



Ana Sofia Morais Hipólito
Licenciada em Análises Clínicas e Saúde Pública

Deteção e quantificação de leite pelo método ELISA no Laboratório SGS

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia
e Segurança Alimentar

Orientador: Professora Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão
Leitão, Professora Auxiliar, FCT/UNL

Co-orientador: Dr. Mauro Conde, Responsável Técnico, SGS

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes
Arguente: Doutora Marina Célia Nunes Ferreira da Costa Henriques Silva
Vogal: Prof. Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão



Setembro 2017

2017



Deteção e quantificação de leite pelo método de ELISA
Ana Hipólito

2017



Ana Sofia Morais Hipólito
Licenciada em Análises Clínicas e Saúde Pública

Deteção e quantificação de leite pelo método ELISA no Laboratório SGS

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Professora Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão, Professora Auxiliar, FCT/UNL

Co-orientador: Dr. Mauro Conde, Responsável Técnico, SGS

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes
Arguente: Doutora Marina Célia Nunes Ferreira da Costa Henriques Silva
Vogal: Prof. Doutora Ana Lúcia Monteiro Durão Leitão



Setembro 2017

“Deteção e quantificação de leite pelo método ELISA no Laboratório SGS” Copyright © 2017 de Ana Sofia Hipólito, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Gostaria de manifestar o meu sincero agradecimento a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste projeto.

Quero agradecer, em primeiro lugar, à minha família, aos meus amigos e ao meu namorado, as pessoas mais importantes da minha vida, que me apoiaram durante este percurso de uma forma incansável.

Muito obrigada pelo apoio, força e incentivo que me transmitiram ao longo da realização deste trabalho.

Em segundo lugar, uma palavra à professora e orientadora Ana Lúcia Leitão, docente da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, a quem agradeço, para além de toda a partilha de conhecimentos ao longo do meu percurso académico, a total disponibilidade e motivação prestados.

Quero também agradecer à empresa SGS Portugal, S.A. por ter disponibilizado os materiais e os equipamentos para a realização da presente dissertação, em especial ao Dr. Mauro Conde e à equipa do laboratório de química pela forma como me acolheram e pela partilha de conhecimento.

E por último, um especial agradecimento à minha amiga Sara Duarte, a pessoa que levo comigo desta etapa da minha vida e com quem partilhei tantos bons momentos nestes dois últimos anos.

Muito obrigada a todos!

Resumo

Estima-se que atualmente cerca de 1 % a 2 % da população, e até 8 % das crianças, sofram de alguma alergia alimentar com sintomas que variam de relativamente leves a graves e, por vezes, até com consequências fatais.

Muitos alimentos são popularmente conhecidos por provocarem alergia alimentar, como sejam o amendoim, as nozes, o trigo, a soja, o leite, o ovo, o peixe e o marisco. Estes alimentos são responsáveis por causar a maioria das reações alérgicas (> 90 %).

Como tal, a população está cada vez mais preocupada com a sua saúde e qualidade de vida, bem como em mudar alguns dos seus hábitos alimentares.

É reconhecido que a alergia alimentar se tornou um relevante problema de saúde, especialmente nos países industrializados. Nos últimos anos, a sensibilização para a gestão de alergénios aumentou entre os operadores da cadeia alimentar pois, uma vez que uma pequena quantidade de alimentos alergénicos pode desencadear uma reação alérgica, é essencial a informação detalhada em rótulos de produtos alimentares para pessoas que sofrem de alergia alimentar.

Um ponto-chave para reduzir o risco de contaminação não controlada é verificar que o produto se encontra isento de alergénios através de ensaios laboratoriais de resposta rápida e baixo custo. Deste modo, este trabalho foca-se na implementação da deteção e quantificação de leite em alimentos pelo método *Enzyme-Linked Immunosorbent Assays* (ELISA), na empresa SGS Portugal, S.A.

A implementação do método teve como base as *Guidelines for Method Validation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays applied to Food Samples*.

Com base nos resultados obtidos e no cumprimento dos parâmetros indicados nos procedimentos de validação de métodos imunoenzimáticos, foi possível a sua implementação na empresa SGS Portugal, S.A.

Palavra-Chave: Alergénios, Leite, ELISA, caseína, β -Lactoglobulina

Abstract

It is estimated that about 1 % to 2 % of the population, and up to 8 % of children, suffer from food allergies with symptoms ranging from light to severe, or in some cases, even fatal. Many foods are known to cause food allergies, including peanuts, nuts, wheat, soy, milk, eggs, fish and shellfish, which are responsible for causing the majority (> 90 %) of allergic reactions. Therefore, the population is increasingly concerned about their health and quality of life, as well as on changing some of their eating habits. It is recognized that food allergy has become a major health problem, especially in industrialized countries. In recent years, awareness of allergen management has increased among food chain operators. Since a small amount of allergenic food can trigger an allergic reaction, food labels are essential to inform consumers who suffer from food allergies. A key point to reduce the risk of uncontrolled contamination is to verify that the product is allergen-free through a rapid response and low cost laboratory testing. Therefore, this work focuses on the implementation of the detection and quantification of milk in foods by the Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA) method, in the company SGS Portugal, S.A. The implementation of the method was based on Guidelines for Method Validation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays applied to Food Samples. Based on the results obtained and the compliance with the parameters indicated in the procedures for the validation of immunoenzymatic methods, it was possible to implement this method in SGS Portugal, S.A.

Key Words: Allergens, Milk, ELISA, Casein, β -Lactoglobulin

Índice de matérias

1	Introdução.....	1
1.1	Enquadramento e objetivo.....	1
1.2	Estrutura	2
2	Caracterização da empresa	3
2.1	Société Générale de Surveillance - SGS	3
2.2	SGS em Portugal.....	4
3	Alergia Alimentar	7
3.1	Contexto histórico	7
3.2	Alergia Alimentar vs Intolerância Alimentar.....	9
3.3	Sintomas.....	12
3.4	Epidemiologia	12
3.4.1	Fatores de risco	13
3.5	Legislação.....	14
4	Leite.....	17
4.1	Composição dos alergénios do leite	18
4.1.1	Caseínas.....	18
4.1.2	Proteínas de soro do leite.....	20
4.2	Alergia ao leite	22
4.3	Mecanismos imunológicos da Alergia ao leite	22
4.4	Efeito do processamento térmico e não térmico	23
4.4.1	Efeito de tratamentos térmicos.....	24
4.4.2	Aplicações não térmicas.....	24
5	Métodos para a determinação de Alergénios em Alimentos.....	27
5.1	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA)</i>	28
5.2	Dispositivo de Fluxo Lateral	29
5.3	<i>Immunoblotting</i>	30
5.4	Biossensores	31
5.5	Espectrometria de massa.....	32
5.6	Métodos baseados em DNA.....	33
5.6.1	PCR-ELISA.....	33

5.6.2	Real-time PCR.....	33
6	Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA)	35
6.1	Conceitos básicos	35
6.1.1	Ensaio competitivo.....	35
6.1.2	Ensaio direto.....	36
6.1.3	Ensaio indireto	37
6.1.4	Ensaio sandwich.....	37
7	Validação do método	39
7.1	Determinação da Curva de Calibração	39
7.1.1	Gama de trabalho.....	39
7.1.2	Linearidade	39
7.2	Determinação do limite de deteção e limite de quantificação	40
7.2.1	Limite de deteção	40
7.2.2	Limite de quantificação.....	41
7.3	Precisão.....	41
7.3.1	Repetibilidade	41
7.3.2	Precisão intermédia.....	42
7.4	Exatidão.....	42
7.5	Fontes de incerteza	42
8	Metodologia Experimental	45
8.1	Equipamentos.....	45
8.2	Reagentes e Preparação de soluções	48
8.2.1	Reagentes	48
8.2.2	Preparação de reagentes	50
8.2.3	Preparação da amostra	51
8.2.4	Análise - Ensaio imunoenzimático.....	51
8.2.5	Interpretação de resultados.....	52
8.3	Controlo dos parâmetros	52
9	Resultados e discussão.....	55
10	Conclusão.....	63
	Bibliografia	65
	ANEXO I.....	74

Índice de figuras

Figura 2.1 - Logotipo da empresa	4
Figura 2.2 - Sede da SGS em Lisboa, reunindo todos os serviços da Grande Lisboa	5
Figura 3.1 - Admissões de anafilaxia hospitalar induzida na Austrália por faixa etária de 1994 a 2005 (adaptado de Sampson, 2016).....	8
Figura 3.2 - Reações adversas a alimentos segundo a classificação de EAACI	10
Figura 3.3 - Mecanismo de reação alérgica mediada por IgE – Alergénio provoca uma sensibilização que resulta a produção de anticorpos IgE específicos de alérgenos que, em seguida, se ligam aos recetores nos mastócitos e basófilos. Após a exposição subsequente há libertação de mediadores químicos (adaptado de Taylor & Hefle, 2001).....	11
Figura 4.1 - Ilustração do modelo de micela (adaptado de Kruif <i>et al.</i> , 2012)	19
Figura 5.1 - Componentes presentes no Kit de ELISA	28
Figura 5.2 - Esquema representativo de um ensaio de dispositivo fluxo lateral baseado no formato sandwich (adaptado de Schubert-Ullrich <i>et al.</i> , 2009)	29
Figura 5.3 - As proteínas são separadas de acordo com a sua massa molecular (8 a 200 kDa) pelo método Immunoblotting (adaptado de Poms <i>et al.</i> , 2004)	31
Figura 6.1 - Ensaio competitivo: A- Anticorpo na base do poço; B -Antigénio na base do poço (adaptado de Popping <i>et al.</i> , 2010)	36
Figura 6.2 - Tipos de ELISA (adaptado de Cultek. 2017)	37
Figura 8.1 - Leitor ótico r-bioharpm	46
Figura 8.2 - Balança METTLER TOLEDO Modelo MS204S/01.....	46
Figura 8.3 - Micropipetas Transferpette ®: multil-canal (esquerda), 100-1000 µL (centro) e 10 a 100 µL (direita).....	47
Figura 8.4 - Agitador Heidolph	47
Figura 8.5 - Centrífuga Universal 320R.....	47
Figura 8.6 - Picadora 1-2-3 utilizada no laboratório SGS	48
Figura 8.7 - Multistirrer magnetic stirrer	48
Figura 8.8 - Kit RIDASCREEN®FAST MILK.....	49
Figura 9.1 - Curva de Calibração do 1º Ensaio.....	57
Figura 9.2 - Curva de Calibração do 2º Ensaio.....	57
Figura 9.3 - Curva de Calibração do 3º Ensaio.....	57

Índice de tabelas

Tabela 3.1 - Substâncias ou produtos que provocam alergias ou intolerâncias (adaptado do Regulamento EU 1169/2011)	14
Tabela 4.1 - Alergénios do Leite – Caseínas (adaptado Hochwallner <i>et al.</i> , 2014).....	20
Tabela 4.2 - Alergénios do Leite – Proteínas de soro (adaptado Hochwallner <i>et al.</i> , 2014)	21
Tabela 5.1 - Métodos de deteção (adaptado de Holck <i>et al.</i> , 2011)	27
Tabela 7.1 - Fontes de incerteza e a sua resolução	43
Tabela 9.1 - Absorvâncias lidas do respetivo padrão e cálculo da concentração real dos três ensaios distintos.....	56
Tabela 9.2 - Absorvância do Branco	58
Tabela 9.3 - Repetibilidade através do cálculo da Concentração Real para cada amostra	59
Tabela 9.4 - Reprodutibilidade através do cálculo da Concentração Real para cada amostra	60

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

A-AEP, Tampão de extração de alergénio contendo o aditivo 1

ACP, Plano de controlo de alergénios

CO₂, Fórmula química de dióxido de carbono

aC, Antes de Cristo

DNA, Ácido desoxirribonucleico

DPH, Difenidramina

EAACI, *European Academy of Allergy and Clinical Immunology*

ELISA, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assays* ou Ensaio imunoenzimático

FcεRI, Recetores específicos de alta afinidade

H₂, Hidrogénio

H₂O, Água

HCl, Ácido clorídrico

HCCP, Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo

IgE, Imunoglobulina E

IgG, Imunoglobulina G

LFD, Dispositivo de Fluxo Lateral

LOD, Limite de deteção

LOQ, Limite de quantificação

NaOH, Hidróxido de sódio

PCR, Reação em cadeia da polimerase

Real-time PCR, Reação em cadeia da polimerase em tempo real

REA, Absorção por ressonância

SDS, Dodecil sulfato de sódio

SGS, Société Générale de Surveillance

SM, Espectrometria de massa

SPR, Ressonância plasmática de superfície

Th₂, Linfócitos T-helper subtipo 2

UHT, Temperatura ultraelevada

1 Introdução

1.1 Enquadramento e objetivo

Uma percentagem da população (1 a 3 % dos adultos e 4 a 6 % das crianças) sofre de consequências adversas para a saúde como resultado do consumo de alimentos ou ingredientes alimentares específicos. Tais respostas hipersensíveis podem manifestar-se de diversas maneiras e podem ser amplamente categorizadas como alergias alimentares ou intolerâncias alimentares. A alergia alimentar clássica resulta numa resposta imunológica que é mediada por anticorpos (Imunoglobulina E). A Intolerância alimentar é mais difícil de caracterizar, uma vez que pode ser causada por componentes alimentares não proteicos (lactose, por exemplo), ao contrário das alergias verdadeiras que são, geralmente, o resultado de uma reação a um ou mais componentes de proteínas individuais (*European Food Safety Authority*, 2014).

