiente para que a amplificação seja bem sucedida, mas quanto maior a quantidade, maior será a probabilidade de eficácia da técnica. Os *primers* conferem elevada especificidade à técnica de PCR, quando desenhados de forma correcta. Na análise de alimentos muito processados o par de *primers* deve ser desenhado, por forma a produzir um fragmento (amplicão) de tamanho pequeno (inferior a 150-200 pares de bases (pb)). A presença de dNTP é fundamental para a construção da nova cadeia dupla sintetizada pela ADN polimerase. Os iões Mg^{2+} estimulam a actividade da enzima polimerase e formam um complexo solúvel com os dNTP, para facilitar a síntese da nova cadeia de ADN. Normalmente, uma concentração baixa pode provocar baixo rendimento na PCR e uma concentração elevada pode levar à produção de fragmentos não específicos.

A enzima utilizada na PCR deverá ser resistente a elevadas temperaturas, sendo extraída e purificada vulgarmente a partir bactéria termofílica, *Thermus aquaticus* (*Taq*), daí a designação de Taq ADN polimerase. A fim de proporcionar um ambiente de actividade óptima da polimerase de ADN e evitar a acção de enzimas que possam prejudicar a amplificação dos fragmentos alvo, é adicionado à solução um tampão de reacção que mantém o pH de 8 (Somma & Querci, 2006b). Como o tampão depende da ADN polimerase utilizada é, geralmente, comercializado em conjunto com a enzima.

Uma forma de atestar a eficácia da PCR passa por incluir na reacção um controlo positivo e um controlo negativo. Por um lado, o controlo positivo permite excluir resultados falsos negativos e efectivar o sucesso da reacção. Por outro lado, o controlo negativo permite evitar interpretações erradas provocadas por resultados falsos positivos, devido a contaminações pré-PCR (Somma & Querci, 2006b; The World of Food Science, 2011).

Os produtos resultantes da PCR são, em geral, visualizados e identificados por electroforese, a pH neutro. Esta técnica consiste na aplicação de um campo eléctrico às moléculas de ADN para que estas migrem através do gel. Como os ácidos nucleicos apresentam carga negativa, a pH neutro, a migração dá-se do pólo negativo para o pólo positivo, separando-se, assim, de acordo com o tamanho do fragmento. Nesta técnica podem ser usados géis de agarose ou de poliacrilamida. Geralmente, os de agarose, são

usados para ensaios de rotina e os de poliacrilamida quando existem fragmentos a separar de tamanhos muito próximos (Mafra et al., 2008b; Somma & Querci, 2006a).

Por fim, é possível avaliar visualmente a presença/ausência do fragmento alvo (bandas no gel), com recurso a luz ultravioleta. No entanto, uma banda de um determinado tamanho não significa necessariamente que o fragmento alvo foi amplificado. Desta forma, a confirmação dos fragmentos pode ser feita com recurso a enzimas de restrição, sequenciação dos produtos de PCR ou pela hibridação específica com sondas. Este último caso é feito com recurso à tecnologia de PCR em tempo real (Poms & Anklam, 2004, Mafra et al., 2008b).

2.5.2.3. PCR em tempo real

A PCR em tempo real surgiu de forma a colmatar a falta de conhecimento quantitativo da amplificação de ADN, nas análises feitas por PCR convencional. Essa falta de conhecimento quantitativo deve-se ao facto da eficiência de amplificação em cada ciclo não permanecer constante. Nos últimos ciclos, os produtos da amplificação formam-se de forma não exponencial a uma velocidade de reacção desconhecida.

A técnica de PCR em tempo real permite a quantificação e a monitorização do processo à medida que este vai ocorrendo. A cada ciclo de amplificação é medido um sinal fluorescente, que é proporcional à quantidade de ADN que vai sendo amplificado. O número de ciclos de PCR necessário para a produção de sinal de fluorescência, estatisticamente acima do nível de ruído do aparelho, é designado de Ct (*Cycle threshold*).

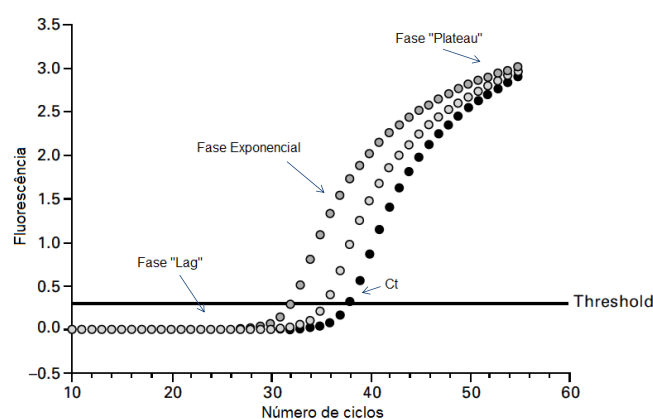


Figura 4: Exemplo de construção gráfica da PCR em tempo real (adaptado de: Holzhauser, 2006)

A medição do sinal de fluorescência permite efectuar uma construção gráfica semi-logarítmica, que se traduz no aumento do sinal em função do número de ciclos (Weighardt, 2006). Geralmente é possível identificar três fases distintas na construção gráfica, como a fase “lag”, fase exponencial e fase “plateau” (figura 4). A fase “lag” encontra-se sempre

abaixo da linha *threshold* e nela podem verificar-se algumas variações no traçado, uma vez que corresponde ao ruído do aparelho. Na fase exponencial observa-se um aumento acentuado dos valores de fluorescência, proporcional à quantidade de ADN que está a ser amplificado. Quando se atinge a saturação, os valores de fluorescência mantêm-se constantes e verifica-se que o declive tende para zero, correspondendo à fase “plateau”.

Após a amplificação é possível construir curvas padrão a partir dos valores de Ct em função do logaritmo da quantidade de ADN, que permitem quantificar o ADN alvo numa determinada amostra. Para isso, compara-se os valores de Ct das amostras com os obtidos para cada padrão. O coeficiente de correlação da curva padrão (R^2) deverá ser, preferencialmente, próximo de 1, enquanto o declive da curva deverá ser próximo de -3,3 para que a eficiência seja próxima de 100% (Broll, 2010; Weighardt, 2006).

A eficiência da PCR em tempo real é determinada através do declive da curva padrão, tendo como base a seguinte fórmula:

$$E = \left(10^{-1/x} - 1\right) \times 100$$

em que, E corresponde à eficiência da reacção e x ao declive da curva de calibração. Eficiências muito baixas poderão indicar, por exemplo, a presença de compostos que inibam a correcta amplificação dos fragmentos alvo.

A especificidade da PCR em tempo real depende das substâncias utilizadas para gerar fluorescência. Para isso, existem essencialmente dois tipos de estratégias: agentes corantes (por exemplo o SYBR[®] Green I) e sondas específicas para a sequência alvo (sondas TaqMan[™], Scorpion[™], Molecular Beacons[™] e FRET) (Broll, 2010; Mafra & Oliveira, 2005; Weighardt, 2006).

A utilização do corante SYBR[®] Green I constitui o processo mais simples e económico para PCR em tempo real. Durante a extensão dos *primers*, este corante intercala-se na cadeia dupla de ADN que está a ser sintetizada emitindo fluorescência. A utilização de SYBR[®] Green I tem a vantagem de permitir o cálculo da temperatura de desnaturação ou *melting* do fragmento alvo para verificação da especificidade na formação de um dado produto. Contudo, este sistema é pouco específico no que concerne ao reconhecimento das cadeias duplas de ADN alvo, o que leva ao aumento de falsos positivos (D’Andrea et al., 2009; Mafra & Oliveira, 2005; Weighardt, 2006). Recentemente têm surgido novos corantes com maior potencial fluorescente e elevada especificidade para as cadeias duplas de ADN, como o EvaGreen[®] (BIO-RAD, 2011).

O uso de sondas específicas para a sequência de ADN alvo marcadas com fluoróforo confere à PCR em tempo real elevada especificidade, uma vez que funcionam como mais um parâmetro de confirmação de que o fragmento amplificado é, efectivamente, o

pretendido. De uma forma simples, uma sonda consiste num oligonucleótido que possui um fluoróforo e um *quencher* (elemento neutralizador). O fluoróforo emite fluorescência quando absorve a energia luminosa e o *quencher* anula a emissão de fluorescência quando se encontra próximo do fluoróforo.

O sistema de sondas de hidrólise do tipo TaqMan™ explora o uso da actividade 5' da exonuclease da Taq polimerase para produzir o sinal de fluorescência, por separação física do fluoróforo e do *quencher* (figura 5). Nos sistemas Scorpion™ e Molecular Beacon™, a separação do fluoróforo ocorre por interacção entre a sonda e o fragmento alvo a amplificar (Mafra & Oliveira, 2005; Weighardt, 2006; Wiseman, 2002).

A tecnologia FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) consiste no uso de duas sondas, cada uma com um fluoróforo. O princípio desta tecnologia é a transferência de energia de um fluoróforo doador para um receptor. Quando os dois fluoróforos estão próximos um do outro ocorre, então, a transferência de energia e a consequente emissão de fluorescência (Mafra & Oliveira, 2005; Weighardt, 2006).

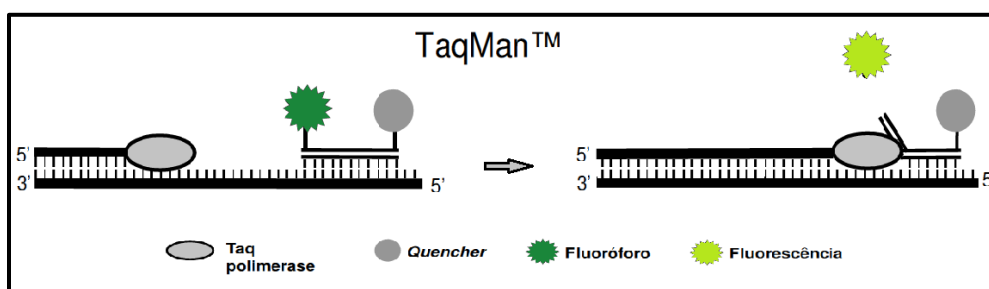


Figura 5: Mecanismo de funcionamento das sondas TaqMan® (adaptado de: Maфра & Oliveira, 2005)

A técnica de PCR em tempo real tem-se revelado uma metodologia promissora na análise de alimentos crus e processados por diversos factores (Holzhauser, 2006; Levin, 2004; Maфра & Oliveira, 2005):

- Reduzido tempo de análise (cerca de 60 min);
- Não necessita de operações pós-PCR (electroforese em gel de agarose);
- Amplificação de fragmentos de ADN muito pequenos (60-80 pb);
- Análise quantitativa;
- Elevada sensibilidade e especificidade.

No entanto, a análise quantitativa só é possível se forem usados materiais de referência certificados. Pelo que, se não houver a disponibilidade de materiais de referência, a análise por PCR em tempo real será semi-quantitativa. O custo elevado dos equipamentos e reagentes tornam esta técnica actualmente ainda um pouco dispendiosa (D'Andrea et al., 2009; Maфра & Oliveira, 2005).

2.5.2.4. PCR-ELISA

A técnica PCR-ELISA combina a elevada especificidade da PCR com a simplicidade dos ensaios ELISA. O passo inicial desta técnica passa pela amplificação dos fragmentos alvo, por PCR, com algumas alterações, uma vez que são produzidos fragmentos biotinizados (fragmentos com biotina). Após amplificação, os fragmentos são ligados à superfície de um poço de uma microplaca revestido com estreptavidina. A afinidade entre a biotina e a estreptavidina promove uma ligação eficaz dos fragmentos ao poço. De seguida, os fragmentos são desnaturados e apenas as cadeias simples biotinizadas permanecem no poço da microplaca, sendo, posteriormente, hibridizadas com uma sonda específica. O passo seguinte consiste na detecção com recurso a um anticorpo com uma enzima conjugada, como nos ensaios ELISA. A análise semi-quantitativa pode ser conseguida através do uso de um competidor.

Esta técnica permite uma detecção rápida e simples, quando comparada com outras técnicas e é, geralmente, considerada como uma alternativa mais barata para laboratórios que não possuam equipamentos de PCR em tempo real. Além disso, pode ser uma ferramenta poderosa para a monitorização de alergénios devido à maior estabilidade do ADN em relação às proteínas (Diaz-Amigo & Popping, 2010; Holzhauser et al., 2002; Poms & Anklam, 2004).

2.6. Aplicação de técnicas baseadas na PCR para a detecção de avelã em alimentos

O desenvolvimento e utilização de métodos de detecção e quantificação de alergénios é indispensável para verificar o cumprimento da rotulagem de alimentos e monitorizar a contaminação cruzada na indústria alimentar. Desta forma, é possível melhorar a segurança dos consumidores alérgicos (Mafra et al., 2008b).

Tendo em consideração que as moléculas de ADN são mais estáveis ao processamento térmico do que as proteínas, os métodos baseados na análise de ADN têm-se mostrado como ferramentas fiáveis na detecção de quantidades vestigiais de ingredientes alergénicos em alimentos muito processados.

Relativamente à detecção específica de vestígios de avelã por PCR em alimentos processados, existe ainda um número limitado de trabalhos publicados, embora dentro dos frutos de casca rija seja o alvo mais estudado. No ano de 2000, Holzhauser et al. publicaram a primeira técnica de PCR qualitativa para a detecção de vestígios de avelã em alimentos processados, nomeadamente chocolates e biscoitos. Para isso, usaram *primers* específicos para a amplificação de fragmentos de 182 pb do gene que codifica o alergénio Cor a 1.0401.

De forma a determinarem o limite de detecção da técnica preparam padrões de chocolate com 10%, 1%, 0,1%, 0,01% e 0,001% de avelã torrada a 140°C, durante 30 min. O limite de detecção alcançado foi de 0,001% (m/m). Em 2002, os mesmos autores, através da técnica PCR-ELISA utilizando *primers* para a amplificação de fragmentos de 152 pb do mesmo gene, obtiveram um limite de detecção abaixo de 0,001% (m/m) em chocolates, barras de cereais, cereais de pequeno-almoço e sobremesas (Holzhauser et al., 2002).

Herman et al. (2003), usando *primers* no gene mitocondrial *nad1*, amplificaram fragmentos de 294 pb, conseguindo detectar 0,001% (m/m) de avelã em chocolate.

Germi et al. (2005) alcançaram um limite de detecção de 5 pg de avelã por PCR qualitativa. Neste estudo, amplificaram fragmentos de 156 pb específicos para o gene que codifica o alergénio Cor a 1.0301. A pesquisa de avelã foi feita em cereais de pequeno-almoço, *snacks*, chocolates e bolachas.

Uma técnica de PCR em tempo real com a utilização de sondas TaqMan™ foi desenvolvida por Arlorio et al. (2007) para a detecção específica de avelã com alvo no gene que codifica o alergénio Cor a 1.04. A técnica foi aplicada com sucesso na detecção de avelã em chocolates, biscoitos e *snacks*, com um limite de detecção alcançado de 0,1 ng de avelã. Utilizando a mesma técnica, Píknová et al. (2008), com alvo no gene *hsp1*, alcançaram um limite de 0,01% (m/m) em misturas padrão de avelã em noz. A aplicação da técnica em amostras comerciais permitiu a detecção de avelã em chocolates, biscoitos, bolachas e cereais de pequeno-almoço.

D'Andrea et al. (2009) prepararam misturas padrão de avelã em farinha de trigo com as proporções de avelã de 1%, 0,1%, 0,01% e 0,001% (m/m). Recorrendo à técnica de PCR em tempo real com o corante SYBR® Green I para a sequência alvo do gene *Cor a 8* conseguiram detectar até 0,001% (m/m) de avelã e aplicar a técnica a amostras comerciais de chocolates, biscoitos e bolachas. Mais tarde, os mesmos autores (D'Andrea et al., 2011), por PCR convencional e PCR em tempo real, utilizando o corante SYBR® Green I, atingiram o mesmo limite de detecção para a avelã (0,001%). As reacções foram realizadas com 3 pares de *primers*, para os genes que codificam para os alergénios Cor a 1, Cor a 8 e Cor a 14. Os alimentos testados incluíram biscoitos, chocolates e cremes de avelã.

Schöringhumer et al. (2009), através de PCR em tempo real duplex com sondas TaqMan™, conseguiram um limite de detecção para a avelã de 0,005% (m/m) com alvo numa sequência do gene *Cor a 1*. A avelã foi pesquisada em 30 produtos comerciais, como bolachas, chocolates, cremes e *snacks*.

Köppel et al. (2010) prepararam bolachas com avelã, amendoim, amêndoa e sésamo. Desenvolveram dois sistemas de PCR em tempo real em multiplex com sondas TaqMan™ que lhes permitiram detectar simultaneamente avelã, amendoim, aipo e soja, num sistema, e amêndoa, sésamo, ovo e leite, no outro. Estas combinações em *tetraplex* foram efectuadas

tendo em conta a probabilidade destes ingredientes serem encontrados juntos no mesmo alimento. Desta forma, conseguiram detectar até 0,001% (m/m) de avelã. Este estudo permitiu a detecção de avelã com alvo numa sequência do gene *Cor a 1* em vários bolos, chocolates e *snacks*.

Pafundo et al. (2010) desenvolveram outra técnica de PCR em tempo real em multiplex, mas com recurso ao corante SYBR® GreenER™, para detectar seis potenciais alergénios, maioritariamente de frutos de casca rija, em simultâneo: amêndoa (*Prunus dulcis*), avelã (*Corylus avellana*), castanha de caju (*Anacardium occidentale*), amendoim (*Arachis hypogea*), noz comum (*Juglans regia*) e sementes de sésamo (*Sesamum indicum*). No caso da avelã, utilizaram *primers* específicos para o gene que codifica para o alergénio *major* da avelã, *Cor a 1*, tendo conseguido um limite de detecção de 5 pg de avelã. A técnica foi aplicada em várias matrizes alimentares, incluindo biscoitos e chocolates.