Nos últimos anos, a sensibilização para a gestão de alérgenos aumentou entre os operadores da cadeia alimentar, pois dado que uma pequena quantidade de alérgeno pode desencadear uma reação alérgica, é de grande relevância a existência de informação em rótulos de produtos alimentares de modo a prevenir reações alérgicas (Galan-Malo *et al.*, 2017).

Existem várias técnicas para a deteção de alérgenos, sendo estas agrupadas de acordo com o alvo que reconhecem. Os ensaios à base de proteínas incluem *Enzyme-Linked Immunosorbent Assays* (ELISA), Dispositivo de Fluxo Lateral (LFD), *Immunoblotting*, Biossensores e espectrometria de massa (SM) e geralmente detetam proteínas alérgicas, enquanto os métodos baseados em DNA (ácido desoxirribonucleico), como PCR (reação em cadeia polimerase) e PCR em tempo real, detetam DNA específico para um componente alérgico (Holck *et al.*, 2011).

Com base nas necessidades de identificação de alérgenos em alimentos e devido à elevada procura por parte de clientes e consumidores, o objetivo do presente estudo foi implementar o método de ELISA para deteção e quantificação de Leite, através do kit comercial RIDASCREEN®FAST MILK validado pelo fornecedor.

1.2 Estrutura

No capítulo 1 é feito um enquadramento inicial do trabalho e é apresentado o objetivo e a estrutura do mesmo.

O capítulo 2 é destinado a uma descrição breve da empresa em que foi desenvolvida a componente prática da tese: nele é feita a caracterização da empresa, são indicados os setores em que esta atua e a sua história.

O capítulo 3 elucida os conceitos acerca do tema alergia alimentar, evidenciando a importância da identificação de alérgenos em alimentos e a sua importância para a rotulagem que é legalmente obrigatória.

O capítulo 4 foca-se no alérgeno leite, na sua composição e no desenvolvimento de uma alergia alimentar. Neste capítulo é ainda abordado como o efeito do processamento afeta a proteína do leite.

No capítulo 5 são apresentados os métodos de determinação de alérgenos, bem como as suas vantagens e desvantagens.

O método ELISA, aplicado no presente trabalho, é explicado no capítulo 6.

No capítulo 7 são referidos os parâmetros mínimos necessários que devem ser avaliados para se poder realizar o processo de validação de um método analítico.

No capítulo 8 estão apresentados os resultados obtidos com uma breve discussão.

O capítulo 9 corresponde, finalmente, à conclusão do trabalho.

2 Caracterização da empresa

2.1 Société Générale de Surveillance - SGS

A Société Générale de Surveillance - SGS, foi fundada em 1878 na cidade de Rouen, em França, por Henri Goldst ck depois de este verificar que os exportadores de cereais a granel estavam continuamente a perder dinheiro por não estarem a ser devidamente representados no porto de destino, dado que os importadores pagavam apenas a quantidade de grãos recebidos e não o que foi enviado. Deste modo, Henri Goldst ck sentiu a necessidade de um representante para os exportadores de grãos, para verifica o da quantidade e qualidade dos grãos na chegada ao porto. Formou uma parceria com Johann A. Hainze, para realizar inspe oes em navios que carregassem grãos e assim nasceu a Goldst ck e Hainze & Ca, mais tarde Société Générale de Surveillance (SGS, 2016).

A empresa que começou com a inspe o de um único carregamento de grão da Rússia para França tinha crescido de forma exponencial. Em 1913, a empresa já inspecionava cerca de 21 milhões de toneladas de grão por ano, numa rede de 45 escritórios na Europa, tornando-se líder no negócio de inspe o de grão (SGS, 2016).

Em 1915, a empresa mudou a sua sede de Paris para Genebra, na Su a e a 19 de Julho de 1919, deu mais um passo na sua reconstru o e adotou o nome que ostenta hoje: Société Générale de Surveillance (SGS, 2016).

A partir de 1939 a empresa expandiu-se para os países da América do Sul e dedicou-se   inspe o e análise de matérias-primas, minerais e metais através da aquisi o de laboratórios na Europa. No entanto,   na década de 70 que ocorre uma grande amplia o das atividades que atualmente a SGS desenvolve (SGS, 2016).

Presentemente, a SGS está em mais de 140 países, possui cerca de 850 escritórios, 340 laboratórios e conta com a colabora o de 50.000 pessoas oferecendo um leque de serviços que se divide em quatro grandes grupos (SGS, 2017):

- Serviços de Inspe o - inspe o e verifica o da quantidade e qualidade de produtos agrícolas, minerais, petrolíferos e petroquímicos, bens de consumo e equipamentos.
- Serviços de Análise - realiza o do controlo de qualidade de produtos alimentares ou não alimentares, avaliando a sua conformidade com requisitos legais aplicáveis.
- Serviços de Certifica o – certifica o de sistemas de gestão, produtos ou serviços de acordo com os referenciais normativos aplicáveis.

- Outros Serviços - serviços de formação, serviços de recrutamento de técnicos especializados, serviços de logística, serviços de consultoria técnica na área da qualidade, ambiente, segurança alimentar, serviços de peritagem e averiguação destinados ao setor segurador.

O alicerce de toda a estrutura são as pessoas que integram o Grupo SGS. Todos os colaboradores são um referencial técnico e ético.



Figura 2.1 - Logotipo da empresa

2.2 SGS em Portugal

A SGS Portugal, S.A. foi fundada em 1922 pelo grupo SGS, tendo sido determinado que esta afiliada desenvolvesse a sua atividade pelos mesmos princípios estratégicos geradores da ação do próprio grupo: a Independência, a Integridade, a Confidencialidade e a Inovação (SGS, 2017).

Inicialmente, a SGS Portugal dedicava-se apenas ao controlo de operações de carga e descarga de granéis de cereais. Gradualmente foi alargando a sua atividade a outros sectores, respondendo às exigências e necessidades do mercado (SGS, 2017).

Atualmente, a SGS Portugal possui laboratórios acreditados nas áreas Agroalimentar, Detergentes, Produtos de Higiene, Cosméticos, Dispositivos Médicos, Ensaio Não Destrutivos, Ambiental e Segurança Ocupacional, assegurando que os seus produtos cumprem os padrões internacionais e garantindo assim a segurança do consumidor (SGS, 2017).



Figura 2.2 - Sede da SGS em Lisboa, reunindo todos os serviços da Grande Lisboa

O laboratório de Ensaios Físico-Químicos, Microbiológicos e Amostragem da SGS Portugal, localizado no Pólo Tecnológico de Lisboa, é um dos mais modernos laboratórios do país, acreditado desde 1992 de acordo com a norma NP EN ISO/IEC 17025, tendo o mérito de ter sido um dos primeiros laboratórios privados em Portugal acreditado nesta área (SGS, 2017).

A sua capacidade reconhecida em diversas áreas de atuação, compreende (SGS, 2017):

- Laboratório de análises microbiológicas para produtos alimentares, águas, ambiente, detergentes, produtos de higiene e cosméticos (DPH, Difenidramina) e dispositivos médicos;
- Laboratório de ensaios físico-químicos com competência para análises a produtos alimentares e águas, estando equipado para dar resposta de forma automática a cerca de 80 % das suas análises de rotina;
- Laboratório de ensaios físico-químicos para análises a DPH;
- Rede de técnicos especializados para a recolha e transporte de amostras em Portugal Continental e Ilhas, estando a amostragem incluída no âmbito da acreditação;
- Área especializada em apreciação técnica de rotulagem e apoio no cumprimento da legislação em vigor.

A realização da implementação do método de deteção e quantificação de leite pelo método ELISA decorreu no Laboratório de Química da SGS Portugal, em Lisboa. Para tal foram utilizados equipamentos, materiais e reagentes cedidos pela empresa.

3 Alergia Alimentar

3.1 Contexto histórico

O primeiro relato sobre a alergia alimentar é geralmente atribuído a Hipócrates, sendo que, no entanto, foram os imperadores chineses Shen Nong (~ 2735 aC) e Huang Di (2698-2598 aC) os primeiros a aconselhar que indivíduos com lesões cutâneas deviam evitar certos alimentos. Nos escritos de Hipócrates, datados entre 460 e 377 aC, a presença de *humores hostis* (atualmente conhecidos como anticorpos Imunoglobulina E- IgE) em alguns indivíduos era observada após a ingestão de queijo. A citação de Tito Lucrécio Cato, entre 98 e 55 aC, de que "O que é alimento para um, para outro é veneno de classe" sugere fortemente a existência de uma compreensão das reações adversas aos alimentos desde há mais de 2000 anos (Cohen, 2008).

No século XVII, os relatos de casos de reações de hipersensibilidade aos alimentos começaram a aparecer na literatura médica. Jean Baptiste Van Helmont publicou em 1662 ataques asmáticos após a ingestão de peixes em Oriatrike. Entre 1798 e 1808, Robert Willan descreveu sintomas de urticária após a ingestão de amêndoas, cogumelos, peixes, caranguejos, lagostas e mexilhões, e urticária febrilis (anafilaxia fatal) após a ingestão de mexilhões e lagostas (Sampson, 2016). Não obstante vários relatos de reações aos alimentos aparecessem periodicamente na literatura médica, foi apenas em 1921 que Prausnitz iniciou uma investigação científica sobre a alergia alimentar e estabeleceu a base imunológica das reações alérgicas (Sampson, 2016).

No início dos anos 80, a alergia alimentar ainda não era abordada como um problema de saúde pública. A maioria dos médicos eram céticos ao diagnóstico e os estudos eram escassos, principalmente porque muitos não consideravam a área como uma ciência (Sampson, 2016).

Há 35 anos atrás, a prevalência estabelecida de alergia alimentar nos Estados Unidos era semelhante ao que é relatado hoje, ou seja, cerca de 13 %. Embora fosse espectável que actualmente fosse inferior a 1 %, dados recentes revelam a sua prevalência entre 3,5 % e 5 % da população geral e de 8 % da população pediátrica (Sampson, 2016). As reações alérgicas graves aos alimentos eram raras há 35 anos, mas agora representam a principal causa de anafilaxia tratada nos serviços de emergência dos EUA. Os dados dos EUA e da Austrália (figura 3.1) indicam que houve um aumento acentuado nas hospitalizações devido à alergia alimentar. A razão para este rápido aumento da alergia alimentar diagnosticada entre os países industrializados permanece uma questão em aberto (Sampson, 2016).

As características dos transtornos alérgicos alimentares e dos sintomas alérgicos aos alimentos foram sendo definidos de uma forma mais precisa, melhorando o diagnóstico e facilitando o registo dos casos clínicos (Sampson, 2016).

Nos últimos 35 anos assistimos a mudanças notáveis na nossa compreensão básica dos distúrbios alérgicos alimentares devido à compilação de numerosos relatos anteriormente desconsiderados por pesquisadores e clínicos, elevando a alergia alimentar a uma ciência com centenas de artigos publicados anualmente em revistas científicas de elevado prestígio. Hoje, os distúrbios alérgicos alimentares mediados por IgE e não IgE estão bem caracterizados e os esforços para tratar estas alergias através de várias estratégias imuno-terapêuticas estão bem encaminhados (Sampson, 2016)

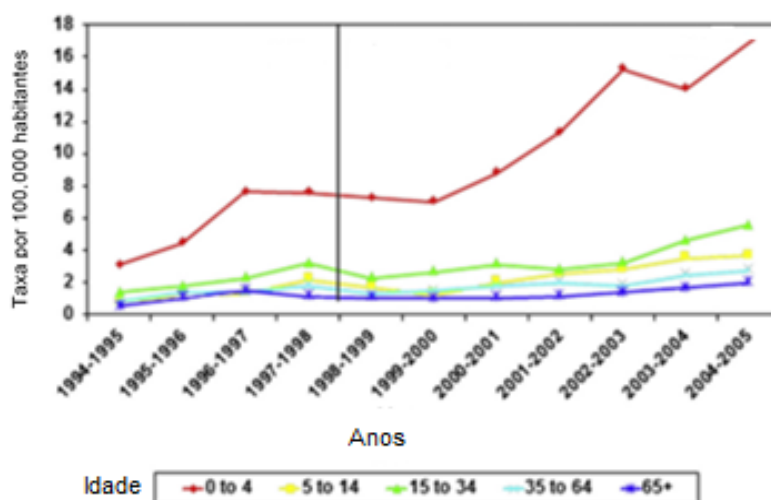


Figura 3.1 - Admissões de anafilaxia hospitalar induzida na Austrália por faixa etária de 1994 a 2005 (adaptado de Sampson, 2016)

3.2 Alergia Alimentar vs Intolerância Alimentar

Os mecanismos que estão na base das alergias alimentares, assim como das restantes doenças alérgicas, são de extrema complexidade. Acredita-se que as alergias alimentares resultam quer da falha de indução de tolerância, quer da perda da tolerância oral a determinado alimento. A tolerância oral é um estado de ausência de resposta imunológica induzida por administração oral de um antigénio inócuo, como por exemplo as proteínas alimentares (Ortolani & Pastorello, 2006).