Os trabalhos desenvolvidos e descritos encontram-se compilados na tabela 3. Tendo em consideração o número limitado de trabalhos científicos referente à detecção de vestígios de avelã em alimentos processados, torna-se crucial mais investigação para que se desenvolvam métodos cada vez mais sensíveis e específicos.

Tabela 3: Resumo dos trabalhos publicados referentes à aplicação da PCR na detecção de avelã em alimentos

Método	Gene alvo	Limite de detecção	Matriz alimentar analisada	Referências
PCR	<i>Cor a 1.0401</i>	0,001% (m/m)	Chocolates, <i>snacks</i>	Holzhauser et al. (2000)
	<i>nad1</i>	0,001% (m/m)	Chocolates	Herman et al. (2003)
	<i>Cor a 1.0301</i>	5 pg de ADN	Cereais, bolachas, chocolates, <i>snacks</i>	Germini et al. (2005)
PCR-ELISA	<i>Cor a 1.0401</i>	≤0,001% (m/m)	Chocolates, cereais, barras de cereais	Holzhauser et al. (2002)
PCR em tempo real	<i>Cor a 1</i>	0,1 ng de ADN	Chocolates, <i>snacks</i> cremes, biscoitos	Arlorio et al. (2007)
	<i>hsp1</i>	0,01% (m/m)	Chocolates, bolachas, biscoitos, cereais	Piknová et al. (2008)
	<i>Cor a 8</i>	0,001% (m/m)	Chocolates, cremes, biscoitos, bolachas	D'Andrea et al. (2009)
	<i>Cor a 1</i> <i>Cor a 8</i> <i>Cor a 14</i>	0,001% (m/m)	Chocolates, creme de avelã, biscoitos	D'Andrea et al. (2011)
PCR em tempo real multiplex	<i>Cor a 1</i>	0,005% (m/m)	<i>Snacks</i> , bolachas, chocolates, cremes	Schörimhumer et al. (2009)
	<i>Cor a 1</i>	0,001% (m/m)	Bolos, chocolates, <i>snacks</i>	Köppel et al. (2010)
	<i>Cor a 1</i>	5 pg de ADN	Biscoitos e chocolates	Pafundo et al. (2010)

3. Metodologia experimental

Dada a natureza dos procedimentos de biologia molecular é necessário controlar e evitar a contaminação de extractos de ADN e soluções utilizadas. Deste modo, vários cuidados foram adoptados, tais como:

- Todas as soluções foram preparadas com reagentes aptos para a utilização em biologia molecular (elevado grau de pureza), as usadas em PCR foram armazenadas em pequenas alíquotas;
- Os tubos utilizados na extracção de ADN e nas misturas de PCR, e todos os reagentes aquosos, à excepção de dNTP e ADN polimerase foram autoclavados a 121°C, com o objectivo de degradar possíveis nucleases e ADN;
- O uso constante e a mudança periódica de luvas foram imprescindíveis;
- As extracções de ADN e a preparação de misturas de PCR foram realizadas em locais distintos. Cada local possuía equipamentos e materiais diferenciados, como luvas, tubos, micropipetas, pontas e mini centrífuga. O local de preparação das misturas de PCR era isolado das restantes áreas e equipado com sistema de luzes UV;
- Em todas as misturas de PCR foram incluídos controlos negativos que visavam o controlo dos reagentes.

3.1. Descrição das amostras

Neste estudo foram utilizadas amostras de 25 chocolates comerciais de várias marcas, com o intuito de detectar vestígios de avelã, como potencial alergénio. O objectivo foi verificar se os chocolates que continham menções de precaução foram ou não contaminados com avelã. Na tabela 4 encontram-se listadas as informações declaradas nos rótulos de todos os chocolates analisados.

As amostras foram trituradas usando um moinho de lâmina dupla, para preparação de amostras para análise laboratorial (Grindomix GM200, Retsch, Alemanha). Como forma de minimizar possíveis contaminações, cada amostra foi triturada em acessórios independentes esterilizados e armazenada em recipientes esterilizados. Até ser realizada a extracção do ADN, os recipientes com as amostras foram armazenados a cerca de -20°C.

Tabela 4: Descrição da rotulagem das amostras de chocolates comerciais

Código	Designação	Ingredientes
A1	Chocolate preto com frutos secos inteiros	Açúcar, cacau, frutos secos (24,5%) (amêndoas, uvas passas, avelãs), manteiga de cacau, gordura láctea, emulsionante (lecitina de soja), aromas. Pode conter vestígios de outros frutos de casca rija e leite. Cacau (47% mínimo).
A2	Chocolate de leite com amêndoa e mel	Leite condensado, açúcar, manteiga de cacau, amêndoas (7,5%), mel (5,5%), cacau, manteiga concentrada, xarope de glucose, emulsionante (lecitina de soja), clara de ovo em pó, extracto de baunilha. Pode conter vestígios de outros frutos de casca rija e de trigo. Cacau (28% mínimo).
A3	Chocolate de leite com amêndoas	Açúcar (53%), manteiga de cacau, leite em pó, pasta de cacau, amêndoas (11%), soro de leite em pó, emulsionante (lecitina de soja), aroma (vanilina). Cacau (30% mínimo). Contém leite, soja e frutos de casca rija. Pode conter vestígios de cereais com glúten e amendoim.
A4	Chocolate de leite com frutos de casca rija	Chocolate de leite (leite – cerca de 426 mL de leite fresco por cada 227g de chocolate, açúcar, manteiga de cacau, pasta de cacau, gordura vegetal, emulsionante E442, aromatizantes), passas pulverizadas (18%) (passas, cacau), amêndoas (7%). Contém frutos secos de casca rija, leite e outras gorduras vegetais além da manteiga de cacau, pode conter trigo e soja.
A5	Chocolate de leite com amêndoas	Açúcar, amêndoas (25%), leite gordo em pó (18%), manteiga de cacau, pasta de cacau, lactose, emulsionante (lecitina de soja), aroma. Contém leite, soja e frutos de casca rija. Pode conter vestígios de glúten, amendoins e ovos. Cacau (30% mínimo)
A6	Chocolate de leite com amêndoas	Chocolate com recheio de trufa (42%) e amêndoas (8%). Açúcar, gordura vegetal, pasta de cacau, manteiga de cacau, amêndoas (8%), leite magro em pó, soro de leite em pó, pasta de amêndoas (4%), gordura de leite, leite gordo em pó, pasta de avelãs, emulsionante (lecitina de soja), aromatizante (vanilina), Cacau em chocolate de leite (30% mínimo). Contém leite, amêndoas, avelãs, soja. Pode conter vestígios de outros frutos secos de casca rija e trigo
A7	Chocolate de leite com amêndoas	Açúcar, manteiga de cacau, leite (18%), amêndoas (15%), cacau, soro lácteo em pó, emulsionante (lecitina de soja), aroma. Pode conter vestígios de outros frutos de casca rija, glúten e ovo. Cacau (30% mínimo).
A8	Chocolate de leite com avelãs	Açúcar, confeição de avelãs 22,9% (avelãs 50%, açúcar 50%), manteiga de cacau, leite em pó, massa de cacau, leite em pó magro, soro lácteo em pó, lactose, gordura butírica, emulsionante (lecitina de soja), leite em pó rico em matéria gorda, pasta de avelãs, aromatizante natural, sal. Cacau (30% mínimo). Pode conter vestígios de glúten, amendoins e outros frutos de casca rija.
A9	Chocolate branco com avelãs	Açúcar, manteiga de cacau, avelãs (14%), leite gordo em pó, emulsionante (lecitina de soja), baunilha natural. Cacau (28% mínimo). Extracto de leite: 14% mínimo, no chocolate branco. Pode conter vestígios de avelãs e glúten.

Tabela 4: (continuação)

Código	Designação	Ingredientes
A10	Chocolate com avelãs inteiras	Açúcar, avelãs inteiras (25%), manteiga de cacau, pasta de cacau, emulsionante (E322) e aromatizante. Cacau (30% mínimo). Contém leite, frutos de casca rija e soja. Pode conter vestígios de ovo e glúten.
A11	Chocolate de leite com amêndoas	Açúcar, amêndoas (19%), pasta de cacau, leite em pó, manteiga de cacau, soro de leite em pó, gordura de leite, xarope de glucose, sal, manteiga, cacau magro em pó, emulsionante (lecitina de soja), aromatizantes. Cacau (35% mínimo). Contém leite, amêndoas, soja. Pode conter vestígios de outros frutos de casca rija.
A12	Chocolate de leite com amêndoas	Açúcar, manteiga de cacau, amêndoas (15%), leite em pó, pasta de cacau, soro de leite em pó, manteiga concentrada, emulsionante (lecitina de soja), e aromatizante. Cacau (35% mínimo). Pode conter vestígios de amendoim, avelã e glúten.
A13	Chocolate de leite com amêndoas inteiras	Açúcar, amêndoas inteiras (25%), leite inteiro em pó, manteiga de cacau, pasta de cacau, emulsionante (E322) e aromatizante. Cacau (30% mínimo). Contém leite, frutos de casca rija e soja. Pode conter vestígios de ovo e glúten.
A14	Chocolate com leite e amêndoas	Açúcar, amêndoas (20%), manteiga de cacau, leite em pó, pasta de cacau, lactose, soro de leite em pó magro, emulsionante (lecitina de soja), extracto de malte de cevada, aroma: baunilha. Cacau (30% mínimo). Pode conter vestígios de avelãs.
A15	Chocolate de leite com amêndoa, avelã e passas	Açúcar, manteiga de cacau, leite em pó, pasta de cacau, amêndoas (5%), avelãs (5%), uvas passas (5%), soro de leite em pó, manteiga concentrada, emulsionante (lecitina de soja) e aromatizante. Cacau (31% mínimo). Pode conter vestígios de amendoim e glúten.
A16	Chocolate com maçapão e champanhe	Chocolate com maçapão (38%) e recheio (30%) de morangos em champanhe Açúcar, pasta de cacau, morangos (11%), amêndoas (10%), amêndoas de alperce, xarope de glicose, licores, vinhos, (vinho branco e champanhe 2%), manteiga de cacau, gordura láctea, etilvanilina e outros aromatizantes, regulador de acidez (ácido cítrico), emulsionante: lecitina de colza, espessante (pectina), conservante (ácido ascórbico). Mínimo 54% de cacau. Pode conter vestígios de leite e frutos de casca rija.
A17	Chocolate de leite com avelãs	Chocolate de leite (açúcar, manteiga de cacau, leite gordo em pó, pasta de cacau, emulsionante: lecitina de soja, aromatizante vanilina), arroz crocante 8% (farinha de arroz, açúcar, extracto de malte (cevada), sal, estabilizante E170i, óleo vegetal (sementes de colza), emulsionante: lecitina de soja, avelãs 2%, açúcar, aromatizante: avelãs. Percentagem de cacau: mínimo 35%.

Tabela 4: (continuação)

Código	Designação	Ingredientes
A18	Chocolate de leite com cereais	Açúcar, manteiga de cacau, 15% cereais crocantes (65% farinha de arroz, açúcar, malte de trigo, farinha de milho, glúten, dextrose de trigo, sal), leite magro em pó, pasta de cacau, soro de leite em pó açucarado, matéria gorda láctea, pasta de avelã, emulsionante: lecitina de soja, aromatizante de baunilha. Cacau: 30% mínimo. Pode conter vestígios de outros frutos de casca rija.
A19	Chocolate negro	Pasta de cacau, açúcar, manteiga de cacau, cacau magro em pó, emulsionante: lecitina de soja, aroma de baunilha. Cacau: 74% mínimo. Pode conter vestígios de amendoim, frutos de casca rija, glúten e leite.
A20	Chocolate de leite com avelãs	Açúcar, 27% avelãs, manteiga de cacau, 12% nata em pó, pasta de cacau, 3,5% leite gordo em pó, soro de leite açucarado em pó, lactose, emulsionante: lecitina de soja, aromatizante: vanilina. Cacau: 33% mínimo. Pode conter vestígios de amêndoa e componentes do trigo.
A21	Chocolate preto com recheio de tiramisu	Massa de cacau, açúcar, gordura vegetal, cacau magro em pó, dextrose, manteiga de cacau, lactose, soro lácteo em pó, leite em pó rico em matéria gorda, preparação de café (café, gordura vegetal), emulsionante: lecitina de soja, aroma natural de creme, aroma natural de baunilha, aroma natural de café com outros aromas naturais, sal. Cacau: 65% mínimo. Pode conter vestígios de frutos de casca rija, amendoim, glúten e ovos.
A22	Chocolate de leite com recheio de avelã	Açúcar, manteiga de cacau, pasta de cacau, leite magro em pó, gorduras vegetais, soro de leite em pó, 5% pasta de avelã, gordura de leite, leite gordo em pó, cacau em pó, emulsionante: lecitina de soja, aromatizantes. Contém leite, avelãs e soja. Pode conter vestígios de outros frutos de casca rija.
A23	Chocolate de leite com avelãs	Açúcar, manteiga de cacau, leite em pó, massa de cacau, 10% avelãs, lactose, gordura butírica, leite em pó rico em matéria gorda, emulsionante: lecitina de soja, pasta de avelãs, aroma natural de baunilha. Cacau: 30% mínimo. Pode conter vestígios de frutos de casca rija, amendoim, glúten e ovos.
A24	Chocolate de leite com mousse de chocolate	Açúcar, 24% leite gordo em pó, manteiga de cacau, gordura vegetal, pasta de cacau, cacau magro em pó, manteiga concentrada, polpa de avelã, emulsionante: lecitina de soja, extracto de baunilha, aromatizante natural de baunilha. Pode conter vestígios de outros frutos de casca rija.
A25	Chocolate de leite com pedaços de avelãs	Açúcar, manteiga de cacau, leite magro em pó, 12% avelã, pasta de cacau, soro de leite em pó açucarado, manteiga concentrada, emulsionante: lecitina de girassol, polpa de avelã, aromatizante natural de baunilha. Cacau: 30% mínimo. Pode conter vestígios de outros frutos de casca rija e soja.

3.2. Preparação das misturas padrão

Para a optimização das técnicas de PCR foi necessário preparar misturas binárias padrão com diferentes quantidades de avelã numa matriz à base de trigo (massa pevide). Previamente, a avelã e a massa pevide foram trituradas separadamente no moinho de lâmina dupla (Grindomix GM200). A primeira mistura de referência (50%) foi preparada por adição de avelã triturada em massa triturada, sendo as restantes misturas preparadas por diluições seriadas em massa até à proporção de 0,0001%, conforme tabela 5. De forma a minimizar possíveis contaminações, cada mistura de referência foi triturada/misturada com acessórios independentes e esterilizados, sendo armazenadas em recipiente esterilizados a -20°C até extracção de ADN.

Tabela 5: Misturas binárias de referência de avelã em massa pevide

Padrão	Composição	Quantidade de avelã
M0	100 g Massa	0%
M1	100 g Avelã + 100 g Massa	50% (500 g/kg)
M2	25 g M1 + 100 g Massa	10% (100 g/kg)
M3	50 g M2 + 50 g Massa	5% (50 g/kg)
M4	25 g M3 + 100 g Massa	1% (10 g/kg)
M5	50 g M4 + 50 g Massa	0,5% (5 g/kg)
M6	25 g M5 + 100 g Massa	0,1% (1 g/kg)
M7	50 g M6 + 50 g Massa	0,05% (500 mg/kg)
M8	25 g M7 + 100 g Massa	0,01% (100 mg/kg)
M9	50 g M8 + 50 g Massa	0,005% (50 mg/kg)
M10	25 g M9 + 100 g Massa	0,001% (10 mg/kg)
M11	50 g M10 + 50 g Massa	0,0005% (5 mg/kg)
M12	25 g M11 + 100 g Massa	0,0001% (1 mg/kg)

Para a optimização da técnica de PCR em amostras de chocolate, procedeu-se à preparação de misturas de referência de avelã em chocolate. Para isso, utilizou-se chocolate com 41% de cacau isento de vestígios de avelã (previamente testado por PCR convencional para a presença de avelã).

Para a preparação dos padrões em questão, o chocolate foi colocado a 40°C durante todo o procedimento. A primeira mistura de referência (50%) foi preparada por adição de avelã triturada em chocolate, sendo as restantes misturas preparadas por

diluições seriadas com chocolate até à proporção de 0,0001%, conforme a tabela 6. De forma a obter uma correcta e completa homogeneização, todas as misturas foram mantidas a 40°C. Cada mistura foi colocada em recipientes (moldes) e armazenada a -20°C para solidificação. No dia seguinte, as misturas foram trituradas em acessórios independentes e esterilizados, armazenadas a -20°C até realização da extracção de ADN.

Tabela 6: Misturas binárias de referência de avelã em chocolate

Padrão	Composição	Quantidade de avelã
C0	100 g Chocolate	0%
C1	100 g Avelã + 100 g Chocolate	50% (500 g/kg)
C2	100 g C1 + 100 g Chocolate	25% (250 g/kg)
C3	60 g C2 + 150 g Chocolate	10% (100 g/kg)
C4	100 g C3 + 100 g Chocolate	5% (50 g/kg)
C5	75 g C4 + 75 g Chocolate	2,5% (25 g/kg)
C6	60 g C5 + 150 g Chocolate	1% (10 g/kg)
C7	75 g C6 + 75 g Chocolate	0,5% (5 g/kg)
C8	40 g C7 + 200 g Chocolate	0,1% (1 g/kg)
C9	75 g C8 + 75 g Chocolate	0,05% (500 mg/kg)
C10	40 g C9 + 200 g Chocolate	0,01% (100 mg/kg)
C11	75 g C10 + 75 g Chocolate	0,005% (50 mg/kg)
C12	30 g C11 + 150 g Chocolate	0,001% (10 mg/Kg)
C13	75 g C12 + 75 g Chocolate	0,0005% (5 mg/kg)
C14	20 g C13 + 100 g Chocolate	0,0001% (1 mg/kg)

3.3. Extracção de ADN

A extracção do ADN dos padrões de avelã em massa pevide foi efectuada pelo método Wizard, como descrito por Mafra et al. (2008a), com algumas modificações. Já os padrões de avelã em chocolate foram extraídos por 4 métodos diferentes:

- CTAB (como descrito por Mafra et al. (2008a), com adição de PVP);
- NucleoSpin[®] Food *kit* (de acordo com as instruções do fabricante);
- Wizard[®] Magnetic DNA (de acordo com as instruções do fabricante);
- Wizard (como descrito por Mafra et al. (2008a), com e sem adição de PVP e ARNase).