O desenvolvimento de alergia alimentar está associado a uma resposta Th2 (Linfócitos T-helper subtipo 2) inapropriada, traduzida num aumento no número de células Th2, relacionada com um aumento da produção de Imunoglobulina E específica a alérgenos de alimentos. A pele e o intestino são os locais através dos quais pode ocorrer diretamente sensibilização a determinado alimento e, por si só, podem fornecer uma importante informação acerca do decurso da alergia. O intestino, com a sua extensa mucosa, assume um papel central no equilíbrio imunológico do organismo. A sua função imunitária assenta numa resposta de tolerância a proteínas não patogénicas (Paidassi, 2017).

Certos mecanismos conduzem à privação do desenvolvimento da tolerância, tais como: a apoptose de células T específicas de antigénio, com conseqüente perda da sua função imunológica específica; a paralisia das células T que pode ocorrer se a apresentação do antigénio das células epiteliais intestinais (que funcionam como células apresentadoras de antigénio) está incompleta devido à falta de moléculas co-estimuladoras; e o defeito na produção das células T reguladoras. O desenvolvimento dessas células é estimulado por fatores externos como a flora bacteriana normal após o nascimento (Ortolani & Pastorello, 2006).

Em 1995, a Academia Europeia de Alergia e Imunologia Clínica (EAACI) estabeleceu uma classificação simples e fácil de aplicar às reações adversas aos alimentos com base no mecanismo patogénico. A primeira distinção é feita entre as reações adversas tóxicas e não tóxicas a alimentos (figura 3.2) (Dabrowski & Sikorski, 2004).

Reações tóxicas resultam de um efeito prejudicial que o alimento tem sobre todos os indivíduos que o consomem, como por exemplo, as toxinas. As toxinas podem estar naturalmente presentes nos alimentos, induzidas pelo processamento de alimentos ou incorporadas nos mesmos como contaminantes ou aditivos. Os alimentos modernos contêm pequenas quantidades de toxinas e uma dieta variada evita a sua acumulação. Por sua vez, as reações não tóxicas são aquelas que ocorrem na presença de alimentos que não são tolerados por alguns indivíduos. Estas podem dar origem à denominada alergia alimentar (reação imunológica) e intolerância alimentar (reação não imunológica) (Ortolani & Pastorello, 2006).

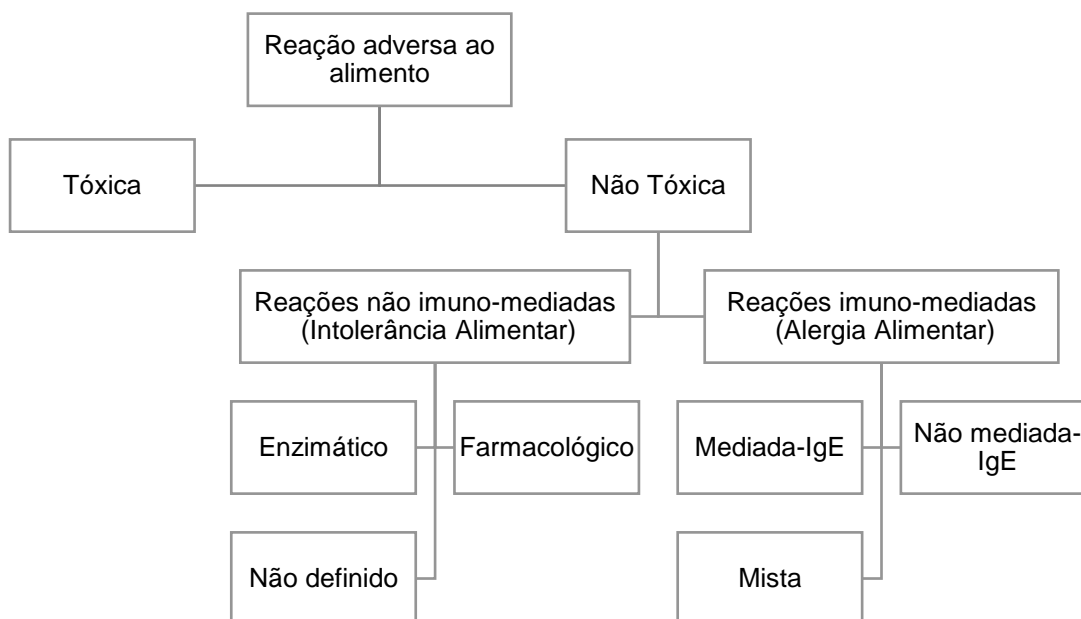


Figura 3.2 - Reações adversas a alimentos segundo a classificação de EAACI

A EAACI caracteriza a alergia alimentar da seguinte forma: “Propomos que uma reação adversa aos alimentos deve ser chamada de hipersensibilidade alimentar. Quando os mecanismos imunológicos são evidenciados o termo apropriado é alergia alimentar e se o papel da IgE é destacado, o termo é alergia alimentar mediada por IgE. Todas as outras reações, anteriormente referidas como "intolerância alimentar", devem ser referidas como hipersensibilidade alimentar não alérgica. Reações alérgicas severas, generalizadas aos alimentos, podem ser classificadas como anafilaxia.” (Dabrowski & Sikorski, 2004).

A alergia alimentar é definida como uma condição desencadeada por uma resposta imunológica específica adquirida a um antígeno inofensivo. Um antígeno é qualquer substância que faz com que o sistema imunológico produza anticorpos contra ele. Um antígeno neste tipo de reação de hipersensibilidade é chamado de alérgeno (Rance *et al.*, 2015).

A alergia alimentar pode ser dividida de acordo com a reação: mediada por IgE, não mediada por IgE ou mista (Vicker *et al.*, 2011). A reação mediada por IgE constitui a maioria das reações alérgicas aos alimentos. A IgE está ligada a recetores específicos de alta afinidade (FcεRI) presentes nos mastócitos, células fixas presentes na mucosa, pele e basófilos circulantes no sangue. Quando as proteínas alergénicas são absorvidas no intestino, entram em contacto com IgE específicas ligadas a mastócitos / basófilos desencadeando a libertação de mediadores, por exemplo histamina, provocando uma resposta imunológica (figura 3.3) (Cianferoni & Spergel, 2009; Ortolani & Pastorello, 2006). A resposta ocorre em apenas alguns minutos ou poucas horas depois da exposição ao alérgeno (Nunes *et al.*, 2012). As alergias alimentares mediadas por não-IgE representam a minoria das reações imunológicas aos alimentos (Cianferoni & Spergel, 2009). As reações não mediadas por IgE não possuem a

participação dos anticorpos IgE, mas sim das células T e das imunoglobulinas do tipo G (IgG), afetando principalmente a mucosa gastrointestinal e sendo raramente fatais. Nestas reações, diferente das mediadas por IgE, os sintomas aparecem somente depois de 24 a 48 horas após a exposição ao alergénio (Nowak-we, 2015; Nunes *et al.*, 2012; Ortolani & Pastorello, 2006). Relativamente à alergia alimentar mista é mediada tanto por células como por IgE (Cianferoni & Spergel, 2009).

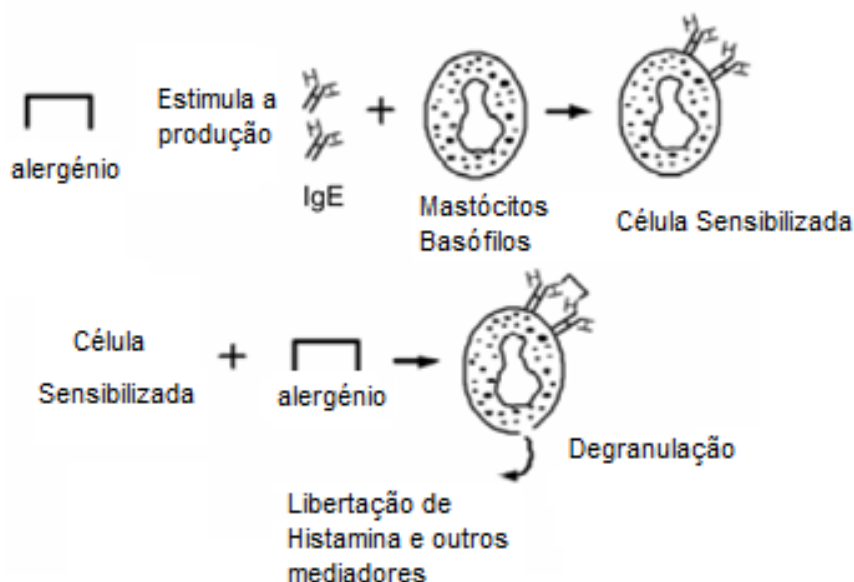


Figura 3.3 - Mecanismo de reação alérgica mediada por IgE – Alergénio provoca uma sensibilização que resulta a produção de anticorpos IgE específicos de alergénios que, em seguida, se ligam aos recetores nos mastócitos e basófilos. Após a exposição subsequente há libertação de mediadores químicos (adaptado de Taylor & Hefle, 2001)

A intolerância alimentar pode ser devida tanto à ausência ou insuficiência da enzima como ao efeito de substâncias farmacológicas. As reações não classificáveis em qualquer mecanismo conhecido são referidas como intolerância alimentar indefinida (Ortolani & Pastorello, 2006). A intolerância alimentar enzimática é uma reação alimentar adversa resultante de defeitos enzimáticos do trato gastrointestinal. Os sintomas manifestam-se no trato gastrointestinal após a ingestão de certos alimentos. Um exemplo deste tipo de intolerância, e a mais comum, é a intolerância à lactose. No intestino delgado, a β -galactosidase facilita a hidrólise da lactose nos dois monossacáridos que são então absorvidos. Na deficiência de β -galactosidase a lactose não pode ser completamente hidrolisada e as moléculas atingem o cólon onde são degradadas por bactérias em H_2O , CO_2 e H_2 . A fermentação no cólon provoca distúrbios como inchaço, dor abdominal e, por vezes, diarreia (Ortolani & Pastorello, 2006).

A intolerância alimentar farmacológica é causada por amins vasoativas (por exemplo, dopamina, histamina, norepinefrina, feniletilamina, serotonina e tiramina) e outras substâncias presentes nos alimentos. Na maioria dos casos, há uma relação dose-efeito. As de mecanismo indefinido, como no

caso de aditivos como sulfito e glutamato monossódico, são intolerâncias alimentares cujo mecanismo de ação ainda não é conhecido (Ortolani & Pastorello, 2006).

É bem reconhecido que a alergia alimentar se tornou um problema relevante a nível mundial, especialmente nos países industrializados. Estima-se que cerca de 1 % a 2 % da população, e até 8 % das crianças, sofram de alguma alergia alimentar. Muitos alimentos podem causar uma reação alérgica alimentar, como é o exemplo dos amendoins, das nozes, do trigo, da soja, do leite, do ovo, do peixe e do marisco, que são responsáveis por causar a maioria das reações alérgicas (> 90 %) (Sicherer & Sampson, 2014; Surojanametakul *et al.*, 2012).

3.3 Sintomas

A alergia alimentar pode manifestar-se clinicamente de forma moderada a grave, podendo mesmo, em alguns casos, ser fatal. Os sintomas podem surgir rapidamente (reação imediata), entre alguns minutos até duas horas após a ingestão do alergénio, e incluem manifestações cutâneas (erupções cutâneas, eczema, urticária), gastrointestinais (vómitos, dores abdominais, diarreia) e respiratórias (pieira, dificuldade respiratória, edema da glote e da língua, sensação de formigueiro na boca, diminuição da pressão arterial, perda de consciência) (Nunes *et al.*, 2012; Plaza-Martin, 2016).

A anafilaxia ou choque anafilático é uma reação que envolve mais do que um órgão, tratando-se de uma manifestação muito grave, com múltiplos sinais e sintomas, onde se incluem os cardiovasculares (Nunes *et al.*, 2012).

3.4 Epidemiologia

A determinação da prevalência de alergia alimentar é influenciada por diversos fatores, tais como populações de estudo, metodologias, variação geográfica, idades e exposições dietéticas. No entanto, é sabido que a alergia alimentar afeta mais de 1 % a 2 %, mas menos de 10 % da população, não estando, contudo, claro se a prevalência está a aumentar (Sicherer & Sampson, 2014).

Segundo o estudo desenvolvido por Gupta *et al.*, (2013) através de uma pesquisa eletrónica nos Estados Unidos entre 2009 e 2010, estimou-se que 8 % das crianças tinham alergia alimentar, 2,4 % tinham alergias alimentares a diversos produtos e aproximadamente 3 % desenvolveram reações graves.

No estudo de Soller *et al.*, (2012) verificou-se num grupo de 9667 indivíduos de 10 regiões diferentes do Canadá que 7,1 % das crianças e 6,6 % dos adultos tinham tido episódios de alergia alimentar. O leite de vaca (2,2 %), amendoim (1,8 %) e nozes (1,7 %) foram os alergénios mais comuns nas crianças, sendo que marisco (1,9 %), frutas (1,6 %) e vegetais (1,3 %) foram os mais comuns em adultos.

De acordo com os dados da *Health Interview Survey*, nos EUA crianças entre 0 e 17 anos, a prevalência de alergias alimentares aumentou de 3,4 % entre 1997 a 1999 para 5,1 % no período de 2009 a 2011 (Sicherer & Sampson, 2014).

Segundo EAACI mais de 17 milhões de pessoas sofrem de alergia alimentar na Europa, e uma em cada quatro crianças europeias em idade escolar vive com problemas alérgicos. Além disto, as reações alérgicas graves potencialmente fatais (anafilaxia) provocadas por alergia alimentar estão a crescer na população mais jovem. Apesar de consideravelmente subdiagnosticada, os dados epidemiológicos mostram uma incidência de anafilaxia na Europa entre 1,5 a 8 por 100,000 pessoas/ano, com um aumento dos casos de anafilaxia nos últimos 20 anos. A prevalência de anafilaxia na Europa está estimada em 0,3 % e considera-se que a sua morbilidade está subestimada (Panesar *et al.*, 2013).

3.4.1 Fatores de risco

Nos últimos anos, o pressuposto de que a exposição precoce ao alergénio infantil era um fator de risco para alergia alimentar tem vindo a mudar, ou seja, a prevenção prolongada de alergénios poderia ser um fator de risco porque a indução da tolerância oral seria ignorada (Sicherer & Sampson, 2014). Um estudo recente mostrou que as crianças israelenses, que consomem frequentemente amendoins antes do primeiro ano de idade, apresentam uma prevalência 10 vezes menor de alergia, em comparação com crianças nos Estados Unidos e Reino Unido que raramente consomem este alimento antes dos doze meses de idade (Cianferoni & Spergel, 2009).

Existe uma infinidade de fatores de risco que influenciam a reação alérgica ou sensibilização, tais como o género (rapazes parecem estar em maior risco do que as raparigas e as mulheres mais que os homens), a raça/etnia (maior entre crianças asiáticas e de ascendência africana em comparação com crianças caucasianas), a genética (associações familiares, *human leukocyte antigen*¹ e genes específicos), a atopia² (dermatite atópica, asma, rinite alérgica), o nível dietético (consumo reduzido de ácidos gordos e antioxidantes), o aumento do uso de antiácidos (redução da digestão de alergénios), a obesidade (devido ao estado inflamatório) e o momento e via de exposição aos alimentos (risco aumentado de retardamento de alergénios). Alguns destes fatores podem proporcionar oportunidades de prevenção ou tratamento (Boyce *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2006; Sicherer *et al.*, 2004; Untersmayr & Jensen-jarolim, 2010).

¹ Antígeno leucocitário humano (*Human leukocyte antigen*) - Complexo genético que codifica o complexo principal de histocompatibilidade

² Conceito que descreve uma tendência familiar para produzir anticorpos da classe IgE contra alergénios ambientais, geralmente proteínas.

3.5 Legislação

Quantidades muito pequenas de um alergénio permitem desencadear uma reação alérgica, pelo que se torna necessário evitar a ingestão ou exposição aos alergénios (Steve L. Taylor *et al.*, 2014). Para proteger os consumidores contra os efeitos nocivos dos alergénios alimentares, as autoridades europeias estabeleceram um quadro legislativo para garantir que os consumidores sejam adequadamente informados sobre os ingredientes dos alimentos que consomem. Entre outras indicações, os rótulos dos alimentos devem incluir informações sobre a presença de ingredientes alimentares com propriedades alérgicas. Neste contexto, é obrigatória a inclusão de qualquer um dos 14 alergénios, apresentados na tabela 3.1, que se encontram na lista regulamentar (Regulamento EU1169/2011).

Tabela 3.1 - Substâncias ou produtos que provocam alergias ou intolerâncias (adaptado do Regulamento EU 1169/2011)

1. Cereais que contêm glúten e produtos à base destes cereais;
2. Crustáceos e produtos à base de crustáceos;
3. Ovos e produtos à base de ovos;
5. Amendoins e produtos à base de amendoins;
6. Soja e produtos à base de soja;
7. Leite e produtos à base de leite (incluindo lactose);
8. Frutos de casca rija, nomeadamente, amêndoas, avelãs, nozes, castanhas de caju, nozes pistácios, nozes de macadâmia e produtos à base destes frutos;
9. Aipo e produtos à base de aipo;
10. Mostarda e produtos à base de mostarda;
11. Sementes de sésamo e produtos à base de sementes de sésamo;
12. Dióxido de enxofre e sulfitos em concentrações superiores a 10 mg/kg ou 10 mg/l em termos de SO ₂ total que deve ser calculado para os produtos propostos como prontos para consumo ou como reconstituídos, de acordo com as instruções dos fabricantes;
13. Tremoço e produtos à base de tremoço;
14. Moluscos e produtos à base de moluscos.

A fim de assegurar a rotulagem exata do teor de alergénios, a indústria alimentar, a distribuição e a restauração devem implementar um plano de controlo de alergénios (ACP) dentro do seu Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo (HACCP). Dois dos componentes de ACPs são a prevenção da contaminação cruzada durante as operações de processamento e o uso de

procedimentos de limpeza validados para equipamentos (Jackson *et al.*, 2008). Esta contaminação por vezes é devida a resíduos alimentares de natureza proteica que permanecem em superfícies de manuseamento após o processo de limpeza (Jackson *et al.*, 2008; Sakiyama *et al.*, 2013).

Uma vez que estes alergénios "ocultos" podem não ser controlados através de uma inspeção visual, é muito difícil evitar a sua presença nos produtos finais. Por conseguinte, a eficácia do processo de limpeza deve ser avaliada após cada lote fabricado, utilizando-se métodos apropriados e validados. Para proteger os consumidores contra a presença de alergénios, os fabricantes devem rotular os seus produtos com a declaração de alergénio "pode conter vestígios" ou "contém" (Schubert-Ullrich *et al.*, 2009). Por esta razão, os operadores da indústria alimentar devem considerar todas as possíveis contramedidas para evitar a contaminação cruzada, a fim de evitar o uso do rótulo de precaução. Somente quando a probabilidade de contaminação cruzada com alergénios for significativa, significando um alto risco para o consumidor alérgico, a informação se torna uma ferramenta útil de comunicação de risco (Muraro *et al.*, 2014; Reese *et al.*, 2015).

4 Leite

O leite de bovino é, de longe, o tipo de leite mais consumido, liderando a produção mundial de leite. No entanto, em certos locais do mundo e contextos locais, o leite de outras espécies animais tem também uma participação significativa no consumo. Para além do leite de bovino (representando 85 % do leite produzido a nível mundial), a produção mundial de leite é mais elevada para o leite de búfala (11 %), seguindo-se o leite de cabra (2,3 %), de ovelha (1,4 %) e de camelo (0,2 %) (Claeys *et al.*, 2014).

O leite de todos os mamíferos contém os mesmos componentes principais, nomeadamente água, proteínas, lípidos, hidratos de carbono, vitaminas e minerais. Em média, o leite é constituído por 90 % de água, 5 % de hidratos de carbono (48 g/L de lactose e pequenas quantidades de glucose e galactose) e 4 a 5 % de proteínas (40-50 g/L) (Verhoeckx *et al.*, 2015). De acordo com a literatura, o leite de origem animal foi inserido na dieta humana cerca de 9000 anos atrás. A domesticação do gado forneceu carne e leite como componentes importantes da nossa dieta (Hochwallner *et al.*, 2014).

O leite humano é considerado o melhor alimento para crianças devido ao seu valor nutricional. A composição do leite materno varia ao longo da lactação. No período de colostro de lactação inicial, o leite materno contém um teor mais elevado de proteínas do que o leite maduro, uma vez que a quantidade de proteínas no leite diminui a cada mês de lactação. O colostro e o leite maduro são considerados os alimentos mais importantes e difíceis de substituir devido à sua excelente fonte de nutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento, como por exemplo, proteínas, lípidos, cálcio, fósforo, magnésio e vitaminas. É também uma fonte de proteínas bioativas, como por exemplo, lactoferrina, lisozima, imunoglobulina secretiva, lactalbumina, κ -caseína e β -caseína, cujo papel é aumentar a absorção de nutrientes no trato gastrointestinal, estimular o sistema imunológico e criar mecanismos de defesa contra microrganismos. No trato gastrointestinal, estas proteínas aumentam a digestão e a absorção de nutrientes através de inibidores, como o inibidor de tripsina ou outras enzimas ativas. Além disso, estão envolvidas na estimulação da resposta imunológica contra microrganismos, ou seja, promove o crescimento de bactérias benéficas nos intestinos, como por exemplo, *Lactobacillus* ou *Bifidobacteria* e inibe o crescimento da flora intestinal patogénica, tal como, *Streptococcus mutans*, *S. pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* (Miciński *et al.*, 2013) .

As primeiras reações adversas ao leite foram relatadas por Hipócrates antes de 370 aC, nomeadamente sintomas cutâneos e gastrointestinais após o consumo deste alimento. Quinhentos anos mais tarde, o médico e investigador grego Gálen de Pergamum mencionou uma relação causal entre esses sintomas e o consumo de leite. No início do século XX verificou-se que as reações adversas ao leite se tornaram mais frequentes (Hochwallner *et al.*, 2014). O leite contém várias proteínas que podem provocar uma reação alérgica num indivíduo sensibilizado. Algumas destas proteínas são consideradas alérgenos maiores, outras são consideradas alérgenos menores, e outras ainda raramente ou nunca foram associadas a reações clínicas (Fiocchi *et al.*, 2010).

Existem vários mecanismos que conduzem à sensibilização inicial às proteínas de leite: supõe-se que a sensibilização possa ocorrer mesmo antes do nascimento, tendo-se revelado que pequenas quantidades de proteínas alimentares consumidas por mulheres grávidas podem ter repercussões no feto através da placenta (Szepfalusi *et al.*, 2000). A ingestão oral, através da pele ou por inalação também foram consideradas (Hochwallner *et al.*, 2014). Geralmente, as reações clínicas começam nos primeiros dias de vida, após a interrupção do aleitamento materno e com a introdução do leite animal na dieta, existindo, no entanto, casos raros em que os sintomas aparecem logo durante a lactação (Jarvinen & Suomalainen, 2001).

A alergia ao leite tornou-se uma doença comum na primeira infância, sendo que a sua prevalência varia de 1,6 % a 2,8 % entre crianças com menos de 2 anos de idade (Ji *et al.*, 2016). No entanto, ocasionalmente, ocorre em adultos (Savilahti, 1981). O leite inclui mais de 25 proteínas diferentes mas apenas algumas delas são conhecidas por serem alergénios, sendo as principais as caseínas, β -lactoglobulina e α -lactalbumina (Verhoeckx *et al.*, 2015).

4.1 Composição dos alergénios do leite

O leite contém entre 3,0 e 3,5 % de proteínas que podem ser divididas em duas classes principais: caseínas (80 %) e proteínas de soro de leite (20 %) (Monaci *et al.*, 2006). O último grupo de proteínas permanece solúvel no soro do leite após precipitação ácida de caseínas a pH 4,6 que forma o coágulo (Farrell *et al.*, 2004). As caseínas e as proteínas do soro de leite apresentam diferentes características físico-químicas. A caseína é a principal fração das proteínas do leite e é subdividida em várias famílias, das quais as mais importantes são α S1-caseína, α S2-caseína, β -caseína e κ -caseína, sendo a caseína α S1 o alergénio mais importante da fração correspondente a esta proteína. Os alergénios encontrados na fração de soro de leite são α -lactalbumina, β -lactoglobulina, imunoglobulinas, albumina de soro bovino e vestígios de lactoferrina. A α -lactalbumina e a β -lactoglobulina são os alergénios mais importantes da fração do soro de leite, representando, respetivamente, 5 % e 10 % do total de proteínas do leite (Hochwallner *et al.*, 2014; Monaci *et al.*, 2006).

4.1.1 Caseínas

O leite contém partículas coloidais que são compostas por um complexo de proteína associada e fosfato de cálcio. Estas partículas são denominadas por micelas de caseína que são agregados esféricos com diâmetros entre 100 e 300 nm (figura 4.1) (Kruif *et al.*, 2012, Hochwallner *et al.*, 2014).