Os métodos foram otimizados e comparados tendo em conta a qualidade e pureza dos extractos e o nível de amplificação por PCR. Geralmente, a utilização de

PVP (polivinilpirrolidona) poderá facilitar a eliminação mais eficaz dos compostos fenólicos, enquanto a ARNase tem em vista a remoção completa de moléculas de ARN.

Em todos os métodos de extracção foi incluído um branco, que continha todos os reagentes utilizados, à excepção da amostra, de forma a controlar possíveis contaminações.

3.3.1. Método CTAB-PVP

O método CTAB foi realizado segundo o descrito por Mafra et al. (2008a), com algumas alterações.

Desta forma, pesaram-se 200 mg de cada amostra para tubos estéreis de 2 mL. A cada tubo adicionaram-se 1000 µL de tampão de extracção CTAB (2% CTAB (m/v), 0,1 mol/L de Tris, 1,4 mol/L de NaCl, 1% de PVP-40 (m/v), 0,02 mol/L EDTA, pH 8.0) pré-aquecido a 65°C e 20 µL de β-mercaptoetanol. Após agitação vigorosa (vórtex), incubou-se cada tubo a 65°C durante 1 hora. Durante o período de incubação, os tubos foram submetidos a agitação periódica. Ao final da incubação, procedeu-se a uma centrifugação durante 15 minutos (18 500 x g, 4°C) e recolheram-se cerca de 700 µL de sobrenadante para um novo tubo de 1,5 mL. Seguiu-se uma nova centrifugação, nas mesmas condições da anterior, mas durante 5 minutos, da qual se recolheram aproximadamente 600 µL de sobrenadante para um novo tubo de 1,5 mL. A este sobrenadante adicionaram-se 500 µL de clorofórmio, agitou-se vigorosamente e centrifugou-se durante 10 minutos (12 000 x g, 4°C). A fase aquosa formada foi transferida para um novo tubo de 2 mL e adicionou-se, na proporção 2:1, a solução de precipitação CTAB (0,5% CTAB (m/v), 0,04 mol/L NaCl). A mistura foi incubada durante 1 hora à temperatura ambiente. Procedeu-se a uma nova centrifugação durante 10 minutos (12 000 x g, 4°C) e rejeitou-se o sobrenadante. O precipitado foi dissolvido em 350 µL de NaCl (1,2 mol/L), misturado com 350 µL de clorofórmio, agitado vigorosamente e centrifugado durante 10 minutos (12 000 x g, 4°C). A fase superior foi recuperada para um novo tubo de 1,5 mL, onde se adicionou 0,6 partes em volume de isopropanol a -20°C, misturando-se cuidadosamente por inversão. Procedeu-se a uma nova centrifugação durante 10 minutos (12 000 x g, 4°C) e descartou-se o sobrenadante. O precipitado (*pellet*) foi lavado em 500 µL de etanol (70% (v/v) a -20°C) e misturado cuidadosamente por inversão. Após centrifugação (10 minutos, 12 000 x g, 4°C), o etanol foi rejeitado cuidadosamente, com a ajuda de uma

micropipeta, e os tubos foram colocados numa estufa a 50°C, durante 30 minutos, até remoção completa do solvente.

Para finalizar, o precipitado foi dissolvido em 100 µL de TE (10 mmol/L Tris e 1 mmol/L EDTA) durante uma noite com agitação suave, a 10°C, de forma a promover uma hidratação óptima dos extractos de ADN. Os extractos foram armazenados a -20°C até amplificação por PCR.

3.3.2. Método NucleoSpin® Food kit

A execução deste método foi realizada segundo as recomendações do fabricante, com algumas modificações.

Para tubos estéreis de 2,0 mL pesaram-se 200 mg de amostra e adicionaram-se 700 µL da solução de lise CF, pré aquecida a 65°C e 10 µL de proteinase K (20 mg/mL). A mistura foi homogeneizada vigorosamente por vórtex e incubada a 65°C durante 1 hora, com agitação periódica. Após incubação, adicionaram-se 4 µL de ARNase A (10 mg/mL) a cada tubo e incubaram-se a 37°C durante 10 minutos. Decorrido o tempo de incubação, procedeu-se de imediato a uma centrifugação durante 10 minutos (18 000 x g, 4°C). O sobrenadante foi transferido (aproximadamente 600 µL) para um novo tubo de 1,5 mL e recorreu-se a uma nova centrifugação durante 5 minutos (18 000 x g, 4°C). O sobrenadante foi transferido (aproximadamente 500 µL) para um novo tubo de 2,0 mL e adicionou-se o mesmo volume de solução de precipitação C4 e etanol 100%. Cuidadosamente, os tubos foram homogeneizados por inversão e a mistura foi sendo transferida para as colunas. De seguida procedeu-se à centrifugação das colunas (1 min, 13 000 x g) e o sobrenadante foi rejeitado. Este passo foi repetido até que todo o volume da mistura passasse pela coluna. Depois, as colunas foram lavadas duas vezes com 200 µL de solução CQW e uma vez com 700 µL de solução C5. Entre as lavagens, as colunas foram sujeitas a centrifugação durante 1 minuto a 13 000 x g. As colunas foram lavadas uma vez mais com 200 µL de solução C5 e centrifugadas durante 2 minutos a 13 000 x g. O sobrenadante de cada centrifugação foi rejeitado.

Por fim, o ADN foi eluído das colunas adicionando 100 µL de solução CE, pré aquecida a 70°C. De seguida procedeu-se à incubação à temperatura ambiente durante 5 minutos e centrifugação durante 1 minuto a 13 000 x g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL. Os extractos finais de ADN foram armazenados a -20°C até posterior análise.

3.3.3. Método Wizard[®] Magnetic DNA

A execução deste método foi feita segundo as recomendações do fabricante, com algumas modificações.

Para tubos estéreis de 2,0 mL, pesaram-se 200 mg de amostra e adicionaram-se 500 µL de solução de lise A (*Lysis Buffer A*) e 5 µL de uma solução de ARNase A (4 mg/mL). Após agitação vigorosa, adicionaram-se 250 µL de solução de lise B (*Lysis Buffer B*) e incubou-se à temperatura ambiente, durante 10 minutos, com agitação periódica. De seguida, adicionaram-se 750 µL de solução de precipitação (*Precipitation Solution*) e agitou-se vigorosamente. Após centrifugação de 10 minutos (18 000 x g, 4°C) transferiu-se, aproximadamente, 1 mL de sobrenadante para um novo tubo de 1,5 mL e procedeu-se a uma nova centrifugação durante 5 minutos. Seguidamente transferiu-se o máximo de sobrenadante possível para um novo tubo de 2,0 mL, adicionaram-se 40 µL de uma solução com partículas magnéticas (*Magnesi[®] Paramagnetic Particles*) e misturou-se por inversão. Após adicionar 0,8 partes de isopropanol, a mistura foi incubada à temperatura ambiente durante 5 minutos, com inversão periódica dos tubos. Após este passo, os tubos foram colocados individualmente no suporte *PolyATtract[®] System 1000 Magnetic Separation* durante aproximadamente 1 minuto, até que as partículas magnéticas fossem atraídas pelo suporte magnético e a solução ficasse límpida. Cuidadosamente, rejeitou-se a fase líquida, retirou-se o tubo do suporte e efectuou-se uma lavagem com 500 µL de solução de lise B. Os tubos foram colocados novamente no suporte e rejeitou-se a fase líquida. De seguida efectuou-se uma nova lavagem com 250 µL de solução de lise B e procedeu-se de igual modo. Efectuaram-se três lavagens com 1 mL de etanol 70% (v/v), procedendo da mesma forma que nas lavagens anteriores. Depois de removido o etanol, os tubos foram incubados a 50°C durante 30 minutos, para remover todo o etanol das partículas magnéticas.

Depois de as partículas estarem completamente secas adicionaram-se 100 µL de TE (10 mmol/L Tris e 1 mmol/L EDTA), pré aquecido a 65°C, e incubou-se a 65°C durante 5 minutos. Decorrido este tempo, os tubos foram colocados novamente no suporte e transferiu-se a fase líquida para um novo tubo de 1,5 mL. De forma a remover possíveis partículas em suspensão, procedeu-se a uma centrifugação durante 1 minuto a 13 000 x g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL. Os extractos foram armazenados a -20°C até posterior análise.

3.3.4. Método Wizard

O método Wizard foi realizado de acordo com o descrito por Mafra et al. (2008a), com algumas alterações.

Para tubos estéreis de 2,0 mL pesaram-se 200 mg de amostra e adicionaram-se 860 µL de tampão de extracção TNE (10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA, 1% SDS), 100 µL de solução de hidrocloreto de guanidina 5 M e 40 µL de solução de proteinase K (20 mg/mL). A mistura foi incubada a 60°C, durante 3 horas, com agitação periódica. Após esta etapa, procedeu-se a uma centrifugação durante 15 minutos (18 500 x g, 4°C) e recolheram-se, aproximadamente, 700 µL de sobrenadante para um novo tubo de 1,5 mL. Após nova centrifugação durante 5 minutos (18 500 x g, 4°C), transferiram-se cerca de 600 µL de sobrenadante para um novo tubo de 2,0 mL e adicionou-se 1,0 mL de resina do *kit Wizard® Plus Minipreps DNA*, misturando-se cuidadosamente por inversão. A mistura foi transferida para as colunas do *kit* referido e eluída com o auxílio do êmbolo de uma seringa de 2,0 mL. De seguida, procedeu-se a três lavagens das colunas, cada uma delas com 2,0 mL de uma solução de isopropanol (80% (v/v)). De forma a eliminar o excesso de isopropanol retido nas colunas, procedeu-se a uma centrifugação durante 2 minutos (10 000 x g) e secagem durante 5 minutos à temperatura ambiente. Após secagem, as colunas foram transferidas para um novo tubo de 1,5 mL e adicionaram-se 100 µL de TE (10 mmol/L Tris e 1 mmol/L EDTA), previamente aquecido a 70°C. Antes de efectuar uma centrifugação durante 1 minuto (10 000 x g), as colunas foram incubadas à temperatura ambiente, durante 1 minuto. O sobrenadante recolhido foi depois transferido para um novo tubo de 1,5 mL. Os extractos foram armazenados a -20°C até posterior análise.

3.3.5. Método Wizard ARNase

O método Wizard ARNase foi desenvolvido de acordo com o descrito no método Wizard, com uma ligeira modificação. Após a segunda centrifugação (18 500 x g, 4°C, 5 minutos), adicionaram-se 4 µL de uma solução de ARNase A (10 mg/mL) ao sobrenadante, agitou-se suavemente e incubou-se a 37°C, durante 10 minutos. O restante protocolo foi executado de forma idêntica ao descrito no método Wizard.

3.3.6. Método Wizard-PVP

O método Wizard-PVP foi realizado de acordo com o descrito no método Wizard, com as seguintes modificações. Para tubos estéreis de 2,0 mL pesaram-se 200 mg de

amostra e adicionaram-se 860 μL de tampão de extracção TNE, que continha 1% de PVP-40 (m/v), 100 μL de solução de hidrocloreto de guanidina 5 M, 40 μL de solução de proteinase K (20 mg/mL) e 20 μL de β -mercaptoetanol. O restante protocolo foi executado de forma idêntica ao descrito no método Wizard

3.3.7. Método Wizard-PVP ARNase

O método Wizard-PVP ARNase foi realizado de acordo com o descrito no método Wizard, com as seguintes modificações. O tampão de extracção TNE continha 1% de PVP-40 (m/v), ao qual se adicionaram 20 μL de β -mercaptoetanol, tal como no método anterior. Após a segunda centrifugação (18 500 x g, 4°C, 5 minutos), adicionaram-se 4 μL de uma solução de ARNase A (10 mg/mL) ao sobrenadante, agitou-se suavemente e incubou-se a 37°C durante 10 minutos. O restante protocolo foi executado de forma idêntica ao descrito no método Wizard.

3.4. Análise do ADN extraído

A concentração e pureza do ADN extraído foram avaliadas por espectrofotometria UV, recorrendo a um espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). Efectuaram-se leituras de absorvância a 260 nm ($A_{260\text{nm}}$), 280 nm ($A_{280\text{nm}}$) e 320 nm ($A_{320\text{nm}}$). A concentração foi determinada, tendo em conta a diluição dos extractos (1/10), pela equação:

$$C = A_{260\text{nm}}/0,020 \times \text{Factor de diluição}$$

A pureza foi determinada pelas razões $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ (avaliação da contaminação por proteínas). Os valores obtidos a 320 nm funcionaram como controlo da presença material estranho ou interferentes na solução ou nas cuvetes utilizadas.

3.5. Amplificação do ADN por PCR

3.5.1. Oligonucleótidos

Os oligonucleótidos iniciadores (*primers* e sonda) utilizados nas reacções da PCR convencional e PCR em tempo real encontram-se listados na tabela 7. A síntese dos mesmos foi feita pela empresa Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Alemanha).

Tabela 7: Oligonucleótidos usados em PCR convencional e PCR em tempo real

Primers Sonda	Sequência (5'→3')	Gene	Amplificação (pb)	Referência
Nocc2 F	GGC AAG TTC GTG AGC AGG TTC	<i>hsp1</i>	100	Piknová et al. (2008)
Nocc1 Rbis	CTT TCG GAA TAG TCA CAG TGA G			
Nocc1 P	FAM-CCT GAC GAT GCG ATG CTC GAC CAG-BHQ2			

(FAM – Fluoresceína; BHQ2 – *Black hole quencher 2*)

3.5.2. PCR convencional

Para amplificação por PCR convencional, utilizaram-se os seguintes reagentes: água ultra pura (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), tampão e cloreto de magnésio comercializados em conjunto com a *SuperHot Taq Polymerase* (Genaxxon Bioscience GmbH, Alemanha), dNTP (Invitrogene, Carlsbad, USA), *primers* específicos para a avelã (tabela 7) e extracto de ADN. Em todas as reacções de PCR utilizou-se um volume total de 25 µL (por tubo de reacção) e foi incluído um controlo negativo, em que se substituiu o volume de extracto de ADN por água ultra pura. As quantidades de cada componente (tabela 8) e as condições (temperatura/tempo) (tabela 9) da reacção foram optimizadas, de forma a se atingir um maior nível de sensibilidade do método, sem comprometer a especificidade. Todas as reacções foram realizadas no termociclador MJ Mini Thermocycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

Tabela 8: Componentes da mistura para PCR convencional

Componente	Volume (µL)
Água ultra pura	14,25
Tampão (10x)	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	3,25
dNTPs (2,5 mM cada)	2,0
Nocc1 F (10 µM)	0,4
Nocc2 Rbis (10 µM)	0,4
<i>SuperHot Taq</i> (5 U/µL)	0,2
Extracto ADN	2,0

Os fragmentos amplificados pela PCR foram analisados por electroforese em gel de 1,5% de agarose em tampão SGTB 1x (GRiSP Research Solutions, Porto, Portugal) e com adição de Gel Red 1x (Biotium, Hayward, USA) como corante para visualização do ADN com luz UV. Num dos poços do gel foi aplicada uma mistura que

continha 4 μL de corante de carregamento (corante à base de azul de bromofenol) e 2,2 μL de marcador DNA Ladder 100pb (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha). Nos restantes poços foi aplicado 20 μL de cada produto da PCR e 4 μL de corante de carregamento. A electroforese foi realizada em tampão SGTB 1x durante aproximadamente 20 minutos a 200V.

Após realizada a electroforese, o gel foi visualizado através de um transiluminador UV e a imagem foi captada através do sistema fotográfico Kodak Digital Science™ DC120 (Rochester, NY, USA). A análise da imagem foi feita através do *software* Kodak Digital Science™ 1D.

Tabela 9: Condições utilizadas na PCR convencional

Etapas	Condições		
	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	5 min	1
Amplificação	95°C	30 s	45
	63°C	30 s	
	72°C	30 s	
Extensão final	72°C	5 min	1

3.5.3. PCR em tempo real

O recurso à técnica de PCR em tempo real serviu para confirmar a análise qualitativa feita por PCR convencional e para efectuar uma análise semi-quantitativa de avelã em chocolates comerciais.

Para a amplificação por PCR em tempo real utilizaram-se os seguintes reagentes: água ultra pura, SsoFast™ Probes Supermix (Bio-Rad Laboratories, CA, USA), *primers* e sonda TaqMan™ específicos para a avelã (tabela 7) e extracto de ADN, nas quantidades descritas na tabela 10.

Tabela 10: Componentes da mistura de PCR em tempo real

Componente	Volume (μL)
Água ultra pura	6,5
SsoFast™ Mix (1x)	10,0
Nocc1 F (10 μM)	0,6
Nocc2 Rbis (10 μM)	0,6
Nocc1 P (5 μM)	0,3
Extracto ADN	2,0

Em todas as reacções foi utilizado um volume total de 20 μ L e um controlo negativo, no qual se substituíu o volume de extracto de ADN por água ultra pura.

Os ensaios foram realizados no termociclador CFX96 Real-Time PCR System (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) sob as condições descritas na tabela 11. Os dados foram recolhidos e processados no final de cada ensaio pelo *software* Bio-Rad CFX Manager 2.0 (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). A amplificação dos padrões e das amostras (chocolates comerciais) foi feita, pelo menos, em triplicado. Todas as amostras comerciais foram analisadas em conjunto com uma curva padrão.

Tabela 11: Condições utilizadas na PCR em tempo real

Etapas	Condições		
	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	3 min	1
Amplificação	95°C	15 s	50
	65°C	45 s	

4. Resultados e discussão

4.1. Optimização da detecção de avelã por PCR

De forma a otimizar a técnica da PCR, foram preparadas misturas padrão de avelã em massa pevide. Essas misturas foram extraídas pelo método Wizard, cujos valores da concentração e pureza dos extractos se encontram mencionados na tabela 12. A avelã utilizada na preparação das misturas foi extraída pelo mesmo método, tendo-se obtido uma concentração de 119,3 ng/μL e pureza de 1,7.

Tabela 12: Concentração e pureza dos extractos de avelã em massa pevide obtidos pelo método Wizard

Padrão (% avelã)	Concentração (ng/μL)	Pureza A_{260}/A_{280}
M0 (0%)	746,7	1,8
M1 (50%)	279,0	1,6
M2 (10%)	568,3	1,7
M3 (5%)	495,0	1,8
M4 (1%)	535,7	1,8
M5 (0,5%)	597,3	1,8
M6 (0,1%)	671,3	1,8
M7 (0,05%)	599,3	1,8
M8 (0,01%)	667,0	1,8
M9 (0,005%)	622,7	1,8
M10 (0,001%)	604,0	1,7
M11 (0,0005%)	634,3	1,8
M12 (0,0001%)	582,3	1,8

Como se pode constatar, os valores obtidos de concentração de ADN foram elevados, variando entre 279,0 ng/μL e 746,7 ng/μL. Os valores obtidos para a avaliação da pureza dos extractos foram em média de 1,8 considerando-se, assim que os extractos possuem elevada pureza para posterior aplicação em PCR.

Desta forma, o método Wizard mostrou-se eficaz na extracção de avelã em massa pevide, uma vez que proporcionou uma boa recuperação de ADN com elevada pureza.

Após vários ensaios, nos quais se alterava a concentração de magnésio, a temperatura de hibridização e a concentração dos extractos, foi possível otimizar a técnica da PCR usando o par de *primers* Nocc2 F/Nocc1 Rbis (tabela 7), que originam

fragmentos de 100 pb. A figura 6 corresponde ao gel de agarose dos fragmentos de PCR resultantes da técnica otimizada recorrendo aos padrões de avelã em massa pevide. As quantidades dos componentes da reacção e o respectivo programa de temperaturas/tempo otimizados encontram-se mencionados nas tabelas 8 e 9, respectivamente.

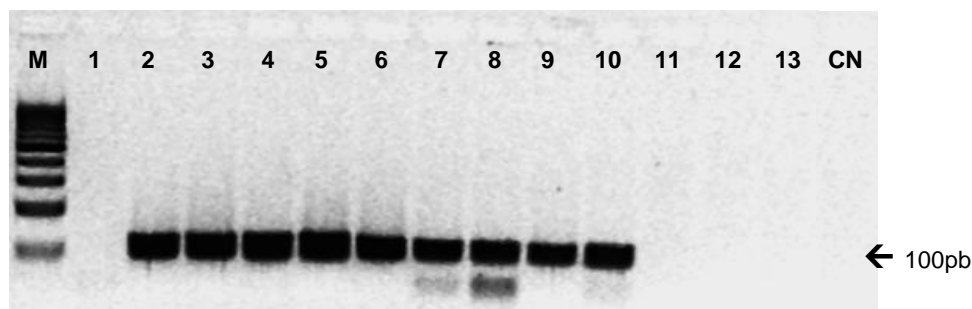


Figura 6: Electroforese em gel de agarose dos padrões de avelã em massa pevide amplificados por PCR usando os *primers* Nocc2 F/Nocc1 Rbis, específicos para a avelã ([extractos]=25ng/ μ L). M – marcador molecular; 1 – Massa pevide com 0% de avelã; 2 a 13 – 50%, 10%, 5%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, 0,005%, 0,001%, 0,0005%, 0,0001% de avelã em massa pevide; CN – controlo negativo.

Pela análise da figura 6 constata-se que o limite de detecção alcançado foi de 0,005% (50 ppm) de avelã. Assim, foi possível alcançar um limite de detecção mais baixo do que o alcançado por Píknová et al. (2008), 0,01% (100 ppm) de avelã. De realçar que os *primers* usados neste estudo foram os propostos pelos referidos autores, mas a matriz usada para preparar as misturas de referência consistiu em noz em vez de massa pevide. O facto de a massa pevide, à partida, conter menos compostos que interfiram com a extracção de ADN, pode ser a explicação para a diferença de valores nos limites de detecção. Um outro factor relevante a referir trata-se do método de extracção, que no caso de Píknová et al. (2008) foi o DNeasy Plant Mini kit (Qiagen).

A técnica otimizada foi então utilizada para comparar os diferentes métodos de extracção de ADN de avelã em chocolate.

4.2. Comparação dos métodos de extracção de avelã em chocolate

Neste estudo foram utilizados diferentes métodos de extracção para a obtenção de ADN de avelã em chocolate: método baseado no CTAB com adição de PVP, NucleoSpin® Food kit, Wizard® Magnetic DNA, Wizard com e sem PVP e ARNase. O recurso aos diferentes métodos de extracção teve como objectivo a obtenção de um método eficaz para a extracção de quantidades vestigiais de ADN de avelã, maximizando a sensibilidade numa matriz complexa como o chocolate.

Numa primeira fase, testou-se o método CTAB de acordo com o descrito na secção 3.3.1, mas sem adição de PVP. No entanto, o rendimento e pureza dos extractos revelaram-se demasiado baixos, não sendo por este motivo incluído na comparação de métodos.

Para a comparação dos diferentes métodos de extracção foram apenas utilizadas as misturas de referência de avelã em chocolate com 10%, 1%, 0,1%, 0,05% e 0,01% de avelã.

4.2.1. Método CTAB-PVP

Os resultados da avaliação da concentração e pureza dos extractos de ADN, por espectrofotometria UV, dos padrões de avelã em chocolate obtidos pelo método CTAB-PVP apresentam-se na tabela 13. Pode-se verificar que o rendimento da extracção foi relativamente baixo, uma vez que se obteve no máximo 46,0 ng/μL de ADN. Quanto à pureza dos extractos pode considerar-se que, de uma forma geral, o método CTAB-PVP permitiu a obtenção de extractos com pureza razoável a elevada.

Tabela 13: Concentração e pureza dos extractos de ADN a partir dos padrões extraídos pelo método CTAB-PVP

Padrão (% avelã)	Concentração (ng/μL)	Pureza A_{260}/A_{280}
C3 (10%)	36,2	1,7
C6 (1%)	24,5	1,4
C8 (0,1%)	43,0	1,5
C9 (0,05%)	46,0	1,4
C10 (0,01%)	42,2	1,6

Os resultados da amplificação dos extractos dos padrões de avelã em chocolate pelo método CTAB-PVP apresentam-se na figura 7. Como se pode verificar, o limite de detecção atingido foi 0,05%, não sendo considerado satisfatório, uma vez que o objectivo seria atingir o menor valor testado para a avelã em chocolate (0,01%). Deve-se realçar que a concentração de ADN a amplificar foi otimizada para 20 ng/μL, sendo um compromisso entre quantidade de ADN versus presença de inibidores da PCR.

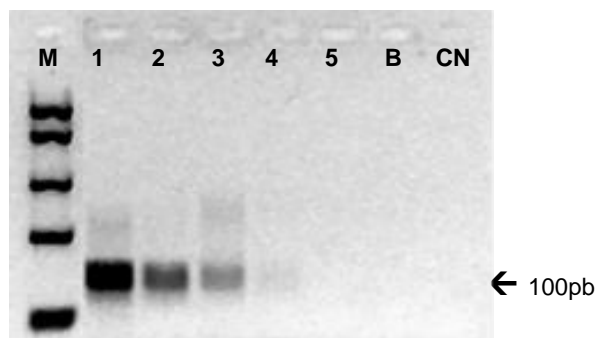


Figura 7: Electroforese em gel de agarose dos padrões de avelã em chocolate amplificados por PCR usando os *primers* Nocc2 F e Nocc1 Rbis, específicos para a avelã ([extractos]=20ng/ μ L). M – marcador molecular; 1 a 5 – 10%, 1%, 0,1%, 0,05%, 0,01% de avelã em chocolate, extraída pelo método CTAB-PVP; B – branco de extração; CN – controlo negativo.

De modo a confirmar os resultados obtidos pela PCR convencional, recorreu-se à técnica da PCR em tempo real usando uma sonda TaqManTM, de acordo com as condições descritas na secção 3.5.3. Cada padrão foi amplificado em triplicado, o que permitiu a obtenção de curvas de fluorescência em triplicado. Os respectivos valores de Ct permitiram a obtenção de uma relação linear dos valores de Ct, em função do logaritmo da quantidade de avelã (figura 8). Pela análise da curva de calibração verifica-se que a eficiência da reacção (80,7%) e o coeficiente de correlação ($R^2=0,984$) foram adequados. No entanto, o limite de detecção (0,05%) não foi satisfatório, tal como obtido por PCR convencional. Relativamente aos valores de Ct do primeiro e último padrão, verificou-se que foram respectivamente de 28 e 37 ciclos, indicando uma tendência tardia para a amplificação do último padrão (>35ciclos).

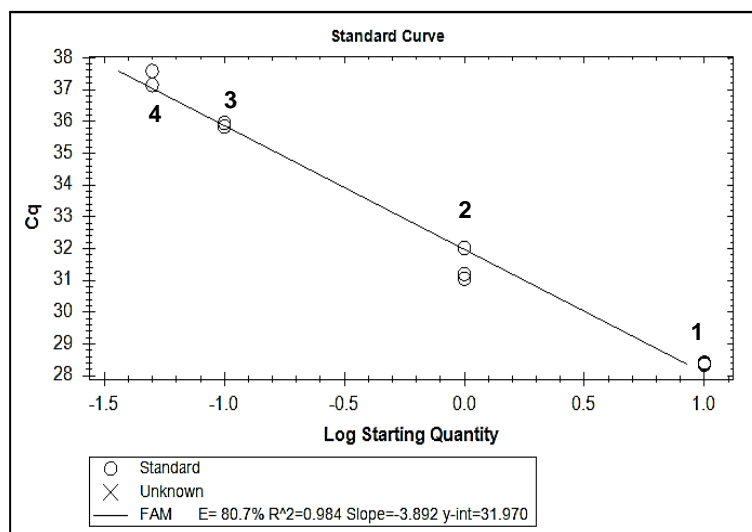


Figura 8: Curva de calibração dos padrões de avelã em chocolate amplificados por PCR em tempo real usando os *primers* Nocc2 F/ Nocc1 Rbis e a sonda TaqManTM Nocc1 P (concentração dos extractos: 20ng/ μ L). 1 a 4 – 10%, 1%, 0,1%, 0,05% de avelã em chocolate, extraída pelo método CTAB-PVP.

4.2.2. Método NucleoSpin® Food kit

Os resultados da avaliação da concentração e pureza dos extractos de ADN, por espectrofotometria UV, dos padrões de avelã em chocolate obtidos pelo NucleoSpin® Food kit apresentam-se na tabela 14. O método NucleoSpin® permitiu uma razoável recuperação de ADN, com uma concentração mínima de ADN de 81,7 ng/μL e concentração máxima de 117,7 ng/μL. Relativamente à pureza dos extractos, este método permitiu a obtenção de ADN com pureza aceitável, com um mínimo de 1,2 e um máximo de 1,5, embora realçando a presença de inibidores.

Tabela 14: Concentração e pureza dos extractos de ADN a partir dos padrões extraídos pelo método NucleoSpin® Food kit

Padrão (% avelã)	Concentração (ng/μL)	Pureza A_{260}/A_{280}
C3 (10%)	81,7	1,3
C6 (1%)	107,8	1,4
C8 (0,1%)	84,0	1,2
C9 (0,05%)	117,7	1,5
C10 (0,01%)	96,7	1,3

Recorrendo à técnica da PCR convencional foi possível avaliar a capacidade de amplificação dos extractos (figura 9), cuja concentração adequada foi otimizada para 10 ng/μL. Os resultados da amplificação por PCR qualitativa mostraram que foi possível amplificar fragmentos de ADN de avelã em chocolate até ao valor mínimo testado (0,01%), com um gradiente de amplificação bem notório. Desta forma, pode afirmar-se que o método NucleoSpin® permitiu a extracção apropriada de avelã para o nível de amplificação por PCR desejado.

Os extractos foram também amplificados por PCR em tempo real de forma a validar os resultados obtidos por PCR convencional. Observando a figura 10, verifica-se que foi possível atingir o limite de detecção de 0,01%, com elevada eficiência de amplificação (93,3%) e boa correlação linear ($R^2=0,968$). Os resultados obtidos por PCR em tempo real foram concordantes com os obtidos na PCR convencional.

A amplificação do primeiro padrão ocorreu aos 26 ciclos e a do último padrão ocorreu ao ciclo 36, o que indica melhorias notórias em relação aos mesmos níveis de amplificação comparando com o método CTAB-PVP. De referir ainda, que no método anterior o padrão de 0,05% amplificou à volta dos 37 ciclos, enquanto neste método o padrão mais baixo (0,01%) amplificou cerca de 1 ciclo mais cedo.

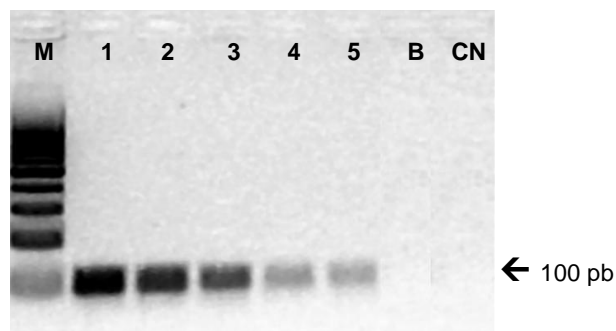


Figura 9: Electroforese em gel de agarose dos padrões de avelã em chocolate amplificados por PCR usando os *primers* Nocc2 F/Nocc1 Rbis, específicos para a avelã ([extractos]=10 ng/ μ L). M – marcador molecular; 1 a 5 – 10%, 1%, 0,1%, 0,05%, 0,01% de avelã em chocolate, extraída pelo método NucleoSpin[®]; B – branco de extracção; CN – controlo negativo.

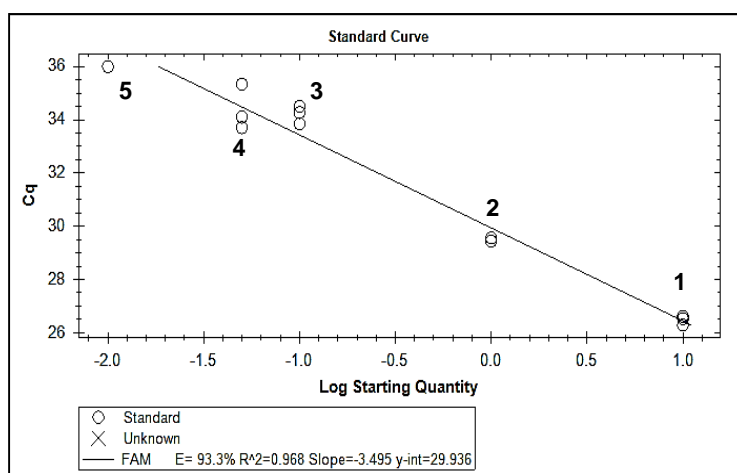


Figura 10: Curva de calibração dos padrões de avelã em chocolate amplificados por PCR em tempo real usando os *primers* Nocc2 F/Nocc1 Rbis e a sonda TaqMan[™] Nocc1 P ([extractos]=10 ng/ μ L). 1 a 5 – 10%, 1%, 0,1%, 0,05%, 0,01% de avelã em chocolate, extraída pelo método NucleoSpin[®].

4.2.3. Método Wizard[®] Magnetic DNA

Na tabela 15 encontram-se mencionados os valores de concentração e pureza de cada padrão extraído pelo método Wizard[®] Magnetic DNA. A utilização deste método para a extracção de avelã proporcionou, em geral, a obtenção de ADN com concentração e purezas razoáveis, evidenciando também a presença de potenciais inibidores.

Os resultados da amplificação dos extractos por PCR convencional não se revelaram eficazes, uma vez que apenas foi conseguido o limite de detecção de 0,1% de avelã (figura 11). Desta forma, o método em questão não se mostrou adequado na remoção de inibidores da PCR.

Tabela 15: Concentração e pureza dos extractos de ADN a partir dos padrões extraídos pelo método Wizard[®] Magnetic DNA

Padrão (% avelã)	Concentração (ng/μL)	Pureza A ₂₆₀ /A ₂₈₀
C3 (10%)	58,8	1,2
C6 (1%)	86,5	1,5
C8 (0,1%)	67,3	1,6
C9 (0,05%)	94,8	1,1
C10 (0,01%)	77,7	1,5

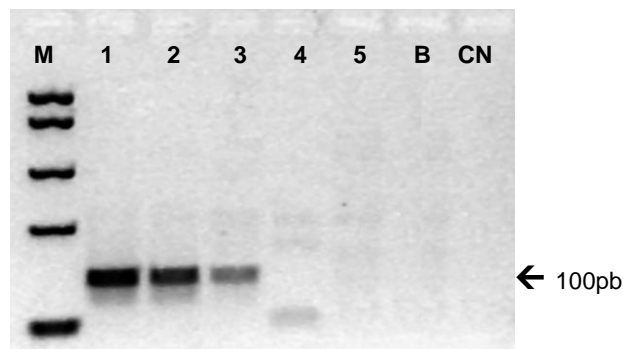


Figura 11: Electroforese em gel de agarose dos padrões de avelã em chocolate amplificados por PCR usando os *primers* Nocc2 F/Nocc1 Rbis, específicos para a avelã (extractos]=10 ng/μL). M – marcador molecular; 1 a 5 – 10%, 1%, 0,1%, 0,05%, 0,01% de avelã em chocolate, extraída pelo método Wizard[®] Magnetic; B – branco de extração; CN – controlo negativo.