As caseínas são proteínas fosforiladas insolúveis que representam 80 % da proteína total no leite. As caseínas já foram estudadas muito extensivamente e provavelmente são o grupo de proteínas alimentares mais caracterizado. Em 1818 foi reconhecido que as caseínas pertencem à composição do leite e são caracterizadas como grandes partículas suspensas na fase aquosa (soro de leite).

Inicialmente, a caseína era referida como " caseinato de cálcio - partículas de fosfato de cálcio ". O termo "micela de caseína" foi introduzido em 1921 e os dois termos foram utilizados por vários anos, mas, desde 1960, o último termo foi usado exclusivamente (Fox & Brodtkorb, 2008).

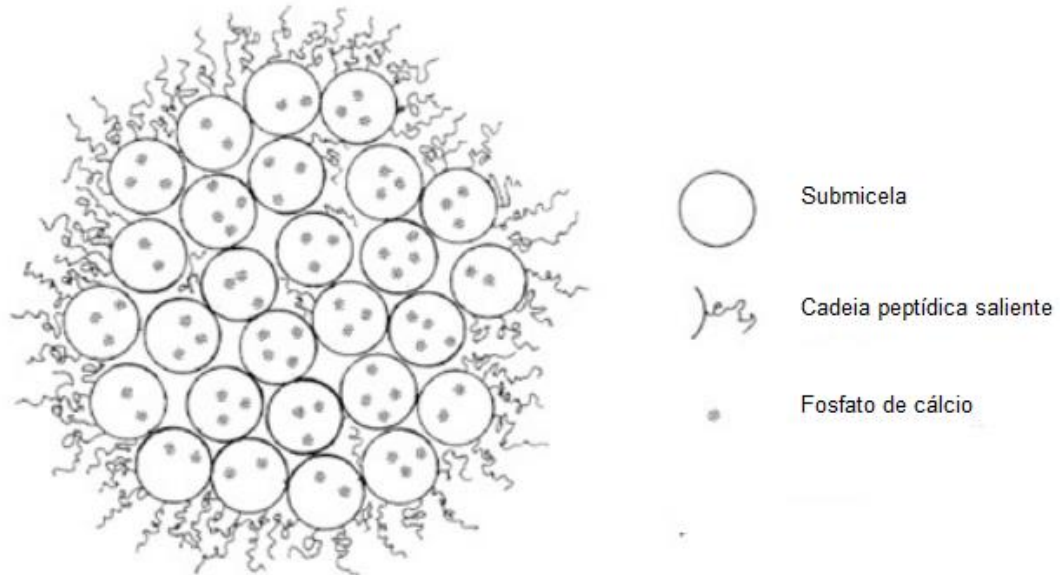


Figura 4.1 - Ilustração do modelo de micela (adaptado de Kruif *et al.*, 2012)

Os quatro alergénios de caseína (tabela 4.1) são conhecidos como Bos d 8. As frações de caseína diferem em concentração, conteúdo de fósforo, composição de aminoácidos, peso molecular e ponto isoelétrico. Cada caseína individual - α S1-caseína, α S2-caseína, β -caseína e κ -caseína - representa um composto químico bem definido, mas eles reticulam-se para formar agregados ordenados (micelas). As micelas possuem uma parte hidrofóbica (central) e uma camada hidrofílica (periferia) na qual estão presentes os principais fosfatos, responsáveis pelas propriedades de ligação ao cálcio e transferência de caseínas. As propriedades funcionais da α S1-caseína, α S2-caseína, β -caseína e κ -caseína diferem entre elas, como por exemplo, α S1 caseína, α S2 caseína, β -caseína parecem ser sensíveis ao cálcio, enquanto que κ -caseína não é. No entanto, as quatro caseínas apresentam características biofísicas comuns, tal como a resistência ao calor e suscetibilidade a proteases. Outro grupo é o das γ -caseínas que estão presentes em quantidades muito baixas no leite e são subprodutos da proteólise da β -caseína (European Food Safety Authority, 2014, Bernard, *et al.*, 1999).

A sensibilização é particularmente frequente contra α -caseína (100 %) e κ -caseína (91,7 %) (Restani *et al.*, 1995). Vários estudos identificaram a α S1-caseína como um alergénio importante que induz forte reação alérgica imediata ou retardada (Ruitter *et al.*, 2006).

Tabela 4.1 - Alergénios do Leite – Caseínas (adaptado Hochwallner *et al.*, 2014)

Nome alergénio	Nome bioquímico
Bos d 9	α 1-Caseína
Bos d 10	α 2-Caseína
Bos d 11	β -Caseína
NA	γ 1-Caseína
NA	γ 2-Caseína
NA	γ 3-Caseína
Bos d 12	κ -Caseína

α S1-caseína representa até 40 % da fração das caseínas no leite. São cadeias de polipéptidos simples com a mesma sequência de aminoácidos que diferem apenas no grau de fosforilação (Hochwallner *et al.*, 2014).

α S2-caseína representa 12,5 % da fração das caseínas e são as mais hidrofílicas de todas as caseínas. Estas consistem em 2 componentes principais e outros menores que exibem variáveis níveis de fosforilação pós-tradução e graus menores de ligação dissulfureto intermolecular que não participam na interação com outras caseínas (Farrell *et al.*, 2004).

A família de β -caseína é responsável por 35 % da fração das caseínas e é bastante complexa por causa da ação da protéase natural do leite. Esta protéase atua sobre a β -caseína e, assim, origina fragmentos de γ 1- γ 2- γ 3-caseína. O β -caseína é o componente mais hidrofóbico da fração total de caseínas (Visser *et al.*, 1995).

A última família é representada por κ - caseína, que representa 12,5 % da fração total da caseína. κ -caseína consiste maioritariamente em componentes hidratos de carbono livres e um mínimo de seis componentes menores (Farrell *et al.*, 2004). O grupo κ -caseína desempenha um importante papel nas propriedades de estabilidade e coagulação do leite (Muller-Renaud *et al.*, 2004).

4.1.2 Proteínas de soro do leite

O soro de leite (tabela 4.2) contém essencialmente proteínas globulares, principalmente β -lactoglobulina, α -lactalbumina e lactoferrina, que são sintetizados na glândula mamária, enquanto outras proteínas, tais como a albumina de soro bovino ou imunoglobulinas, vêm do sangue (European Food Safety Authority, 2014).

Tabela 4.2 - Alergénios do Leite – Proteínas de soro (adaptado Hochwallner *et al.*, 2014)

Nome alergénio	Nome bioquímico
Bos d 4	α -lactalbumina
Bos d 5	β -lactoglobulina
Bos d 6	Albumina de soro
	Lactoferrina
	Imunoglobulinas

β -Lactoglobulina é uma proteína importante do soro de leite da maioria das espécies de mamíferos, mas não é encontrada nos humanos. É uma proteína pequena constituída por 162 aminoácidos e ocorre naturalmente numa forma dimérica, apresentando uma forma globular. A função desta proteína do leite ainda não é conhecida mas é importante para as lipocalinas, uma superfamília de proteínas que transporta moléculas hidrofóbicas como o colesterol e a vitamina D2 (Adams *et al.*, 2006).

Existem dois isómeros principais de β -lactoglobulina, A e B, que diferem nos aminoácidos 64 e 118 (ácido aspártico e valina na A, glicina e alanina na B). A potencial alergenicidade deste foi atribuído à sua elevada estabilidade e ao fato da β -lactoglobulina não estar presente no leite humano (Wal, 2004). Contudo, dados recentes indicam que α -lactalbumina é o alergénio de soro mais importante (Hochwallner *et al.*, 2010).

A α -Lactalbumina é uma proteína pequena monomérica, ácida, com ligações de cálcio, que é estabilizada por quatro pontes dissulfureto. Atua como um componente regulatório no sistema de galactosiltransferase que sintetiza a lactose (Permyakov & Berliner, 2000) e pode interagir com membranas lipídicas, ácido esteárico e ácido palmítico (Cawthorn *et al.*, 1996). Uma forma multimérica de lactalbumina pode induzir a apoptose no tumor, mas não nas células normais (Svensson *et al.*, 2000).

A lactoferrina é uma glicoproteína de ligação de ferro com 703 aminoácidos e pertence à família transferrina. A sua função consiste no sequestro de radicais livres e actua como antioxidante, tendo propriedades antimicrobianas e desempenhando um papel importante na defesa contra infeções (Wal, 2002).

A albumina de soro tem 582 aminoácidos e contém 17 ligações dissulfureto. Esta desempenha um papel importante no transporte, metabolismo, distribuição de ligações e pressão osmótica do sangue e prevenção de radicais livres (Farrell *et al.*, 2004).

4.2 Alergia ao leite

O leite é um dos primeiros alimentos a ser introduzido na dieta e, conseqüentemente, é uma das principais causas de alergia alimentar na infância. A sua prevalência varia significativamente entre os estudos o que pode ser devido a diferentes métodos utilizados para o diagnóstico ou diferenças nas idades das populações estudadas. Além disso, os fatores geográficos podem influenciar as taxas de prevalência. De um modo geral, o número de casos relatos de reações adversas ao leite são muito mais elevados do que os diagnósticos confirmados, não só nas crianças, mas também nos adultos (Hochwallner *et al.*, 2014).

Constata-se que 0,6 a 2,5 % dos pré-escolares, 0,3 % das crianças e adolescentes e menos de 0,5 % dos adultos sofrem alergia ao leite. A sua prevalência está a aumentar o que pode ser explicado por uma diminuição na amamentação e um aumento da alimentação com fórmulas à base de leite (Hochwallner *et al.*, 2014). Vários fatores que podem aumentar o risco do desenvolvimento de alergia ao leite são descritos como predisposição genética para alergia, como por exemplo, atopia, ingestão precoce de pequenas quantidades de leite e também fatores relacionados com a flora intestinal. Curiosamente, a maioria dos lactentes alérgicos ao leite superam a alergia (Savilahti & Savilahti, 2013).

4.3 Mecanismos imunológicos da Alergia ao leite

A terminologia "Alergia ao Leite" é adequada quando os mecanismos imunológicos específicos foram comprovados (Fiocchi *et al.*, 2010). O termo alergia alimentar é muitas vezes confundido com intolerância alimentar. Na verdade, a intolerância alimentar é muito mais comum do que a alergia alimentar. A intolerância ao leite refere-se a reações não imunológicas, como distúrbios da digestão, absorção ou metabolismo de certos componentes do leite. A gama de sintomas que podem ser induzidos é muito semelhante àqueles causados por alergia alimentar complicando assim a distinção entre os dois termos. A intolerância ao leite manifesta-se de várias maneiras, produzindo sintomas como eczema, vômitos, diarreia e cólicas estomacais, mas não urticária ou problemas respiratórios (sintomas de alergia ao leite). O início dos sintomas é frequentemente tardio, o que torna a deteção da origem alimentar difícil de reconhecer. Deste modo, contrasta com a alergia alimentar, em que a reação é geralmente imediata e muitas vezes ocorre no início da vida (Monaci *et al.*, 2006).

A alergia pode ser mediada por anticorpos, mediada por células ou, ocasionalmente, ambos podem estar envolvidos. Se a IgE estiver envolvida na reação, o termo "alergia alimentar atópica" é apropriado. Se os mecanismos imunológicos diferentes da IgE estiverem predominantemente envolvidos, é o termo "alergia alimentar não mediada por IgE" que deve ser utilizado (Fiocchi *et al.*, 2010).

A reatividade imuno-mediada pode surgir com uma ou qualquer combinação dos 4 tipos básicos de reações imunológicas delineadas por Gell e Coombs (Damage, 2017):

- A. A hipersensibilidade mediada por Tipo I ou IgE leva a sintomas imediatos, tais como urticária, angioedema e/ou outra reação anafilática.
- B. Nas reações de tipo II (citotóxico), o antígeno liga-se à superfície celular e a presença de anticorpos (IgG, IgM ou IgA) perturba a membrana, conduzindo à morte celular.
- C. Nas reações do tipo III (tipo Arthus), os imunocomplexos antígeno-anticorpo-complemento (anticorpos imunoglobulina G, M, A e E) ficam presos em pequenos vasos sanguíneos ou nos glomérulos renais.
- D. As reações de tipo IV (retardadas) são mediadas por linfócitos T sensibilizados.

As reações tipo I são as mais bem compreendidas e são muitas vezes referidas como as reações alérgicas mais comuns e clássicas. Os outros 3 tipos, coletivamente descritos como alergia não mediada por IgE, são mais difíceis de investigar e, portanto, menos bem compreendidos (Fiocchi *et al.*, 2010).