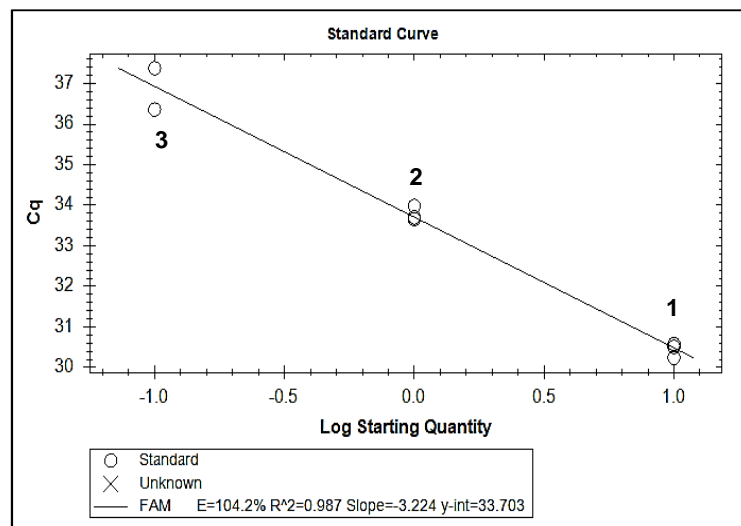


Figura 12: Curva de calibração dos padrões de avelã em chocolate amplificados por PCR em tempo real usando os *primers* Nocc2 F/Nocc1 Rbis e a sonda TaqMan[™] Nocc1 P (extractos]=10 ng/μL). 1 a 3 – 10%, 1%, 0,1% de avelã em chocolate, extraída pelo método Wizard[®] Magnetic.

Recorrendo à técnica da PCR em tempo real (figura 12), o mesmo resultado foi observado (limite de detecção de 0,1%), o que reforça a ideia de que o método Wizard[®] Magnetic não é o mais adequado para a remoção de inibidores provenientes

de matrizes de chocolate. Apesar de a detecção não ter ido além de 0,1% de avelã, a reacção ocorreu com elevada eficiência (104,2%) e boa correlação linear ($R^2=0,987$), como se pode evidenciar na figura 12. Ainda pela análise da mesma figura é possível constatar que o primeiro padrão amplificou um pouco tarde, aproximadamente, aos 30 ciclos e o último aos 37.

4.2.4. Método Wizard

Tendo em conta a simplicidade do método Wizard, os bons resultados anteriores na aplicação da técnica a matrizes alimentares complexas e o baixo custo (Mafrá et al. 2008a), optou-se por testar este protocolo para a extracção da avelã em chocolate, introduzindo-se algumas alterações de modo a aumentar a sensibilidade de amplificação por PCR.

A extracção efectuada pelo método Wizard não se revelou muito eficaz, no que diz respeito ao rendimento de ADN extraído (em média 47,8 ng de ADN/ μ L). No entanto os extractos revelaram, em geral, um elevado grau de pureza, como se pode evidenciar pelos valores mencionados na tabela 16.

Tabela 16: Concentração e pureza dos extractos de ADN a partir dos padrões extraídos pelo método Wizard.

Padrão (% avelã)	Concentração (ng/ μ L)	Pureza A_{260}/A_{280}
C3 (10%)	40,2	1,3
C6 (1%)	26,5	1,4
C8 (0,1%)	55,8	2,0
C9 (0,05%)	63,2	1,7
C10 (0,01%)	53,5	1,8

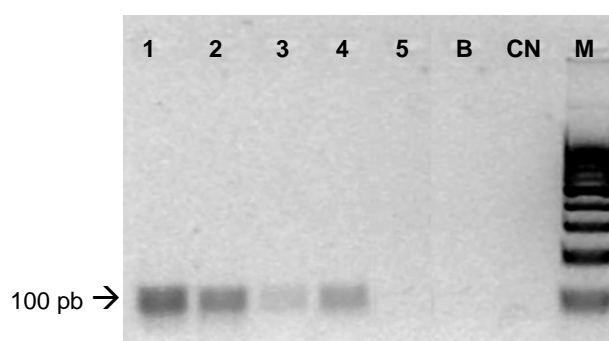


Figura 13: Electroforese em gel de agarose dos padrões de avelã em chocolate amplificados por PCR usando os *primers* Nocc2 F/Nocc1 Rbis, específicos para a avelã ([extractos]=10 ng/ μ L). M – marcador molecular; 1 a 5 – 10%, 1%, 0,1%, 0,05%, 0,01% de avelã em chocolate, extraída pelo método Wizard; B – branco de extracção; CN – controlo negativo.

Relativamente à amplificação dos padrões por PCR convencional, foi possível amplificar fragmentos de 100 pb até 0,05%, mas não foi possível estabelecer um gradiente de concentração claro, nem bandas de intensidade elevada para os extractos mais concentrados (figura 13).

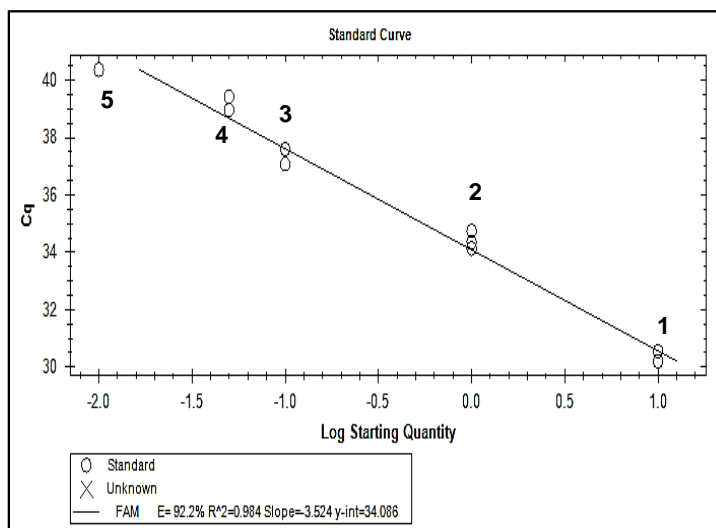


Figura 14: Curva de calibração dos padrões de avelã em chocolate amplificados por PCR em tempo real usando os *primers* Nocc2 F/Nocc1 Rbis e a sonda TaqMan™ Nocc1 P ([extractos]=10 ng/μL). 1 a 5 – 10%, 1%, 0,1%, 0,05%, 0,01% de avelã em chocolate, extraída pelo método Wizard.

A técnica PCR em tempo real permitiu a amplificação de todos os padrões testados (10-0,01%) com elevada eficiência (92,2%) e correlação ($R^2=0,984$), como se pode evidenciar pela figura 14. Perante estes resultados pode considerar-se que o método Wizard permite extrair ADN de avelã com pureza adequada para aplicação em PCR em tempo real. A amplificação do primeiro padrão ocorreu aos 29 ciclos e a amplificação do último (0,01%) ocorreu bastante tardia, por volta dos 39 ciclos.

4.2.5. Método Wizard ARNase

A utilização do método Wizard modificado pela adição de ARNase na extração dos padrões de avelã em chocolate, permitiu obter os rendimentos e purezas mencionados na tabela 17. Atendendo aos resultados obtidos, verifica-se que, em comparação com o método Wizard sem adição de ARNase, o grau de pureza aumentou consideravelmente (em média 1,96), enquanto o rendimento se manteve relativamente baixo (em média 50,2 ng de ADN/μL).

Tabela 17: Concentração e pureza dos extractos de ADN a partir dos padrões extraídos pelo método Wizard ARNase

Padrão (% avelã)	Concentração (ng/ μ L)	Pureza A_{260}/A_{280}
C3 (10%)	52,8	1,8
C6 (1%)	49,7	2,0
C8 (0,1%)	46,5	2,3
C9 (0,05%)	50,7	1,9
C10 (0,01%)	51,3	1,8

Os resultados da amplificação por PCR mostraram uma melhoria substancial relativamente ao resultado obtido pelo método anterior (figura 13), tanto em relação ao gradiente de bandas em função da concentração como a nível de sensibilidade, a qual foi a máxima dos valores testados (figura 15). Perante os resultados obtidos, pode afirmar-se que a adição de ARNase permitiu a extração de ADN de avelã com elevada pureza, adequada para aplicação em PCR a partir de matrizes de chocolate.

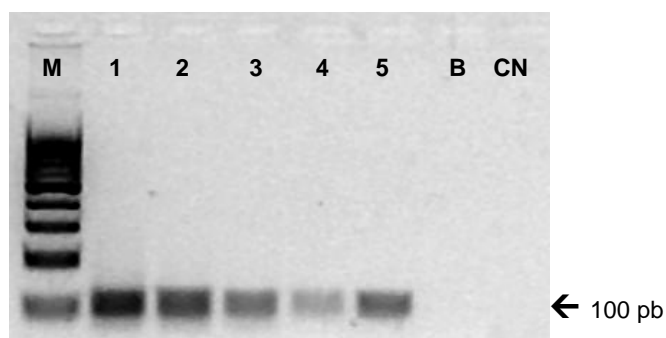


Figura 15: Electroforese em gel de agarose dos padrões de avelã em chocolate amplificados por PCR usando os *primers* Nocc2 F/Nocc1 Rbis, específicos para a avelã ([extractos]=10 ng/ μ L). M – marcador molecular; 1 a 5 – 10%, 1%, 0,1%, 0,05%, 0,01% de avelã em chocolate, extraída pelo método Wizard ARNase; B – branco de extração; CN – controlo negativo.

Relativamente à amplificação dos padrões por PCR em tempo real, verificou-se que não foi possível atingir o mesmo limite de detecção obtido por PCR convencional. Como se pode evidenciar pela figura 16, foi possível detectar avelã até um limite de 0,05%, com elevada eficiência da reacção (110,2%) e boa correlação ($R^2=0,992$). A região de amplificação piorou relativamente ao protocolo anterior, uma vez que o primeiro padrão amplificou cerca de 1 ciclo mais tarde, ao ciclo 30, enquanto o último padrão (0,05%) atingiu os 38 ciclos.

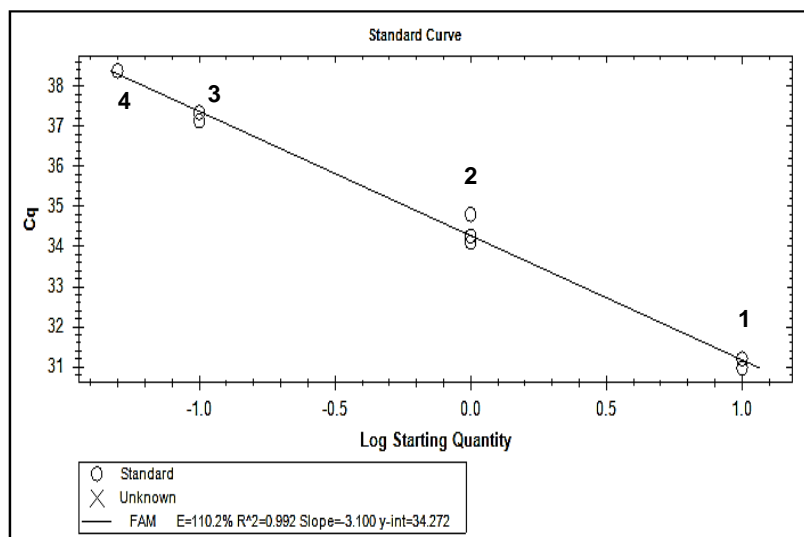


Figura 16: Curva de calibração dos padrões de avelã em chocolate amplificados por PCR em tempo real usando os *primers* Nocc2 F/Nocc1 Rbis e a sonda TaqMan™ Nocc1 P ([extractos]=10 ng/μL). 1 a 4 – 10%, 1%, 0,1%, 0,05% de avelã em chocolate, extraída pelo método Wizard ARNase.

4.2.6. Método Wizard-PVP

A adição de PVP no método Wizard proporcionou um aumento da extracção ADN relativamente ao mesmo método sem PVP, para valores em média de 98,1 ng/μL, mas a pureza associada não foi elevada, pois em média foi de 1,3 (tabela 18).

Tabela 18: Concentração e pureza dos extractos de ADN a partir dos padrões extraídos pelo método Wizard-PVP.

Padrão (% avelã)	Concentração (ng/μL)	Pureza A_{260}/A_{280}
C3 (10%)	105,8	1,5
C6 (1%)	95,5	1,4
C8 (0,1%)	98,2	1,2
C9 (0,05%)	98,8	1,4
C10 (0,01%)	92,0	1,1

A amplificação dos extractos por PCR convencional não permitiu a obtenção de um gradiente muito claro de bandas relativamente à concentração, mas tornou possível amplificar fragmentos até 0,05% de avelã em chocolate, como se pode visualizar na figura 17.

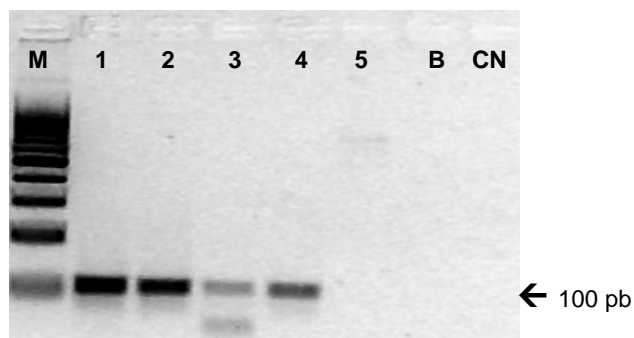


Figura 17: Electroforese em gel de agarose dos padrões de avelã em chocolate amplificados por PCR usando os *primers* Nocc2 F/Nocc1 Rbis, específicos para a avelã ([extractos]=10 ng/ μ L). M – marcador molecular; 1 a 5 – 10%, 1%, 0,1%, 0,05%, 0,01% de avelã em chocolate, extraída pelo método Wizard-PVP; B – branco de extração; CN – controlo negativo.

Relativamente à amplificação dos extractos pela técnica da PCR em tempo real (figura 18), verificou-se que foi possível obter o mesmo limite de detecção atingido por PCR convencional (0,05% de avelã em chocolate), não melhorando relativamente ao mesmo resultado com o protocolo Wizard ARNase.

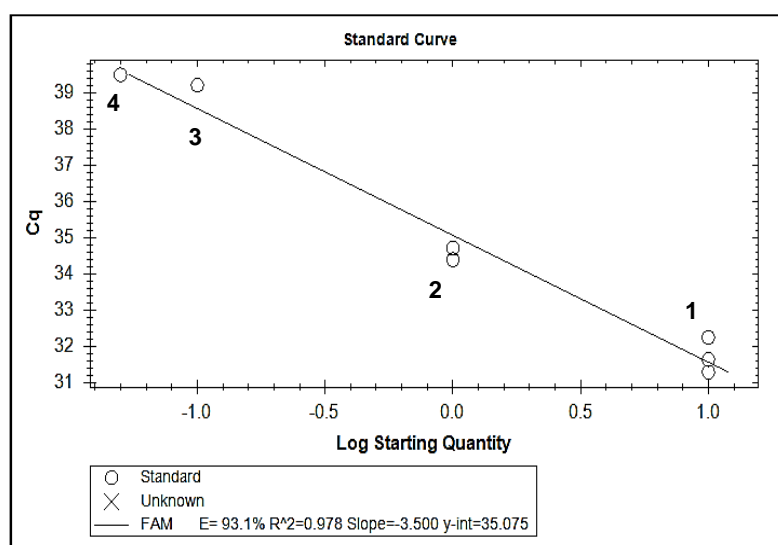


Figura 18: Curva de calibração dos padrões de avelã em chocolate amplificados por PCR em tempo real usando os *primers* Nocc2 F/Nocc1 Rbis e a sonda TaqMan™ Nocc1 P ([extractos]=10 ng/ μ L). 1 a 4 – 10%, 1%, 0,1%, 0,05% de avelã em chocolate, extraída pelo método Wizard-PVP.

No entanto, só foi possível a amplificação de uma das três réplicas dos padrões de 0,1% e 0,05% de avelã, o que evidencia alguma falta de reprodutibilidade ao nível de amplificação, provavelmente relacionada pela presença de eventuais inibidores da PCR. Apesar de os resultados produzidos não serem satisfatórios, a PCR em tempo real ocorreu com elevada eficiência (93,1%) e boa correlação linear ($R^2=0,978$). As

gamas de amplificação ocorreram bastante tardias, sendo o primeiro e o último padrão aos 32 e 40 ciclos, respectivamente.

4.2.7. Método Wizard-PVP ARNase

A concentração e pureza dos padrões extraídos por Wizard-PVP ARNase encontram-se evidenciadas na tabela 19. Verifica-se que, a adição de ARNase ao método Wizard-PVP, provocou apenas uma diminuição na concentração dos extractos (mínimo 64,0 ng/μL, máximo 88,8 ng/μL), mantendo o grau de pureza dos padrões (em média 1,3), comparativamente ao método sem adição de ARNase.

Tabela 19: Concentração e pureza dos extractos de ADN a partir dos padrões extraídos pelo método Wizard-PVP ARNase

Padrão (% avelã)	Concentração (ng/μL)	Pureza A_{260}/A_{280}
C3 (10%)	86,3	1,5
C6 (1%)	85,0	1,1
C8 (0,1%)	88,0	1,6
C9 (0,05%)	88,8	1,5
C10 (0,01%)	64,0	1,1

Tendo em conta a amplificação dos fragmentos de ADN de avelã por PCR qualitativa (figura 19), verifica-se que a adição de ARNase diminui a capacidade de amplificação dos extractos, talvez devido à presença de inibidores. Como resultado dessa inibição, só foi possível amplificar fragmentos até 0,1% de avelã. Perante estes níveis de amplificação, é possível afirmar que o método Wizard-PVP ARNase não é eficaz para extrair ADN de avelã em chocolate para posterior aplicação em PCR.