4.4 Efeito do processamento térmico e não térmico

Nos países desenvolvidos, o leite é extensivamente processado antes do consumo e raramente é consumido na sua forma bruta. Após a colheita, o leite é arrefecido a 4 °C e é armazenado e transportado em tanques de aço inoxidável a essa temperatura. Em seguida, o leite é centrifugado de modo a separar a gordura do resíduo de leite desnatado. O próximo passo é a padronização, que é a adição industrial de gordura de leite ao leite em uma proporção especificada. Esta proporção determina o tipo de leite produzido: leite desnatado (1 % ou menos de gordura), leite semidesnatado (2 %) ou leite integral (superior a 3,25 %). Finalmente, o leite é aquecido. As condições de tratamento térmico mais utilizadas são a pasteurização (aquecimento de leite a 70-80 °C durante 15-20 segundos), a esterilização (110-120 °C durante 10-20 minutos) e o processamento de temperatura ultraelevada (UHT) (135-145 °C durante 0,5-4 segundos). Após o aquecimento, o leite é imediatamente arrefecido até uma temperatura inferior a 4 °C e embalado. Para produzir produtos contendo leite, este é processado posteriormente (Verhoeckx *et al.*, 2015).

Até ao momento, a única maneira de evitar a alergia ao leite é abster-se de consumir componentes do leite. No entanto, fazer isso é difícil porque muitos alimentos processados contêm leite (Meng *et al.*, 2017), pelo que reduzir o potencial alergénico do leite seria benéfico na redução do risco do

desencadeamento de uma reação alérgica. Estudos demonstram que o tratamento térmico convencional pode ser efetivo na diminuição da alergenicidade, alterando as estruturas das proteínas alimentares (Achouri & Boye, 2013; Tong *et al.*, 2012). No entanto, esse tratamento causa numerosas mudanças nas qualidades sensoriais e no valor nutricional do leite, que afetam a aceitação e os requisitos do consumidor (Contador *et al.*, 2015).

As técnicas de processamento comumente aplicadas incluem tratamentos térmicos e aplicações não térmicas. Diferentes métodos de processamento alteram a estrutura das proteínas alimentares de diferentes formas o que pode implicar modificações estruturais (Rahaman *et al.*, 2016).

4.4.1 Efeito de tratamentos térmicos

O tratamento térmico é a técnica de processamento convencional e mais comum para muitos alimentos, a fim de reduzir a carga microbiana, aumentar a vida útil e melhorar a qualidade do produto final. Neste processo podem ocorrer mudanças estruturais, como por exemplo o desdobramento/deleção da estrutura da proteína ou proporcionar interações moleculares. Tais alterações estruturais podem expressar, mascarar ou destruir epítomos em proteínas alimentares e assim influenciar a alergenicidade. Além disso, o aquecimento também pode alterar a suscetibilidade das proteínas à digestão gastrointestinal e sua absorção através da mucosa e assim modular o seu potencial alergénico (Rahaman *et al.*, 2016).

As caseínas são estáveis ao calor porque não possuem uma estrutura complexa que possa ser quebrada pelo aquecimento, pelo que o aquecimento do leite só pode reduzir parcialmente a sua alergenicidade. Por sua vez, a estrutura complexa da α -lactalbumina e β -lactoglobulina é alterada após o seu aquecimento, conduzindo a um aumento de exposição de epítomos e aumentando significativamente a sua alergenicidade (Rahaman *et al.*, 2016; Verhoeckx *et al.*, 2015).

4.4.2 Aplicações não térmicas

Embora a aplicação térmica possa ser usada para alterar o potencial alergénico de muitos alimentos, esta pode, por vezes e simultaneamente, ter um impacto negativo sobre a qualidade dos produtos, alterando as propriedades organolépticas, a cor e o teor de nutrientes. Com procedimentos não térmicos, o alimento preserva as suas características originais, aparece mais fresco e às vezes é mais nutritivo que os alimentos tratados termicamente. Estes procedimentos incluem altas pressões, radiação gama, ultrassom, fermentação microbiana e hidrólise enzimática (Rahaman *et al.*, 2016).

4.4.2.1 Altas pressões

A utilização de alta pressão em alimentos é um método de processamento não térmico e é utilizada para inativar microrganismos e enzimas à temperatura ambiente, o que mantém a qualidade e o valor nutricional dos alimentos (Meng *et al.*, 2017). Esta técnica afeta principalmente as interações entre moléculas de proteínas, reorganizando a sua estrutura e, conseqüentemente, modificando a sua digestibilidade e alergenicidade (Rahaman *et al.*, 2016).

4.4.2.2 Radiação

A radiação é uma técnica bem-sucedida na preservação de alimentos com alteração mínima nas características nutritivas e sensoriais dos mesmos. A radiação provoca alterações como a modificação de aminoácidos em proteínas alimentares que podem modificar a reatividade sob organismo. O efeito da alergia é, assim, dependente da dose de irradiação. Neste processo, a proteína sofre uma aglomeração causando a ausência de epítomos e, conseqüentemente, uma redução no desencadeamento alérgico (Rahaman *et al.*, 2016).

4.4.2.3 Fermentação e hidrólise enzimática

A fermentação é uma das técnicas tradicionais para processamento e preservação de alimentos. A hidrólise enzimática microbiana das proteínas alimentares durante a fermentação produz alguns peptídeos com potenciais benefícios para a saúde, tais como propriedades anticancerígenas e anti-hipertensivas, enquanto destroem alguns epítomos antigénicos, resultando na diminuição da alergenicidade. A fermentação dos alérgenos, tais como α -lactalbumina, β -lactoglobulina e caseína através das bactérias do ácido láctico, que preferencialmente utilizam a lactose como fonte de carbono, aparenta reduzir fortemente a alergenicidade (Lima *et al.*, 2009; Rahaman *et al.*, 2016; Verhoeckx *et al.*, 2015).

5 Métodos para a determinação de Alergénios em Alimentos

As alergias alimentares, como já referido, são qualificadas como um problema de saúde relevante nos países industrializados. Alergénios não declarados como contaminantes em produtos alimentares representam um risco importante para pessoas sensibilizadas, pelo que a Diretiva Europeia de rotulagem dos géneros alimentícios exige que todos os ingredientes adicionados intencionalmente aos produtos alimentares sejam incluídos no rótulo (Poms *et al.*, 2004).

Assim, é fundamental a existência de métodos fiáveis de deteção e quantificação de alergénios alimentares para garantir a conformidade com a rotulagem dos alimentos e melhorar a proteção dos consumidores (Poms *et al.*, 2004).

Para a análise de alimentos existem diferentes métodos analíticos: Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA), Dispositivo de Fluxo Lateral (LFD), *Immunoblotting*, Biossensores, Espectrometria de massa (SM), Reação em cadeia da polimerase (PCR), PCR-ELISA e Reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real-time PCR) (tabela 5.1) (Holck *et al.*, 2011). Estes métodos são complementares e podem ser utilizados para confirmação de resultados de rastreio (Ambifood, 2017).

Tabela 5.1 - Métodos de deteção (adaptado de Holck *et al.*, 2011)

Método	Tipo de Método	Alvo
ELISA	Imunológico	Proteína
LDF	Imunológico	Proteína
<i>Immunoblotting</i>	Imunológico	Proteína
Biossensores	Imunológico	Proteína
Espectrometria de Massa	Eletromagnético	Proteína
PCR	Biologia Molecular	DNA
PCR-ELISA	Biologia Molecular e Imunológico	DNA
Real-time PCR	Biologia molecular	DNA

5.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA)

Na década de 1980, o desenvolvimento de ensaios imunoenzimáticos do tipo ELISA teve o seu avanço em aplicações bioquímicas e biomédicas devido à sua alta especificidade, sensibilidade e manipulação de amostras (Schubert-Ullrich *et al.*, 2009).

O ELISA é o método mais utilizado para a deteção de alergénios em matrizes alimentares complexas (Linacero *et al.*, 2016) e, como tal, é o método mais comumente usado em laboratórios da indústria alimentar para deteção e quantificação de alergénios ocultos nos alimentos (Poms *et al.*, 2004).

O método ELISA permite a deteção de alergénios ou marcadores específicos através da reacção colorimétrica após a ligação com um anticorpo específico marcado com enzima (Poms *et al.*, 2004), representa uma boa ferramenta para fins de rastreio e apresenta uma boa sensibilidade e especificidade para a deteção de vestígios de ingredientes alergénicos especificados (Monaci *et al.*, 2006; Schubert-Ullrich *et al.*, 2009).

Este método é muito utilizado devido à sua facilidade de manuseamento, resposta rápida e baixo limite de deteção. Os kits ELISA (figura 5.1) empregam principalmente anticorpos policlonais para a deteção de alergénios alimentares, uma vez que estes anticorpos oferecem o benefício de reconhecer uma diversidade de proteínas alvo. Embora a sensibilidade não seja uma desvantagem, existe a preocupação de torná-los mais sensíveis de modo a garantir a proteção da saúde pública (Lim, 2010; Monaci *et al.*, 2011). Se a sensibilidade do método fosse além dos limites necessários para assegurar a saúde dos consumidores alérgicos, então os resíduos de alimentos alergénicos em níveis muito baixos seriam detetados num maior número de alimentos. A presença destes resíduos seria declarada nos rótulos e os consumidores alérgicos seriam alertados para a composição destes alimentos (Taylor *et al.*, 2009).



Figura 5.1 - Componentes presentes no Kit de ELISA

No capítulo 6 encontra-se uma descrição pormenorizada do ELISA, sendo este o método que foi utilizado no procedimento experimental.

5.2 Dispositivo de Fluxo Lateral

O dispositivo de fluxo lateral (LDF) é uma versão simplificada do ELISA com uma tira de membrana que é produzida a partir de nitrocelulose, *nylon*, polietersulfona, polietileno ou sílica fundida e na qual é aplicada imunorreagentes como sejam anticorpos ou antígenos. Os LDF são de baixo custo, rápidos e portáteis, e não requerem habilidade técnica para executar. Permitem um rastreio rápido e eficaz em termos de custos, uma vez que não é necessária uma instrumentação específica, por exemplo, leitor ótico (Schubert-Ullrich *et al.*, 2009).

Durante a última década houve uma evolução no desenvolvimento de testes de alergénios rápidos baseados em LDF (Posthuma-Trumpie *et al.*, 2009). Isso levou a um aumento de produção de testes de alergénios rápidos desde 2003 e atualmente, existem pelo menos 14 LDF, como por exemplo, deteção de avelã, moluscos, cereais com glúten, crustáceos, ovos, leite, nozes, amêndoa, amendoim e soja (Poms *et al.*, 2004; Posthuma-Trumpie *et al.*, 2009; Schubert-Ullrich *et al.*, 2009).

Nos formatos atuais de LDF (figura 5.2), o exame é feito através do movimento de uma amostra líquida ao longo de uma tira de material polimérico passando assim várias zonas onde ocorre a ligação das moléculas que exercem especificidade com as proteínas (Posthuma-Trumpie *et al.*, 2009; Schubert-Ullrich *et al.*, 2009).

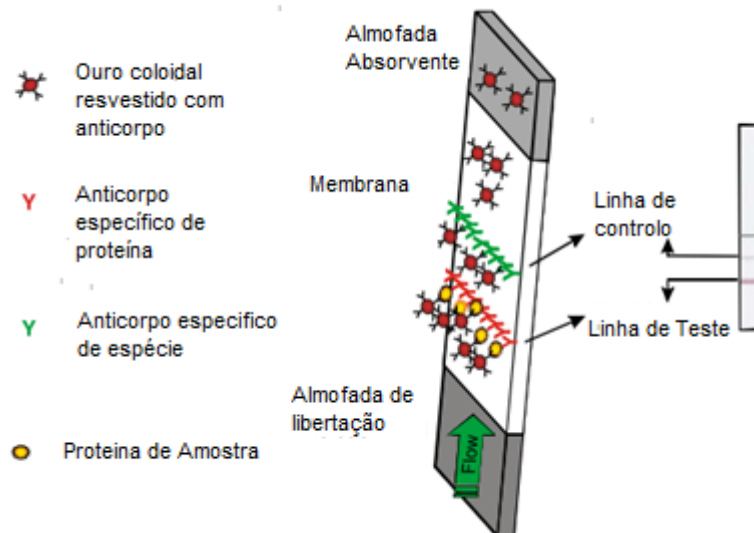


Figura 5.2 - Esquema representativo de um ensaio de dispositivo fluxo lateral baseado no formato *sandwich* (adaptado de Schubert-Ullrich *et al.*, 2009)

Similar ao ELISA, existem dois formatos para a deteção de alergénios que podem ser baseados em ensaios não competitivos e competitivos. Para ensaios não competitivos em *sandwich*, um agente de ligação específico para o analito (normalmente, mas não necessariamente, um anticorpo) é imobilizado na membrana. O reagente de deteção, tipicamente um anticorpo (marcado com enzima), é depositado na almofada conjugada mas permanece não ligado. Quando a amostra líquida é adicionada à almofada de conjugado, o reagente de deteção é solubilizado e começa a mover-se com o fluxo de amostra para cima da tira de membrana. O analito presente na amostra é ligado pelo anticorpo acoplado ao reagente de deteção. À medida que a amostra passa sobre a zona à qual o reagente de captura foi imobilizado, o complexo reagente de deteção de analito é capturado. Após a captura dá-se o início do desenvolvimento de cor que é proporcional à quantidade de analito presente na amostra (Poms *et al.*, 2004; Posthuma-Trumpie *et al.*, 2009; Schubert-Ullrich *et al.*, 2009)

Em procedimentos de imunoensaio competitivo, o reagente de deteção pode ser o analito ligado a uma proteína ou a um anticorpo do analito ligado a látex ou a um metal coloidal. À medida que a amostra que contém a substância a analisar e o reagente de deteção passam sobre a zona à qual o reagente de captura (anticorpo ou conjugado analito-proteína) foi imobilizado, alguns dos analitos e algum do reagente de deteção são ligados e aprisionados. Quanto mais analito estiver presente na amostra, mais eficazmente será capaz de competir com o analito imobilizado na membrana para ligação à quantidade limitada de anticorpos no reagente de deteção. Assim, um aumento na quantidade de analito em tais imunoensaios competitivos resultará numa diminuição do sinal na zona de leitura (Poms *et al.*, 2004; Posthuma-Trumpie *et al.*, 2009; Schubert-Ullrich *et al.*, 2009).

Uma vantagem deste método é o uso doméstico, uma vez que estes são portáteis, fáceis de realizar e produzem rapidamente resultados confiáveis dentro de 3 a 15 min sem equipamentos e reagentes de laboratório caros. O resultado é de fácil interpretação uma vez que é qualitativo ou semiquantitativo, isto é, indica a presença do alergénio ou se a concentração de alergénios é alta ou baixa (Poms *et al.*, 2004; Posthuma-Trumpie *et al.*, 2009; Schubert-Ullrich *et al.*, 2009).

5.3 Immunoblotting

O *Immunoblotting* é uma técnica usada para testes confirmatórios da presença de alergénios em alimentos para avaliar a especificidade de anticorpos e caracterizar IgE de indivíduos alérgicos. Na sua forma mais simples, os alergénios são imobilizados em membranas e detetados pela ligação de anticorpos conjugados com enzimas. Um substrato produzirá então uma cor à medida que é convertido num produto (Holck *et al.*, 2011).

Numa variação mais elaborada, os extratos contendo alergénios são separados por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida. O SDS desnatura as proteínas, dando-lhes uma forte carga negativa. As proteínas são separadas de acordo com a sua massa molecular independentemente da sua carga

original (figura 5.3). As proteínas separadas são então transferidas para uma membrana e detetadas com anticorpos marcados com rádio ou enzima. As bandas individuais tipicamente representam uma proteína. De seguida é feita a transferência de IgE humana que permite a deteção e identificação de alergénios individuais. As principais desvantagens deste método para análise de alimentos de rotina são os procedimentos elaborados e demorados e a dependência de soros humanos apropriados. No entanto, uma vez que um alergénio é caracterizado, os anticorpos podem ser produzidos em quantidades superiores recorrendo-se a animais e substituindo, deste modo, os soros humanos no procedimento referido (por exemplo coelhos ou cabras) (Poms *et al.*, 2004).

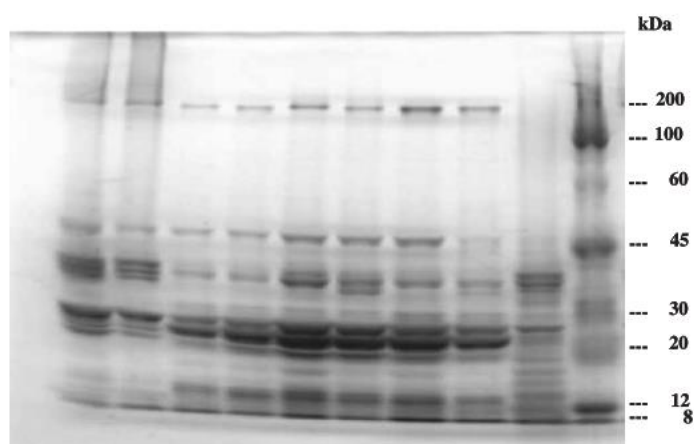


Figura 5.3 - As proteínas são separadas de acordo com a sua massa molecular (8 a 200 kDa) pelo método *Immunoblotting* (adaptado de Poms *et al.*, 2004)

5.4 Biossensores

Uma tecnologia emergente que ainda não foi comumente aplicada para análise de alimentos é o uso de biossensores. Os instrumentos de um biossensor permitem medir a interação molecular específica em tempo real. Por imobilização de uma molécula alvo, que pode ser um anticorpo (proteína) ou um fragmento de DNA de cadeia simples para uma superfície de chip de sensor, a interação de ligação entre uma ou mais moléculas pode ser medida quantitativamente (Holck *et al.*, 2011; Poms *et al.*, 2004; Schubert-Ullrich *et al.*, 2009).

Os biossensores imunoquímicos são geralmente constituídos por três componentes: um recetor biológico de especificidade apropriada para o analito, um transdutor para converter o evento de reconhecimento em um sinal adequado e um sistema de processamento de sinal que deteta, processa e exhibe os dados analíticos (Schubert-Ullrich *et al.*, 2009).

A deteção e quantificação é conseguida por várias técnicas físico-químicas, por exemplo ressonância plasmática de superfície (SPR), absorção por ressonância (REA), ou sensores de onda fluorescente evanescente, entre outros. Nos últimos anos, os biossensores também encontraram um campo de aplicação na análise de alimentos e deteção de alergénios alimentares, particularmente os sensores de imunoensaio. Os biossensores de SPR monitorizam a interação de uma molécula com uma superfície de sensor preparada na presença de uma molécula alvo em solução (inibição da solução) ou excesso de analito (competição superficial). A saída mensurável é um ângulo de ressonância ou valor de índice de refração (Holck *et al.*, 2011; Poms *et al.*, 2004; Schubert-Ullrich *et al.*, 2009).

Os biossensores podem ser utilizados para detetar um alergénio ou proteína específica, ou um fragmento de DNA específico. Os biossensores foram aplicados para a deteção de alguns alimentos potencialmente alergénicos como avelã, ovo e leite (Holck *et al.*, 2011).

5.5 Espectrometria de massa

A espectrometria de massa é a técnica mais importante na proteómica para identificar e caracterizar proteínas (Battaglia, 2008). A espectrometria de massa tem vindo a revelar-se como um potencial método analítico de confirmação para fornecer a identificação percetível de proteínas ou peptídeos provenientes de um alimento alergénico (Holck *et al.*, 2011).

A espectrometria de massa, em conjunto com a cromatografia gasosa ou líquida, tem a capacidade desejável de funcionar ao nível da sequência proteica. Isto é, tem a capacidade de avaliar alterações em proteínas individuais ou resíduos de aminoácidos individuais numa sequência de proteínas. Este método também possibilita a informação de dados quantitativos relativos ou absolutos, o que é particularmente valioso na análise de proteínas alimentares (Downs *et al.*, 2016).

O princípio básico do método baseia-se na massa e carga de iões e através de um bombardeamento das moléculas por um feixe de eletrões com elevada energia, promove a separação dos iões pela razão massa/carga (m/z) (Nielsen, 2014).

Em muitos casos, a espectrometria de massa tem sido usada principalmente como uma ferramenta para caracterizar alergénios de diferentes alimentos como leite, ovo, soja, avelã, peixe, trigo, tremçoço e mostarda. Além disso, vários métodos foram desenvolvidos para a deteção de alergénios de amendoim, leite, ovo, e glúten em várias amostras de alimentos. Atualmente é utilizado principalmente como ferramenta qualitativa, embora possa ser usado para propósitos quantitativos. Este método requer equipamentos com elevado custo de manutenção e a exigência de pessoal altamente treinado são fatores que limitam a sua escolha (Holck *et al.*, 2011).

5.6 Métodos baseados em DNA

Métodos que aplicam a deteção de sequências de codificação de proteínas alergénicas permitem a análise direta de componentes alimentares alergénicos. A deteção de proteína alergénica é realizada através da amplificação de seu fragmento de DNA específico na reação de PCR. A reação de PCR permite a obtenção de resultados qualitativos apontando para a presença de sequência codificante para determinado alérgeno. A determinação semi-quantitativa pode ser obtida com a reação PCR-ELISA, enquanto a determinação quantitativa é conseguida por PCR em Tempo Real (*Ecker et al.*, 2013; *Holck et al.*, 2011; *Poms et al.*, 2004; *Słowianek & Majak*, 2011).

No método de PCR convencional básico, o DNA modelo de cadeia dupla é desnaturado para DNA de cadeia simples (ssDNA) por aquecimento. Os oligonucleótidos específicos ou *primers* são ligados a cada uma das duas cadeias. Uma DNA polimerase (enzima) estável ao calor é utilizada para sintetizar novas cadeias de DNA, utilizando os oligonucleótidos iniciadores como pontos de partida e o ssDNA como moldes para a síntese da nova cadeia. Após a polimerização (reação química), repetem-se os diferentes passos durante 30-50 ciclos. Os produtos de PCR podem então ser visualizados por eletroforese em gel de agarose ou por outros métodos de modo a determinar a quantidade de DNA molde na amostra original (*Holck et al.*, 2011; *Słowianek & Majak*, 2011).

5.6.1 PCR-ELISA

O PCR-ELISA combina a alta especificidade de uma metodologia baseada em DNA com o ensaio ELISA simples e económico para uma análise semiquantitativa. Com PCR-ELISA, um fragmento de DNA específico de um alimento alergénico é amplificado e o produto de amplificação é então ligado com uma sonda de DNA marcada com proteína específica. Este marcador proteico é então acoplado com um anticorpo marcado com uma enzima específica. A concentração do DNA pode ser quantificada pela reação de cor resultante de uma reação enzima-substrato que origina um sinal colorimétrico que pode ser medido por espectrometria através de leitor de ELISA (*Holck et al.*, 2011; *Poms et al.*, 2004).

5.6.2 Real-time PCR

O PCR em tempo real requer equipamentos de laboratório mais caros mas mostrou ser extremamente preciso e menos trabalhoso do que outros métodos de quantificação de DNA. O PCR em tempo real permite a deteção de produtos usando uma sonda oligonucleotídica específica (*Poms et al.*, 2004).

Uma das variantes do PCR quantitativo é o Taqman®, em que o DNA é amplificado na presença de uma sonda oligonucleotídica específica que possui um *reporter* e um *quencher* nas duas extremidades da cadeia. A sonda hibrida com o DNA de cadeia simples na região limitada pelos dois *primers* a serem amplificados. Quando o *reporter* e o *quencher* estão relativamente próximos, a fluorescência é suprimida. Durante a amplificação, a polimerase (uma 5'-exonuclease) cliva a sonda, deslocando o *reporter* e o *quencher* das novas vertentes da cópia, de modo a ativar a fluorescência. O número de ciclos necessários para aumentar a fluorescência acima de uma linha predefinida padrão correlaciona-se com a quantidade do produto de PCR (Holck *et al.*, 2011; Poms *et al.*, 2004; Słowianek & Majak, 2011).

Este método tem o benefício de uma maior fiabilidade devido à especificidade adicional proporcionada pela sonda de DNA (Słowianek & Majak, 2011).

Em suma, a análise com técnicas de PCR apresenta um elevado potencial de aplicação devido à sua rapidez, eficiência e simplicidade. A técnica é confiável, altamente específica e sensível. Contudo as técnicas baseadas em PCR não detetam componentes responsáveis pela reação alérgica, apenas o DNA específico da espécie, isto é, a presença de DNA que codifica para uma proteína numa amostra de alimento o que não significa necessariamente a presença do alergénio. Estes métodos não são recomendados para a deteção de alergénios em produtos alimentares com elevada proteína e baixo teor de DNA, como por exemplo, ovos. Consequentemente, estes métodos são uma boa escolha quando o teor de proteína é baixo, por exemplo, no aipo. Porém, as técnicas de PCR são promissoras no campo da deteção de alergénios a um nível que ultrapassa a imunodeteção (Mařra *et al.*, 2008; Słowianek & Majak, 2011).

6 Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA)

A *Enzyme-Linked Immunosorbent Assays* é uma técnica utilizada para detetar a presença de um anticorpo ou antigénio numa amostra, através da interação entre eles. Esta técnica surgiu em 1971 através do trabalho desenvolvido por dois grupos de pesquisadores: um grupo holandês, formado por Van Weemen e Schurs e um grupo sueco, formado por Engvall e Perlmann. Estes dois grupos idealizaram e introduziram o método imunoenzimático para deteção e quantificação de antigénios ou anticorpos específicos. Para além disso, observaram ainda que as proteínas poderiam ser imobilizadas numa superfície sólida de poliestireno e que a reação anticorpo-antigénio poderia ser manifestada pela formação de uma coloração produzida pela reação enzima-substrato denominado cromogéneo. Esta técnica foi divulgada a partir de 1974 através de publicações referentes a doenças infectocontagiosas (KPL, 2005; Lequin, 2005; Organon, 1971).