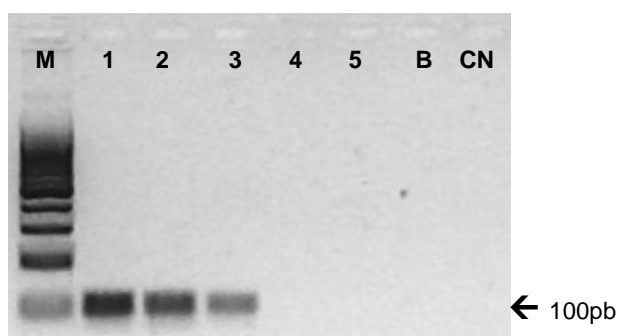


Figura 19: Electroforese em gel de agarose dos padrões de avelã em chocolate amplificados por PCR usando os *primers* Nocc2 F/Nocc1 Rbis, específicos para a avelã ([extractos]=10 ng/μL). M – marcador molecular; 1 a 5 – 10%, 1%, 0,1%, 0,05%, 0,01% de avelã em chocolate, extraída pelo método Wizard-PVP ARNase; B – branco de extração; CN – controlo negativo.

Recorrendo à PCR em tempo real, foi possível obter a amplificação de mais um padrão de avelã, ou seja, foi possível baixar a sensibilidade para 0,05% (figura 20). Por um lado, a PCR ocorreu com elevada eficiência (104,6%) e boa correlação linear ($R^2=0,996$), mas por outro só se registou a amplificação de uma das três réplicas dos padrões de 0,1% e 0,05% de avelã. Relativamente à gama de amplificação, verifica-se que foi tardia tanto para o primeiro padrão cerca de (31 ciclos), como no último nível atingido (38 ciclos). Desta forma, parece evidente que este método não permitiu o nível de amplificação por PCR em tempo real adequado.

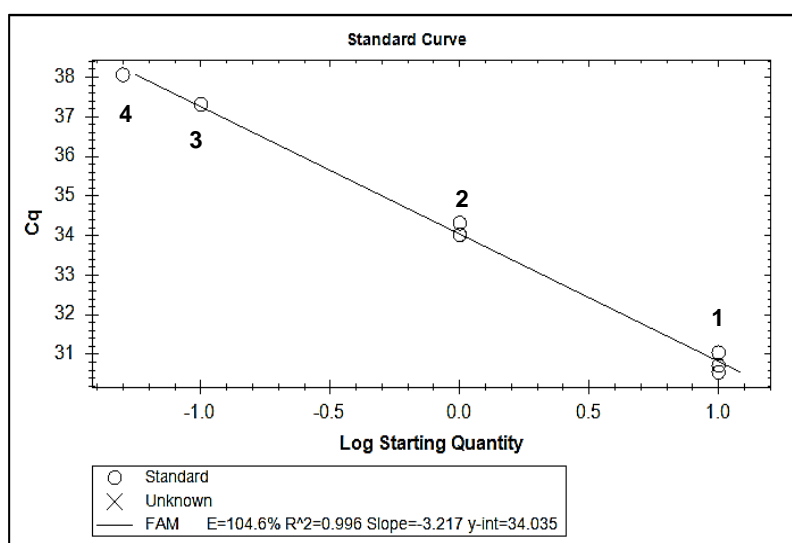


Figura 20: Curva de calibração dos padrões de avelã em chocolate amplificados por PCR em tempo real usando os *primers* Nocc2 F/Nocc1 Rbis e a sonda TaqMan™ Nocc1 P ([extractos]=10 ng/μL). 1 a 4 – 10%, 1%, 0,1%, 0,05% de avelã em chocolate, extraída pelo método Wizard-PVP ARNase.

4.2.8. Análise comparativa dos métodos de extracção

De forma a elucidar e facilitar a comparação dos métodos testados, apresentam-se resumidamente todos os resultados obtidos para cada um dos protocolos. Na tabela 20 encontram-se os valores médios de concentração e pureza dos extractos, os respectivos limites de detecção de ambas as técnicas de PCR, e a eficiência de amplificação e correlação linear das curvas obtidas por PCR em tempo real.

Em termos de rendimento de ADN, os métodos NucleoSpin® e Wizard-PVP foram os que se mostram mais eficazes, tendo-se obtido em média 97,6 ng de ADN/μL e 98,1 ng de ADN/μL, respectivamente. Em contrapartida, o método CTAB-PVP foi o método que apresentou menor rendimento de extracção (média 38,4 ng de ADN/μL). Relativamente à pureza dos extractos, a eficácia dos métodos NucleoSpin® e Wizard-PVP não se verificou, uma vez que se obteve um grau de pureza médio de 1,3 com os

dois métodos. O maior grau de pureza foi obtido no método Wizard com adição de ARNase (média de 1,9) seguido do método Wizard sem adição de ARNase (média de 1,6).

Tabela 20: Comparação dos valores médios de rendimento e pureza dos extractos de ADN, limites de detecção das técnicas de PCR, eficiência e coeficiente de correlação das curvas padrão obtidas por PCR em tempo real para os sete protocolos de extracção testados

Método de extracção	ADN ^a (ng/μL)	Pureza ^a A ₂₆₀ /A ₂₈₀	PCR		PCR em tempo real	
			LOD ^b (%)	LOD ^b (%)	E (%) ^c	R ²
CTAB-PVP	38,4 ± 8,5	1,5 ± 0,1	0,05	0,05	80,7	0,984
NucleoSpin [®] Food kit	97,6 ± 15,4	1,3 ± 0,1	0,01	0,01	93,3	0,968
Wizard [®] Magnetic	77,0 ± 14,4	1,4 ± 0,2	0,1	0,1	104,2	0,987
Wizard	47,8 ± 14,5	1,6 ± 0,3	0,05	0,01	92,2	0,984
Wizard ARNase	50,2 ± 2,4	1,9 ± 0,2	0,01	0,05	110,2	0,992
Wizard-PVP	98,1 ± 5,1	1,3 ± 0,2	0,05	0,05	93,1	0,978
Wizard-PVP ARNase	82,4 ± 10,4	1,4 ± 0,2	0,1	0,05	104,6	0,996

^a média ± desvio padrão; ^b LOD – limite de detecção; ^c E – eficiência da amplificação por PCR em tempo real.

No que diz respeito à amplificação por PCR convencional, todos os padrões extraídos por NucleoSpin[®] e Wizard com adição de ARNase amplificaram positivamente, tendo-se atingido, desta forma, um nível de detecção de 0,01%. Em contraste, os extractos obtidos pelo método Wizard[®] Magnetic e Wizard-PVP com adição de ARNase não foram todos amplificados, tendo-se, apenas, atingido um nível de detecção de 0,1% de avelã em chocolate. Nos métodos CTAB-PVP, Wizard e Wizard-PVP foi possível detectar avelã até um nível de 0,05%.

De acordo com os resultados obtidos por PCR em tempo real, foi apenas possível amplificar até ao padrão com menor quantidade de avelã (0,01%) extraídos pelos métodos NucleoSpin[®] e Wizard. Tal como observado na PCR convencional, os resultados por PCR em tempo real confirmaram o limite de 0,1% de avelã extraída pelo método Wizard[®] Magnetic. O nível de detecção de 0,05% de avelã foi observado nos extractos obtidos pelos métodos CTAB-PVP, Wizard ARNase, Wizard-PVP e Wizard-PVP ARNase. Para o método Wizard ARNase verifica-se, em comparação com a PCR convencional, que a PCR em tempo real se mostrou menos sensível, uma vez que o limite de detecção atingido foi de 0,05%. Em contraste, para o método

Wizard-PVP ARNase, a PCR em tempo real revelou-se mais sensível, visto que o limite atingido foi de 0,05%.

De modo geral, as curvas padrão obtidas por PCR em tempo real para cada método de extracção, evidenciaram eficiência da reacção e respectiva correlação linear adequadas por serem, em geral, superiores a 90% e 0,98, respectivamente.

Na tabela 21 encontram-se as respectivas gamas de amplificação, ou seja, valores de Ct do primeiro e último padrão amplificados em PCR em tempo real.

Tabela 21: Valores médios de Ct obtidos para os primeiros e últimos níveis de amplificação por PCR em tempo real em cada método de extracção

Método de extracção	PCR em tempo real	
	Ct inicial	Ct final
CTAB-PVP	28,37 ± 0,03	37,34 ± 0,31
NucleoSpin [®] Food <i>kit</i>	26,48 ± 0,17	36,00 ± 0,00
Wizard [®] Magnetic	30,44 ± 0,18	36,87 ± 0,72
Wizard	29,33 ± 0,20	38,96 ± 0,00
Wizard ARNase	30,43 ± 0,14	37,63 ± 0,00
Wizard-PVP	31,74 ± 0,48	39,51 ± 0,00
Wizard-PVP ARNase	30,77 ± 0,25	38,06 ± 0,00

A avaliação comparativa dos níveis de amplificação por PCR em tempo real também permite constatar que os padrões extraídos pelo método NucleoSpin[®] começaram a amplificar mais cedo (em média 26 ciclos) em relação aos padrões extraídos pelos restantes métodos, o que indica uma maior quantidade/qualidade do ADN obtido (tabela 21).

Tendo em consideração a capacidade de amplificação dos padrões extraídos por cada um dos métodos é possível afirmar que:

- O método NucleoSpin[®] evidenciou os melhores níveis de amplificação por PCR convencional (figura 9) e PCR em tempo real (figura 10), atingindo o menor valor testado para a avelã em chocolate (0,01%) com ambas as técnicas de PCR. A PCR em tempo real ocorreu com elevada eficiência (93,3%) e correlação (0,968);
- O método Wizard com adição de ARNase foi o protocolo que mostrou um desempenho por PCR convencional (figura 15) mais próximo do método NucleoSpin[®], enquanto por PCR em tempo real o método Wizard mostrou um desempenho similar ao NucleoSpin[®];

- O método Wizard[®] Magnetic foi o protocolo que evidenciou os piores resultados por ambas as técnicas de PCR, com um nível de detecção de apenas 0,1% de avelã;
- De todos os métodos testados, os protocolos Wizard, com e sem alterações, foram os que apresentaram menor reprodutibilidade, enquanto os métodos CTAB-PVP e NucleoSpin[®] foram os mais reprodutíveis nos níveis de amplificação por ambas as técnicas de PCR.

4.3. Optimização da detecção de avelã em chocolate

Depois de identificado o melhor protocolo para a extracção de quantidades vestigiais de ADN de avelã em chocolate, procedeu-se à extracção de proporções de avelã em chocolate substancialmente inferiores, tendo em conta os níveis de sensibilidade adequados para a detecção de alergénios (1-100 ppm).

Os padrões de avelã em chocolate foram extraídos pelo método NucleoSpin[®] e os respectivos valores de concentração e pureza apresentam-se na tabela 22.

Tabela 22: Concentração e pureza dos extractos de ADN a partir dos padrões extraídos pelo método NucleoSpin[®]

Padrão (% avelã)	Concentração (ng/μL)	Pureza A ₂₆₀ /A ₂₈₀
C0 (0%)	101,3	1,4
C3 (10%)	80,7	1,5
C4 (5%)	42,5	1,2
C6 (1%)	46,8	1,1
C7 (0,5%)	91,0	1,5
C8 (0,1%)	50,7	1,1
C9 (0,05%)	72,5	1,6
C10 (0,01%)	69,3	1,6
C11 (0,005%)	59,5	1,2
C12 (0,001%)	83,8	1,5
C13 (0,0005%)	79,0	1,2
C14 (0,0001%)	65,5	1,2

Verifica-se que, em geral, o método NucleoSpin[®] permitiu extrair ADN com qualidade e quantidade aceitáveis (70,2 ng de ADN/μL e 1,3 de pureza, em média).

Recorrendo à técnica da PCR convencional (figura 21) foi possível detectar avelã até um nível de 0,005% (50 ppm), tal como na amplificação dos padrões de avelã em massa pevide (figura 6). No entanto, este nível de detecção revelou-se menos

sensível, quando comparado com dados obtidos por outros autores obtidos por PCR convencional. Holzhauser et al. (2000) e Herman et al. (2003) conseguiram detectar 0,001% (10 ppm) de avelã em chocolate usando *primers* do gene mitocondrial *nad1* e do gene que codifica para o alergénio Cor a 1.0401, respectivamente.

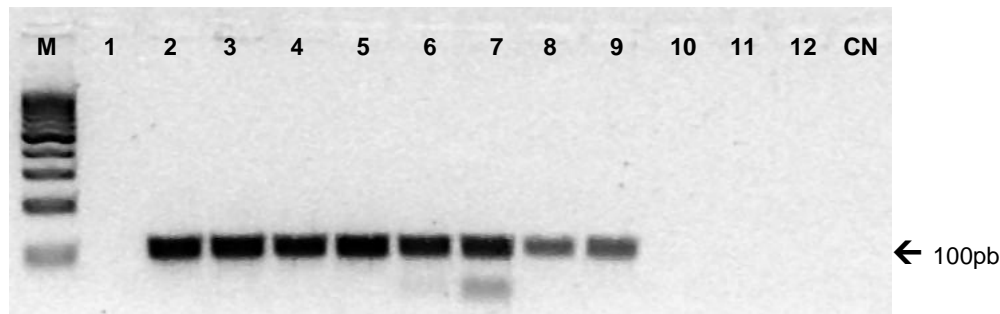


Figura 21: Electroforese em gel de agarose dos padrões de avelã em chocolate amplificados por PCR usando os *primers* Nocc2 F/Nocc1 Rbis, específicos para a avelã ([extractos]=10 ng/ μ L). M – marcador molecular; 1 – chocolate com 0% de avelã; 2 a 12 – 10%, 5%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, 0,005%, 0,001%, 0,0005%, 0,0001% de avelã em chocolate; CN – controlo negativo.

No que diz respeito à amplificação pela técnica da PCR em tempo real (figuras 22 e 23), os padrões foram amplificados em quadruplicado, sendo possível detectar avelã até um nível de 0,005% (50 ppm), confirmando os resultados obtidos por PCR convencional. Pelas figuras 22 e 23 verificar-se que o primeiro padrão amplificou após 26 ciclos e o último após, aproximadamente, 40. O limite de detecção atingido está em consonância com o obtido por Schöringhumer et al. (2009), que detectou avelã até um nível de 0,005% em biscoitos, usando *primers* e sonda TaqMan™ para o gene que codifica o alergénio Cor a 1. No entanto, níveis mais baixos (0,001%) foram obtidos por Köppel et al. (2010) e D'Andrea et al. (2009 e 2011). A razão pela qual estes autores conseguiram detectar quantidades inferiores de avelã poderá ser explicada por diferenças entre as matrizes usadas para preparar as misturas padrão. Köppel et al. (2010) prepararam bolachas com diferentes quantidades de avelã e D'Andrea et al. (2009 e 2011) usaram farinha de trigo para a preparação das misturas padrão. As matrizes em questão, embora complexas e processadas como no caso das bolachas, facilmente permitem obter extractos relativamente puros em ADN. Por outro lado, matrizes como o chocolate, levam à produção de extractos susceptíveis de conter compostos fenólicos, fortemente inibidores da PCR.

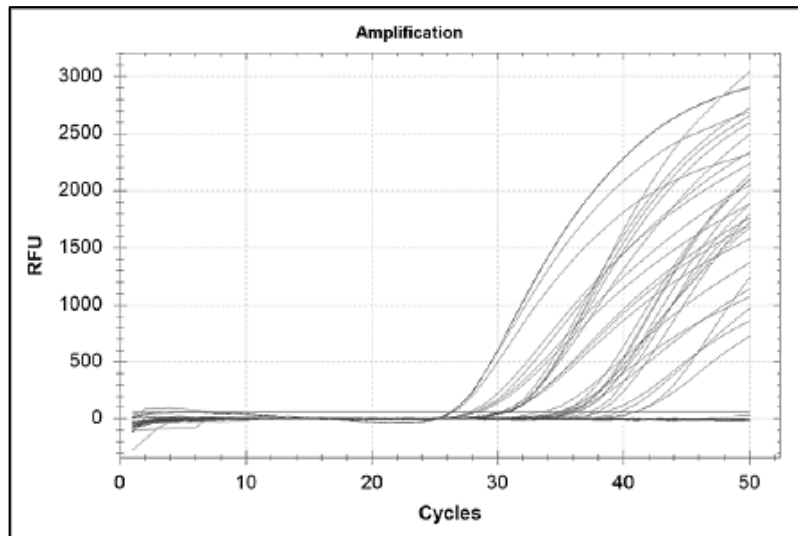


Figura 22: Representação gráfica do sinal de fluorescência em função do número de ciclos da PCR em tempo real da amplificação dos padrões de avelã em chocolate, usando os *primers* Nooc2 F/ Nooc1 Rbis e a sonda TaqMan™ Nocc1 P.

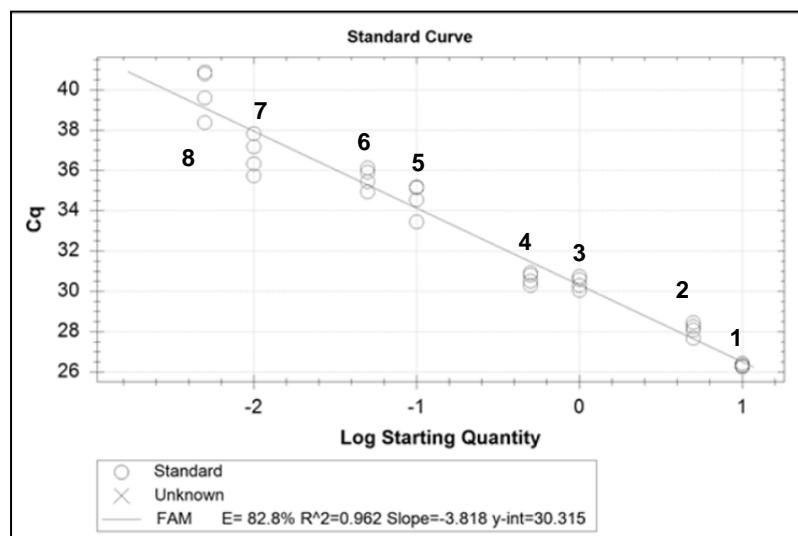


Figura 23: Curva de calibração dos padrões de avelã em chocolate amplificados por PCR em tempo real usando os *primers* Nocc2 F/Nocc1 Rbis e a sonda TaqMan™ Nocc1 P ([extractos]=10 ng/μL). 1 a 8 – 10%, 5%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, 0,005% de avelã em chocolate.

4.4. Aplicação na detecção de avelã em chocolates comerciais

Todas as amostras de chocolates comerciais foram extraídas pelo método NucleoSpin®, sendo a concentração e pureza do ADN avaliadas por espectrofotometria UV (tabela 23). Atendendo aos resultados obtidos pode afirmar-se, que de uma forma geral, a extracção permitiu boa recuperação de ADN com pureza adequada para a maioria das amostras. Após avaliação do ADN extraído, procedeu-se

à amplificação de todas as amostras comerciais por PCR convencional. A amplificação foi efectuada, pelo menos em duplicado, de forma a confirmar os resultados.

Tabela 23: Concentração e pureza das amostras de chocolates comerciais extraídas pelo método NucleoSpin®

Chocolates	Concentração (ng/μL)	Pureza A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Chocolates	Concentração (ng/μL)	Pureza A ₂₆₀ /A ₂₈₀
A1	87,7	1,5	A14	75,2	1,5
A2	49,7	1,8	A15	57,8	1,2
A3	65,8	1,6	A16	84,2	1,6
A4	50,0	1,7	A17	36,2	2,2
A5	41,8	1,9	A18	39,3	2,2
A6	36,5	2,3	A19	76,8	1,4
A7	54,8	2,0	A20	72,5	1,6
A8	85,5	1,6	A21	193,8	1,2
A9	79,0	1,7	A22	25,2	1,1
A10	54,3	1,8	A23	50,7	1,8
A11	36,3	1,2	A24	49,2	1,6
A12	48,3	1,2	A25	36,7	1,0
A13	109,0	1,3			

A figura 24 representa um dos ensaios efectuados na amplificação de todas as amostras testadas. Atendendo aos produtos de PCR obtidos e de acordo com a informação referida na rotulagem (tabela 4) é possível inferir que, das vinte e cinco amostras testadas, treze confirmaram a presença de avelã rotulada como ingrediente (amostras A1, A6, A8 a A10, A15, A17, A18, A20, A22 a A25), exibindo bandas de elevada intensidade. O rótulo das amostras A2 a A5, A7, A11 a A14, e A16 mencionavam a presença de amêndoa como ingrediente e “pode conter vestígios de outros frutos de casca rija”, nas quais foi detectada avelã, excepto nos casos da A7, A12 e A16. Apenas as amostras A19 e A21 não declaravam avelã ou amêndoa como ingredientes principais, sendo apesar disso detectada a presença de avelã na amostra A19 (linha 14, figura 24).

Deste modo, os resultados permitiram inferir que os chocolates A2, A11, A14 e A19 poderão ter sido contaminados com avelã durante a sua produção, enquanto nos chocolates A7, A12 e A16 que continham a menção para a possibilidade de conterem vestígios de outros frutos de casca rija, para além da amêndoa, não se detectou eventual contaminação com avelã. A única amostra sem indicação de avelã ou amêndoa como ingrediente (A21) foi negativa para a detecção de avelã.

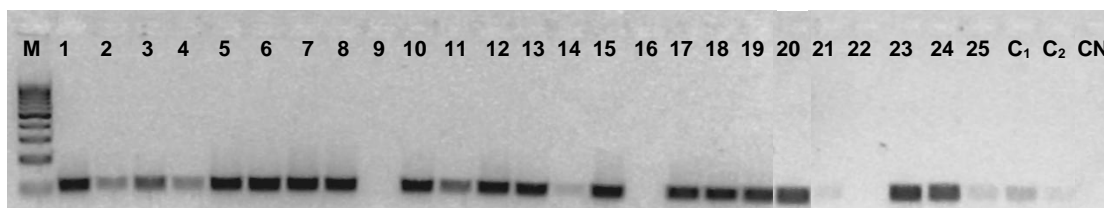


Figura 24: Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR (100pb) de chocolates comerciais usando os *primers* Nocc2 F/Nocc1 Rbis, específicos para a avelã ([extractos]=10ng/ μ L). M – marcador molecular; Linha 1 – A1; Linhas 2 a 5 – A3 a A6; Linhas 6 a 8 – A8 a A10; Linha 9 – A12; Linhas 10 a 20 – A15 a A25; Linha 21 – A2; Linha 22 – A7; Linha 23 – A11; Linhas 24 a 25 – A13 a A14 (de acordo com a tabela 4); C₁ – 0,1% avelã; C₂ – 0,01% avelã; CN – controlo negativo.

Como forma de confirmar os resultados obtidos por PCR qualitativa, as amostras foram amplificadas por PCR em tempo real. Em cada ensaio, além dos chocolates comerciais, foram incluídos os seguintes padrões de chocolate: 10%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% e 0,005% de avelã. As amostras de chocolates comerciais e os padrões de avelã em chocolate foram amplificadas em triplicado, em dois ensaios independentes para cada amostra.

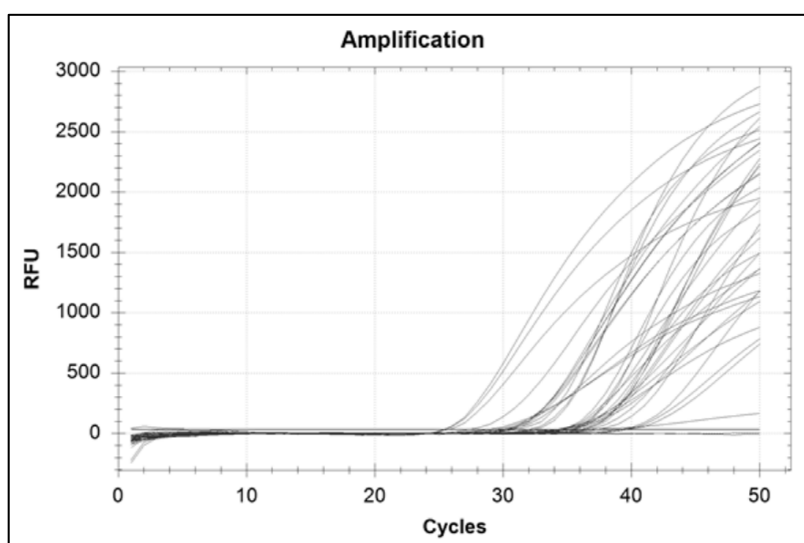


Figura 25: Representação gráfica do sinal de fluorescência em função do número de ciclos da PCR em tempo real da amplificação dos chocolates comerciais e padrões de avelã em chocolate, usando os *primers* Nooc2 F/Nooc1 Rbis e a sonda TaqMan™ Nooc1 P.

Na figura 25, apresentam-se as curvas de fluorescência resultantes da amplificação das amostras de chocolates comerciais e dos padrões de avelã em chocolate de um ensaio exemplo. A respectiva curva padrão dos valores de Ct em função do logaritmo da concentração de avelã, bem como interpolação de valores obtidos para amostras de chocolates, apresentam-se na figura 26. No exemplo apresentado, verifica-se que a reacção ocorreu com uma eficiência relativamente

elevada (80,3%) e com boa correlação linear ($R^2=0,971$). Nos vários ensaios de PCR em tempo real para avaliação das amostras comerciais, a eficiência variou entre 75,6 e 81,0% e os valores de R^2 entre 0,950 e 0,971.

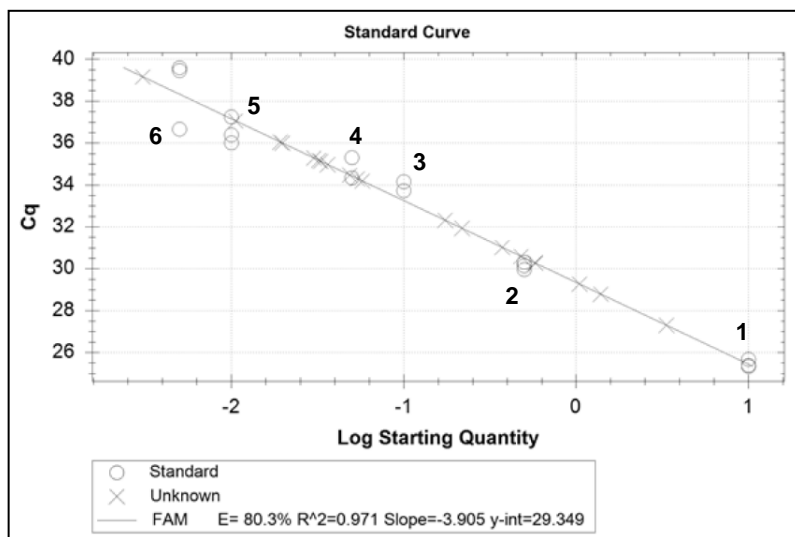


Figura 26: Curva de calibração dos padrões de avelã em chocolate e respectivos chocolates comerciais, amplificados por PCR em tempo real usando os primers Nocc2 F/Nocc1 Rbis e a sonda TaqMan™ Nocc1 P. ([extractos]=10 ng/μL). 1 a 6 – 10%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, 0,005% de avelã em chocolate.

Na tabela 24 apresenta-se um resumo dos resultados obtidos para a detecção de avelã por PCR qualitativa e PCR em tempo real, assim como a informação da rotulagem relevante para cada chocolate comercial. Na tabela citam-se também os valores médios de Ct obtidos por PCR em tempo real, bem como as quantidades de avelã estimadas em cada amostra de chocolate. A análise global dos dados da tabela 24 permite constatar que todos os resultados obtidos por PCR convencional foram confirmados por PCR em tempo real. Os resultados negativos relativos à não ocorrência de eventuais contaminações com avelã foram confirmados nas amostras A7, A12, A16 e A21. Por outro lado, verificou-se que nas amostras A2 a A5, A13, A14 e A19, os valores encontrados para a avelã poderão estar relacionados com contaminação no processo industrial uma vez que foram maioritariamente $\leq 0,05\%$.

Na amostra A11, que diz conter apenas amêndoa como fruto de casca rija adicionado, foi estimado 1,75% de avelã, que se considera um valor muito elevado para eventual contaminação acidental. Neste caso, poderá ter ocorrido uma substituição parcial de amêndoa por avelã, uma vez que a avelã apresenta um valor comercial mais baixo do que a amêndoa.

Tabela 24: Resumo dos resultados obtidos por PCR convencional e PCR em tempo real para a detecção e semi quantificação de avelã em amostras de chocolates comerciais

Amostra	Rotulado			PCR	PCR em tempo real	
	Contém avelã	Contém amêndoa	Pode conter vestígios de outros frutos de casca rija		Ct (média ± DP)	Avelã estimada (%)
A1	x	x	x	+++	30,06 ± 0,16	1,33 ± 0,12
A2		7,5%	x	+	34,92 ± 0,54	0,04 ± 0,01
A3		11%	x	++	34,55 ± 0,40	0,05 ± 0,01
A4		7%	x	+++	34,93 ± 0,56	0,08 ± 0,03
A5		25%	x	++	35,92 ± 0,50	0,05 ± 0,01
A6	x	8%	x	+++	28,95 ± 0,21	2,51 ± 0,32
A7		15%	x	-	-	
A8	11%		x	+++	27,14 ± 0,08	7,07 ± 0,32
A9	14%			+++	26,05 ± 0,05	13,2 ± 0,4
A10	25%		x	+++	26,19 ± 0,07	21,1 ± 0,8
A11		19%	x	+++	28,87 ± 0,23	1,75 ± 0,24
A12		15%	x ^a	-	-	
A13		25%	x	+++	31,76 ± 0,66	0,26 ± 0,10
A14		20%	x ^a	++	35,73 ± 0,52	0,02 ± 0,01
A15	5%	5%		+++	27,90 ± 0,12	7,76 ± 0,55
A16		10%	x	-	-	
A17	2%			+++	29,12 ± 0,18	3,81 ± 0,41
A18	x		x	+++	29,82 ± 0,10	2,53 ± 0,15
A19			x	+	38,12 ± 1,48	0,01 ± 0,01
A20	27%		x ^b	+++	25,52 ± 0,13	17,2 ± 1,2
A21			x	-	-	
A22	5%		x	+++	28,46 ± 1,03	1,92 ± 1,24
A23	10%		x	+++	26,10 ± 0,14	12,4 ± 1,0
A24	x		x	+++	30,38 ± 0,19	0,55 ± 0,06
A25	12%		x	+++	28,06 ± 0,59	4,26 ± 1,46

Ct cycle threshold; DP desvio padrão; (+) intensidade fraca das bandas obtidas; (++) intensidade moderada das bandas obtidas; (+++) intensidade forte das bandas obtidas; (-) não detectado; ^a pode conter vestígios de avelã; ^b pode conter vestígios de amêndoa.

Relativamente aos restantes valores estimados para a avelã como ingrediente com o valor indicado, verifica-se que nas amostras A15, A17 e A23 os valores estimados para a quantidade de avelã foram próximos dos rotulados, embora superiores. O valor sobrestimado da amostra A23 (12,4%) poderá ser relativo à adição de pasta de avelã, para além de avelã (10%) como ingrediente. Quanto às amostras

A8, A9, A10, A20, A22 e A25, os valores obtidos foram subestimados, sendo muito aproximados nos casos A9 e A10. O valor subestimado na amostra A22 (1,92%) poderá estar relacionado pelo facto de a avelã ser adicionada apenas na forma de pasta (5%), e ainda pelo facto do extracto de ADN apresentar pureza baixa (1,1), podendo levar à inibição da amplificação e valores de Ct superiores. A mesma observação poderá ser referida no caso da amostra A25, cuja pureza também foi baixa (1,0). Embora se identifiquem diferenças bastante acentuadas entre os valores rotulados e os estimados, em alguns casos, pode verificar-se que os valores obtidos apresentaram alguma proximidade dos rotulados. Deve-se realçar que as diferenças acentuadas por defeito poderão também ser intencionais para diminuição de custos de produção (A8, A20 e A25). Assim, como o valor estimado acima do rotulado na amostra A15 (7,76%), por eventual substituição de amêndoa por avelã, uma vez que mencionava o mesmo valor para os dois frutos (5%).

Deve-se realçar que neste estudo os valores apresentados apenas poderão ser considerados como uma semi quantificação, uma vez que não foram utilizados materiais de referência certificados e não foi utilizado nenhum procedimento de normalização. Adicionalmente seria necessário proceder à validação do modelo de quantificação.

5. Conclusões finais

A monitorização da contaminação cruzada na indústria alimentar constitui uma etapa bastante importante, para a salvaguarda da saúde dos consumidores propensos ao desenvolvimento de alergias alimentares provocadas pela ingestão de potenciais alergénios como os frutos de casca rijas. Para isso, a detecção de vestígios de avelã como um fruto de casca rija deve ser feita por recurso a técnicas sensíveis, rápidas e específicas. Com efeito, o recurso à técnica da PCR (convencional e em tempo real) constitui uma opção bastante confiável, sendo por isso escolhida para o presente trabalho.

A extracção de ADN é uma etapa crucial para a detecção de quantidades vestigiais em matrizes alimentares complexas e processadas, como é o caso da detecção de potenciais alergénios. Pelo que neste estudo diversos protocolos foram testados e comparados pela sua capacidade de extrair ADN de chocolates modelo contendo quantidades definidas de avelã, como potencial alergénio. Todos os extractos de ADN obtidos pelos diferentes métodos foram amplificados por PCR qualitativa e PCR em tempo real de forma a permitir otimizar ambas as técnicas, visando a detecção de quantidades vestigiais de avelã em chocolate.

De acordo com os resultados registados, o método NucleoSpin[®] evidenciou uma melhor performance e reprodutibilidade na amplificação por PCR convencional e PCR em tempo real. Este método tem como vantagem ser de execução rápida, possuir uma relação custo/tempo relativamente baixa e permitir a obtenção de extractos com concentração e pureza adequadas. O segundo melhor protocolo para a extracção de ADN de avelã em chocolate correspondeu ao método Wizard sem adição de ARNase, que permitiu a amplificação de todos os padrões testados por PCR em tempo real. No entanto, este método revelou baixa reprodutibilidade por PCR convencional e PCR em tempo real, apesar dos extractos apresentarem em média, valores de pureza elevados.

A aplicação do método de extracção escolhido a uma gama alargada de padrões de avelã em chocolate, teve como objectivo atingir os limites de detecção desejáveis no caso de alergénios (1-100 ppm). A utilização do método NucleoSpin[®] para a extracção de ADN dos chocolates modelo contendo avelã e a optimização das técnicas de PCR qualitativa e PCR em tempo real, permitiram um limite de 50 ppm (0,005%) para a detecção de avelã. Atendendo à dificuldade de extracção de ADN com elevada qualidade e integridade a partir de matrizes complexas como o chocolate, considera-se que o limite obtido foi baixo enquadrando-se nos limites estimados como desejáveis para a detecção de alergénios em alimentos.

A aplicação destas metodologias a amostras de chocolates comerciais foi efectiva, tendo-se obtido em vários casos percentagens semelhantes às rotuladas. Foi ainda possível

atestar a presença de quantidades vestigiais ($\leq 0.05\%$) de avelã em vários chocolates, o que esteve de acordo com a rotulagem dos mesmos. No caso da amostra de chocolate A11, a quantidade determinada por PCR em tempo real poderá não ser atribuída a uma possível contaminação acidental. Esse valor poderá ser explicado por uma possível adulteração com avelã, em substituição de amêndoa, dado que a avelã tem um menor valor comercial. Desta forma, a ingestão das amostras de chocolate em questão poderá acarretar consequências graves para indivíduos sensibilizados para a avelã. É ainda importante referir que das 25 amostras de chocolate testadas, 4 delas não amplificaram a avelã, o que também está de acordo com a rotulagem informativa, verificando-se que a rotulagem de precaução relativa à possível presença de avelã é excessiva para o caso destas 4 amostras.

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam que a escolha de um método de extração de ADN eficaz é determinante para a obtenção de níveis de sensibilidade adequados, para a detecção e quantificação de ingredientes potencialmente alergénicos. Relativamente à monitorização da contaminação cruzada na indústria alimentar, devem ser reunidos mais esforços, em termos de métodos analíticos, para que níveis mais baixos de detecção de alergénios sejam atingidos, de forma a proteger os indivíduos alérgicos e ao mesmo tempo evitar o uso desnecessário, em alguns casos, da rotulagem de precaução.

6. Referências bibliográficas

- Alasalvar, C.; Shahidi, F.; Amaral, J.S.; Oliveira, B.P.P. (2008). Compositional characteristics and Health Effects of hazelnut (*Corylus avellana L.*): An Overview (Chapter 12). In C. Alasalvar, F. Shahidi (Eds) *Tree nuts: composition, phytochemicals and health effects*. CRC Press, Taylor & Francis Group, New York.
- Alasalvar, C.; Shahidi, F.; Liyanapathirana, C.M.; Ohshima, T. (2003). Turkish Tombul hazelnut (*Corylus avellana L.*) 1. Compositional characteristics. *J Agric. Food Chem.* 51: 3790-3796.
- Amaral, J.S.; Casal, S.; Citová, I.; Santos, A.; Seabra, R.M.; Oliveira, B.P.P. (2006). Characterization of several hazelnut (*Corylus avellana L.*) cultivars based in chemical, fatty acid and sterol composition. *Eur Food Res Technol* 222: 274-280.
- Arlorio, M.; Cereti, E.; Coïsson, J.D.; Travaglia, F.; Martelli, A. (2007). Detection of hazelnut (*Corylus spp.*) in processed foods using real-time PCR. *Food Control* 18: 140-148.
- Baumgartner, S.; Krska, R.; Welzig, E. (2007) Detecting allergens in foods (Chapter 14). In Mills, C.; Wichers, H.J.; Hoffmann-Sommergruber, K. (Eds) *Managing allergens in food*. Woodhead Publishing Limited, England.
- Besler, M. (2001a). Determination of allergens in foods. *Anal Chem* 20: 662-672.
- Besler, M.; Steinhart, H.; Paschke, A. (2001b). Stability of food allergens and allergenicity of processed foods: review. *J Chromatogr B* 765: 207-228.
- Bettazzi, F.; Lucarelli, F.; Palchetti, I.; Berli, F.; Marrazza, G.; Mascini, M. (2008). Disposable electrochemical DNA-array for PCR amplified detection of hazelnut allergens in foodstuffs. *Anal Chim Acta* 614: 93-102.
- BIO-RAD, 2011. <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10014647A.pdf> (acesso: 20/10/2011)
- Breiteneder, H.; Ebner, C. (2000). Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 106: 27-36.
- Breiteneder, H.; Radauer, C. (2004). A classification of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 113: 821-830.
- Broll, H. (2010). Quantitative Real-Time PCR (Chapter 3). In Popping, B.; Diaz-Amigo, C.; Hoenicke, K. (Eds) *Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists*. John Wiley & Sons, Inc, New Jersey.
- Chapman, M.D. (2008). Allergen Nomenclature (Chapter 3). In Lockey, R.F.; Ledford, D.K. (Eds) *Allergens and Allergen Immunotherapy – 4th Edition*. Informa Healthcare, New York.
- Crevel, R.W.R. (2007). Allergen management in the food industry (Chapter 16). In Mills, C.; Wichers, H.J.; Hoffmann-Sommergruber, K. (Eds) *Managing allergens in food*. Woodhead Publishing Limited, England.
- D'Andrea, M.; Coïsson, J.D.; Locatelli, M.; Garino, C.; Cereti, E.; Arlorio, M. (2011). Validating allergen coding genes (Cor a 1, Cor a 8, Cor a 14) as target sequences for hazelnut detection via Real-Time PCR. *Food Chem* 124: 1164-1171.

- D'Andrea, M.; Coisson, J.D.; Travaglia, F.; Garino, C.; Arlorio, M. (2009). Development and validation of a SYBR-Green I Real-Time PCR protocol to detect hazelnut (*Corylus avellana L.*) in foods through Calibration via Plasmid Reference Standard. *J Agric Food Chem* 57: 11201-11208.
- Datukishvili, N.; Gabriadze, I.; Kutateladze, T.; Karseladze, M.; Vishnepolsky, B. (2010) Comparative evaluation of DNA extraction methods for food crops. *Int Food Sci Techno.* 45: 1316-1320.
- Di Bernardo, G.; Del Gaudio, S.; Galderisi, U.; Cascino A.; Cipollaro, M. (2007) Comparative evaluation of different DNA extraction procedures from food samples. *Biothechnol Prog* 23: 297-301.
- Di Pinto, A.; Forte, V.; Guastadisegni, M.C.; Martino, C.; Schena, F.P.; Tantillo, G. (2007). A comparison of DNA extraction methods for food analysis. *Food Control* 18: 76-80.
- Diaz-Amigo, C. (2010). Antibody-based detection methods: from theory to practice (Chapter 12). In Popping, B.; Diaz-Amigo, C.; Hoenicke, K. (Eds) *Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists*. John Wiley & Sons, Inc, New Jersey.
- Diaz-Amigo, C.; Popping, B. (2010). Detection of food allergens (Chapter 9). In Popping, B.; Diaz-Amigo, C.; Hoenicke, K. (Eds) *Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists*. John Wiley & Sons, Inc, New Jersey.
- Directiva 2000/13/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de Março de 2000 relativa à aproximação das legislações dos Estados Membros respeitantes à rotulagem, apresentação e publicidade dos géneros alimentícios. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, 06-05-200, L 109/29-42.
- Directiva 2003/89/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 10 de Novembro de 2003 que altera a Directiva 2000/13/CE relativamente à indicação dos ingredientes presentes nos géneros alimentícios. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, 25/11/2003, L 308/15-18.
- Directiva 2006/142/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de Dezembro de 2006 que altera o anexo III A da Directiva 2000/13/CE que estabelece uma lista dos ingredientes que devem ser mencionados, em todas as situações, na rotulagem dos géneros alimentícios. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, 23/12/2006, L 368/110-111.
- Directiva 2006/68/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 27 de Novembro de 2007 que altera o anexo III A da Directiva 2000/13/CE no que respeita a determinados ingredientes alimentares. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, 28/11/2007, L 310/11-14.
- Ehlert, A.; Hupfer, C.; Demmel, A.; Engel, K.; Busch, U. (2008). Detection of cashew nut in foods by a specific real-time PCR methods. *Food Anal Methods* 1: 136-143.
- FAOSTAT (2009). <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (acesso: 22/10/2011).
- Galan, A.M.G.; Brohée, M.; Silva, E.A.; van Hengel, A.J.; Chassaing, H. (2011). Development of a real-time PCR method for the simultaneous detection of soya and lupin mitochondrial DNA as markers for the presence of allergens in processed food. *Food Chem* 127: 834-841.
- Gryson, N.; Dewettinck, K.; Messens, K. (2007). Influence of cocoa components on the PCR detection of soy lecithin DNA. *Eur Food Res Technol* 226: 247-254.

- Gryson, N.; Messens, K.; Dewettinck, K. (2004) Evaluation and optimization of five different extraction methods for soy DNA in chocolate and biscuits. Extraction of DNA as a first step in GMO analysis. *J Sci Food Agric* 84: 1357-1363.
- Heick, J.; Fischer, M.; Pöpping, B. (2011). First screening method for the simultaneous detection of seven allergens by liquid chromatography mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1218: 938-943.
- Herman, L.; Block, J.; Viane, R. (2003). Detection of hazelnut DNA traces in chocolate by PCR. *Int J Food Sci Technol* 38: 633-640.
- Holck, A.L.; Diaz-Amigo, C.; Kerback, S.; Popping, B.; Mustorp, S.; Axelsson, C.E. (2011). Detecting of allergens in food (Chapter 9). In Oliveira, M.B.P.P.; Mafra, I.; Amaral, J.S. (Eds) *Current Topics on food authenticity*. Transworld Research Network, India.
- Holzhauser, T.; Stephan, O.; Vieths, S. (2002). Detection of potentially allergenic hazelnut (*Corylus avellana*) residues in food: a comparative study with DNA PCR-ELISA and protein Sandwich-Elisa. *J Agric Food Chem* 50: 5808-5815.
- Holzhauser, T.; Stephan, O.; Vieths, S. (2006). Polymerase Chain Reaction (PCR) methods for the detection of allergenic foods (Chapter 7). In Koppelman, S.J., Hefle S.L. (Eds) *Detecting allergens in food*. Woodhead Publishing Limited, England.
- Holzhauser, T.; Wangorsch, A.; Vieths, S. (2000). Polymerase chain reaction (PCR) for detection of potentially allergenic hazelnut residues in complex food matrixes. *Eur Food Res Technol* 211: 360-365.
- IPCS (2009) Hazard Identification and Characterization: Toxicological and Human Studies. FAO/WHO, International Programme on Chemical Safety (Environmental Health Criteria 240). http://whqlibdoc.who.int/ehc/WHO_EHC_240_7_eng_chapter4.pdf (acesso: 02-06-2011).
- Jedrychowski, L.; Egger, M.; Hauser, M.; Schmidt, G.; Wopfner, N.; Ferreira, F.; Wallner, M.; Lopata, A. (2010a). Brief characteristics of other important food allergens (Chapter 14). In Jedrychowski, L.; Wichers, J. (Eds) *Chemical and Biological Properties of Food Allergens*. CRC Press, Taylor & Francis Group, New York.
- Jedrychowski, L.; Penninks, A.H.; Kaczmarek, M.; Cudowska, B.; Harrer, A.; Erler, A.M.; Ferreira, F.; Himly, M. (2010b) Methods for detection of food allergens (Chapter 3). In Jedrychowski, L.; Wichers, J. (Eds) *Chemical and Biological Properties of Food Allergens*. CRC Press, Taylor & Francis Group, New York.
- King, T.P.; Hoffman, D.; Lowenstein, H.; Marsh, D.G.; Platts-Mills, T.A.E.; Thomas, W. (1995). Allergen Nomenclature. *Allergy* 50: 765-774.
- Kirsch, S.; Fourdrilis, S.; Dobson, R.; Scippo, M.; Maghuin-Rogister, G.; Pauw, E.D. (2009). Quantitative methods for food allergens: a review. *Anal Bioanal Chem* 395: 57-67.
- Köksal, A.I.; Artik, N.; Simsek, A.; Günes, N. (2006). Nutrient composition of hazelnut (*Corylus avellana* L.) varieties cultivated in Turkey. *Food Chem* 99: 509-515.
- Köppel, R.; Dvorak, V.; Zimmerli, F.; Breitenmoser, A.; Eugster, A.; Waiblinger, H. (2010). Two tetraplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from eight allergens in food. *Eur Food Res Technol* 230: 367-374.

- Lauer, I.; Foetisch, K.; Kolarich, D.; Ballmer-Webber, B.K.; Conti, A.; Altmann, F.; Vieths, S.; Scheurer, S. (2004). Hazelnut (*Corylus avellana*) vicilin Cor a 11: molecular characterization of a glycoprotein and its allergenic activity. *Biochem J* 383: 327-334.
- Lehrer, S.B.; Ayuso, R.; Reese, G. (2002) Current understanding of food allergens. *Ann NY Acad Sci* 964: 69-85.
- Levin, R.E. (2004). The application of real-time PCR to food and agricultural systems: a review. *Food Biotechnol* 18: 97-133.
- Macherey-Nagel, (2011). Genomic DNA from food. User Manual, NucleoSpin® Food (versão electrónica). http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Genomic%20DNA/UM_gDNAFood.pdf (acesso: 10/10/2011).
- Mafra, I. Oliveira, M.B.P.P. (2005) Organismos geneticamente modificados e alimentos derivados: II. Métodos de detecção e quantificação. *Alimentação Humana* 11: 71-89.
- Mafra, I.; Ferreira, I.M.P.L.V.O.; Oliveira, M.B.P.P. (2008b). Food authentication by PCR-based methods. *Eur Food Res Technol* 227: 649-665.
- Mafra, I; Silva, S.A.; Moreira, E.J.M.O.; Silva, C.S.F.S.; Oliveira, M.B.P.P. (2008a). Comparative study of ADN extraction methods for soybean derived food products. *Food Control* 19: 1183-1190.
- Monaci, L.; Visconti, A. (2009). Mass spectrometry-based proteomics methods for analysis of food allergens. *Anal Chem* 28: 581-591
- Monaci, L.; Visconti, A. (2010). Immunochemical and DNA-based methods in food allergen analysis and quality assurance perspectives: review. *Food Sci Technol* 21: 272-283.
- Nicoletti, C.; Temblay, J.N.; Ivory, K. (2007). The immune system and allergic responses to food (Chapter 2). In Mills, C.; Wichers, H.J.; Hoffmann-Sommergruber, K. (Eds) *Managing allergens in food*. Woodhead Publishing Limited, England.
- Oliveira, I.; Sousa, A.; Morais, J.S.; Ferreira, I.C.F.R.; Bento, A.; Estevinho, L; Pereira, J.A. (2008). Chemical composition and antioxidante and antimicrobial activities of three hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars. *Food Chem Toxicol* 46: 1801-1807.
- Pafundo, S.; Gulli, M; Marmiroli, N. (2010). Multiplex real-time PCR using SYBR® GreenER™ for the detection of DNA allergens in food. *Anal Bioanal Chem* 396: 1831-1839.
- Pasaoglu, G.; Mungan, D.; Misirligil, Z. (2011). Allergy to hazelnut in adults: a two-step study. *Allergol Immunopathol*. Doi:10.1016/j.aller.2011.05.008
- Piknová, L.; Pangallo, D.; Kuchta, T. (2008). A novel real-time polymerase chain reaction (PCR) method for the detection of hazelnuts in food. *Eur Food Res Technol* 226: 1155-1158.
- Poms, R.E.; Anklam, E. (2004). Polymerase Chain Reaction techniques for food allergen detection. *J AOAC Int.* 87: 1391-1397.
- Promega, (2009). User Manual, Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food (versão electrónica). <http://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/0/Wizard%20Magnetic%20DNA%20Purification%20System%20for%20Food%20Protocol.aspx> (acesso: 10/10/2011).

- Ramesh, S. (2008). Food Allergy Overview in Children. *Clinic Rev Aller Immunol* 34: 217-230.
- Sampson, H.A. (1999). Food Allergy. Part 1: Immunopathogenesis and Clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol* 103: 717-28.
- Sampson, H.A. (2003) Food Allergy. *J Allergy Clin Immunol* 111: S540-7.
- Sathe, S.K.; Sharma, G.M. (2009). Effects of food processing on food allergens: review. *Nutr Food Res* 53: 970-978.
- Savage, G.P.; McNeil, D.L. (1998). Chemical composition of hazelnuts (*Corylus avellana L.*) grown in New Zealand. *Int J Food Sci Nutr* 49:199-203.
- Schöringhumer, K.; Redl, G.; Cichna-Markl, M. (2009). Development and validation of a duplex real-time PCR method to simultaneously detect potentially allergenic sesame and hazelnut in food. *J Agric Food Chem* 57: 2126-2134.
- Sicherer, S.M.; Sampson, H.A. (2006). Food Allergy. *J Allergy Clin Immunol* 117: S470-5.
- Somma, M. (2006). Extraction and Purification DNA (Session 4). In *The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms*. European Commission, Joint Research Center, Institute for Health and Consumer Protection.
- Somma, M.; Querci, M. (2006a). Agarose Gel Electrophoresis (Session 5). In *The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms*. European Commission, Joint Research Center, Institute for Health and Consumer Protection.
- Somma, M.; Querci, M. (2006b). The Polymerase Chain Reaction (PCR) (Session 6). In *The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms*. European Commission, Joint Research Center, Institute for Health and Consumer Protection.
- Taylor, S. (2006). The nature of food allergy (Chapter 1). In Koppelman, S.J., Hefle, S.L. (Eds) *Detecting allergens in food*. Woodhead Publishing Limited, England.
- The World of Food Science - Modern molecular methods (PCR) in food control: GMO, Pathogens, Species Identification, Allergens.
<http://www.worldfoodscience.org/cms/?pid=1003869> (acesso: 02/06/2011).
- van Hengel, A.J. (2007). Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. *Anal Bioanal Chem* 389: 111-118.
- Vujevic, P.; Vahcic, N.; Milinovic, B.; Jelacic, T.; Kazija, D.H.; Cmelik, Z. (2010). Pomological traits and proximate chemical composition of hazelnut (*Corylus avellana L.*) varieties grown in Croatia. *African J Agric Res* 5: 2023-2029.
- Weighardt, F. (2006). Quantitative PCR for the Detection of GMOs (Session 10). In *The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms*. European Commission, Joint Research Center, Institute for Health and Consumer Protection.
- Westphal, C.D.; Pereira, M.R.; Raybourne, R.B.; Williams K. (2004). Evaluation of extraction buffers using the current approach of detecting multiple allergenic and nonallergenic proteins in food. *J AOAC Int* 87: 1458-65.

WHO/IUIS Database, 2011.

<http://www.allergen.org/search.php?allergenname=Cor+a&searchname=Search> (accesso: 20/09/2011).

Wiseman, G. (2002). State of the art and limitations of quantitative polymerase chain reaction. *J AOAC Int* 85: 792-796.

Zuidmeer, L.; Goldhahn, K.; Rona, R.J.; Gislason, D.; Madsen, C.; Summers, C.; Sodergren, E.; Dahlstrom, J.; Lindner, T.; Sigurdardottir, S.T.; McBride, D.; Keil, T. (2008). The prevalence of plant food allergies: a systematic review. *J Allergy Clin Immunol* 121: 1210-8.