O teste ELISA é a metodologia mais utilizada para a monitorização de rotina de alergénios devido à sua sensibilidade e precisão. O ELISA tornou-se o método escolhido quer na indústria alimentar, quer em laboratórios de controlo que realizam análises de rotina para alergénios alimentares (Martinovi & Josi, 2017).

6.1 Conceitos básicos

O ELISA é um ensaio imunoenzimático que tem por objetivo diagnosticar proteínas alergénicas cujos anticorpos provêm principalmente do soro de um animal imunizado. Este soro contém IgG, que é capaz de se ligar ao alergénio utilizado para imunizar o animal, ao passo que em testes usados para o diagnóstico clínico são utilizadas as propriedades da IgE presente no soro humano. O extrato do alimento é analisado em poços de microplacas (Downs & Taylor, 2010).

Os métodos de realização de ELISA são quatro: o competitivo e os não competitivos; o direto; o indirecto; e o de formato em *sandwich* (Popping *et al.*, 2010).

6.1.1 Ensaio competitivo

Em ensaios competitivos, o anticorpo ou antigénio está ligado à base da microplaca. Se a molécula ligada à microplaca é o anticorpo, o sistema é incubado com uma concentração conhecida de antigénio marcado com a amostra, que pode ou não conter a molécula. Os dois antigénios competem pelos anticorpos. Quanto maior a concentração do analito na amostra, menor é a interação ligação entre o antigénio marcado e o anticorpo, ou seja, não ocorre formação de cor (figura 6.1 A). Num segundo

formato de ensaio competitivo, o antígeno ou o hapteno estão ligados à base da microplaca, que é incubada com uma quantidade conhecida de anticorpo (marcado ou não marcado) e a amostra. Uma concentração elevada do analito na amostra induz uma maior ligação do mesmo e uma menor ligação do anticorpo (marcado ou não) ao antígeno ligado à microplaca (figura 6.1 B). Em ensaios competitivos, o sinal fornecido para o ensaio é inversamente proporcional à molécula alvo na amostra (Popping *et al.*, 2010).

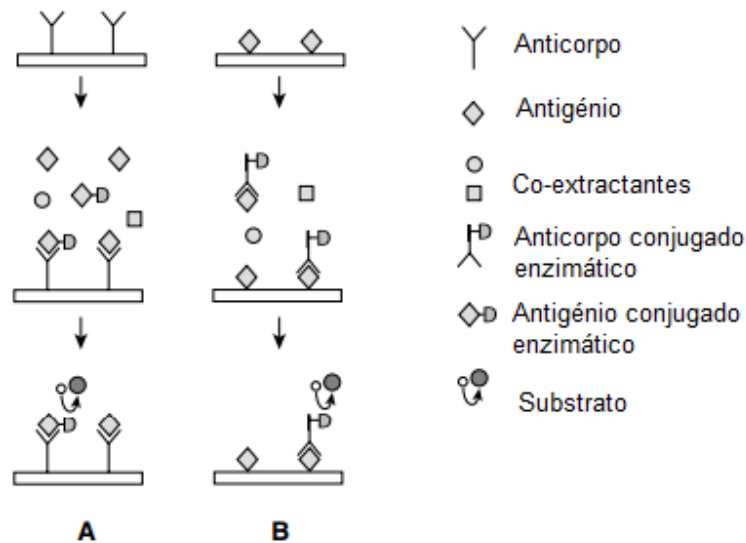


Figura 6.1 - Ensaio competitivo: A- Anticorpo na base do poço; B -Antígeno na base do poço (adaptado de Popping *et al.*, 2010)

6.1.2 Ensaio direto

O ELISA direto é considerado o tipo de ELISA mais simples e rápido. O antígeno está na base da microplaca e é adicionado um excesso de outra proteína para bloquear todos os outros locais de ligação. Posteriormente, é adicionado o complexo enzima-anticorpo para ligação ao antígeno em excesso. De seguida, o excesso é lavado para retirar o conjugado enzima-anticorpo não ligado. Ao adicionar o substrato/cromogénio da enzima, a enzima é detetada e é lido o sinal do antígeno (figura 6.2) (Sino Biological Inc., 2017).

6.1.3 Ensaio indireto

O ELISA indireto é o formato preferencial para a deteção de proteínas relativamente pequenas. Envolve os antígenos imobilizados ligados à fase sólida da microplaca e dois anticorpos, sendo um adicionado numa solução de amostra contendo uma quantidade limitada de anticorpo primário específico que reconhece o antígeno (este anticorpo não possui a enzima ligada a ele). Os anticorpos em excesso ou não ligados que permanecem no poço são então lavados pelo passo de lavagem, seguido por adição de anticorpo secundário enzima-conjugado à placa para detetar os complexos antígeno-anticorpo ligados nos poços (figura 6.2). A cor é desenvolvida quando o substrato da enzima é adicionado. A intensidade da cor é diretamente proporcional à concentração dos antígenos presentes na amostra da solução (Lim, 2010; Monaci *et al.*, 2011).

6.1.4 Ensaio *sandwich*

Relativamente ao ELISA *sandwich* consiste num anticorpo de captura imobilizado numa fase sólida, que é usualmente uma microplaca. As proteínas específicas da amostra são capturadas pelo primeiro anticorpo e detetadas por um segundo anticorpo específico da proteína, marcado com enzima, que se liga ao analito, formando uma *sandwich*. O substrato posteriormente adicionado reage com a enzima marcada no segundo anticorpo produzindo uma coloração (figura 6.2). A absorção medida é diretamente proporcional à concentração do analito (Lim, 2010; Monaci *et al.*, 2011). Este ensaio é o formato mais comum para a deteção de alérgenos em alimentos (Schubert-Ullrich *et al.*, 2009).

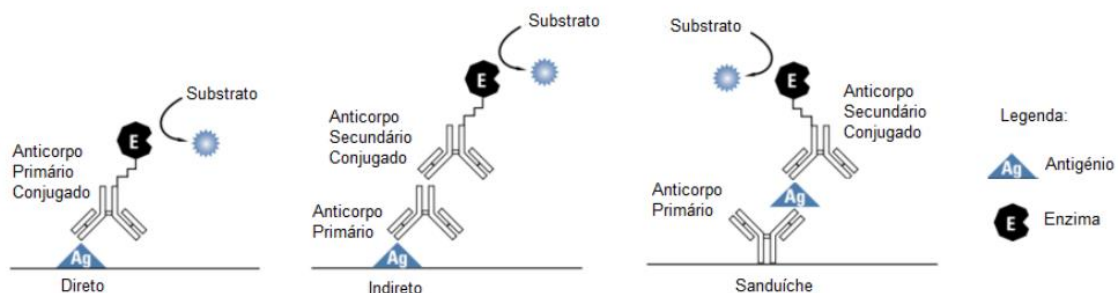


Figura 6.2 - Tipos de ELISA (adaptado de Cultek. 2017)

7 Validação do método

A validação deste método passa por uma verificação do método de acordo com o procedimento internacional *Guidelines for Method Validation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays applied to Food Samples* aplicado no laboratório SGS. O método foi assim verificado nos seguintes parâmetros: Curva de calibração, Limite de deteção (LOD) e Limite de quantificação (LOQ), Repetibilidade, Precisão intermédia e Exatidão através de ensaios de comparação.

7.1 Determinação da Curva de Calibração

Para os métodos ELISA semi-quantitativos, é necessário estabelecer uma curva de calibração para o cálculo da concentração das amostras medidas posteriormente. Quando se utilizam kits ELISA comercialmente disponíveis, os padrões para a preparação da curva de calibração estão incluídos no kit (SGS, 2014). A curva de calibração deve apresentar os dados estatísticos de intersecção, da equação da regressão linear e o coeficiente de correlação. Assim, torna-se necessário o uso de um número suficiente de soluções-padrão para definir adequadamente a relação entre a concentração e a resposta. O gráfico analítico pode ser construído usando-se, no mínimo, cinco valores de concentração enquadrados no intervalo definido (Brito *et al.*, 2003).

7.1.1 Gama de trabalho

O intervalo de trabalho corresponde à faixa de concentrações utilizada para avaliar a precisão e exatidão do método (Brito *et al.*, 2003). A gama de trabalho deve ser fixada pela confirmação de que o método analítico fornece a precisão e resultados precisos quando aplicados em amostras com uma quantidade mensurável dentro ou nos extremos da gama do método validado. A gama já está definida pelo fornecedor de acordo com os padrões disponíveis pelo Kit. A faixa de concentrações utilizada é: 0; 2,5; 7,5; 22,5; 67,5 ppm. Com leitura da absorvância a 450 nm. (SGS, 2014).

7.1.2 Linearidade

A linearidade refere-se à capacidade de o método produzir resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, enquadrados num intervalo analítico específico (Brito *et al.*, 2003). Para uma

curva de calibração linear, assume-se que a resposta do instrumento está linearmente relacionada com a concentração padrão para um intervalo limitado de concentração. Pode ser expresso como $y = a + bx$ (Shrivastava *et al.*, 2011). Contudo, um kit ELISA não tem uma resposta linear no sentido de ser diretamente proporcional porque o comportamento da interação antigénio-anticorpo não responde linearmente com a concentração de antigénio. Por esta razão foi utilizada uma curva polinomial não linear. Este parâmetro é avaliado através da reta de calibração e do valor do coeficiente de correlação linear, que para ser satisfatória, deve obter $R \geq 0,995$ (Brito *et al.*, 2003; SGS, 2014).

7.2 Determinação do limite de deteção e limite de quantificação

Limite de deteção e limite de quantificação são duas importantes características de desempenho na validação do método. O LOD (limite de deteção) e o LOQ (limite de quantificação) são termos usados para descrever a menor concentração de um analito que pode ser detetada e medida de forma confiável, respetivamente, por um procedimento analítico (Shrivastava *et al.*, 2011).

7.2.1 Limite de deteção

O LOD (limite de deteção) define-se como a menor concentração do analito que pode ser detetada, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas. No desenvolvimento de métodos novos ou modificados para análise, é definido LOD em termos do desvio padrão através da medição do branco, ou seja, de uma amostra que contém a mesma matriz, mas não contém o analito. O branco é constituído com todos os reagentes, exceto a amostra, reproduzindo as mesmas condições a que o analito estará sujeito durante a análise. O cálculo do LOD, utilizando o branco, permite avaliar mudanças ocorridas durante o desenvolvimento do método, ou para comparação de instrumentos (Brito *et al.*, 2003; SGS, 2014). O LOD é um ponto de concentração onde apenas a identificação qualitativa é possível, mas não a quantificação precisa. Sendo também a concentração a partir da qual é possível distinguir a presença do analito do ruído do equipamento. Para os métodos qualitativos, o LOD é definido como a concentração limiar em que o teste se torna pouco fiável (Taverniers *et al.*, 2004). O LOD é calculado através da seguinte fórmula (SGS, 2014):

$$LOD = k \times SD_r$$

sendo que o valor de k é 3,3 e o desvio padrão é calculado a partir das 6 medições utilizando a curva de calibração (SGS, 2014).

7.2.2 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LOQ) de um procedimento analítico é definido como a menor concentração medida a partir da qual é possível a quantificação do analito, sob as condições experimentais (Brito *et al.*, 2003) sendo este valor superior ao LOD (Taverniers *et al.*, 2004). O LOQ caracteriza-se pela sua capacidade de um processo de medição química para quantificar adequadamente um analito. A capacidade de quantificar é geralmente expressa em termos do valor do sinal ou analito (verdadeiro) que produzirá estimativas com um desvio padrão relativo especificado, normalmente 10 % (SGS, 2014). Este parâmetro é determinado utilizando o branco por uma fórmula semelhante à utilizada para determinar o limite de deteção, embora o valor de k seja igual a 10 (Taverniers *et al.*, 2004),

$$LOQ = k \times SD_r,$$

sendo que o valor de k é 10 e o desvio padrão (SD_r) é calculado a partir das 6 medições utilizando a curva de calibração (SGS, 2014).

7.3 Precisão

A precisão avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas na mesma amostra que é obtida aplicando o procedimento experimental um grande número de vezes a um conjunto de amostras homogéneas. A precisão de um método é a proximidade da concordância entre os resultados de ensaios independentes obtidos a partir de material de ensaio homogéneo analisado nas condições de utilização estipuladas (Fao & Consultation, 1998). A precisão pode ser avaliada ao nível de repetibilidade e de precisão intermédia (Brito *et al.*, 2003).

7.3.1 Repetibilidade

A precisão em condições de repetibilidade (SD_r) exprime a precisão de resultados obtidos por medições repetidas efetuadas sobre uma mesma amostra, sob as mesmas condições, tais como: mesmo laboratório, analista, equipamento, os reagentes e curtos intervalos de tempo. O valor para o limite de repetibilidade (r) é a diferença máxima tolerável absoluta entre dois resultados obtidos em circunstâncias quase idênticas de 95 % de nível de confiança. A repetibilidade pode ser calculada (SGS, 2014):

$$r = 2,8 \times SD_r$$

7.3.2 Precisão intermédia

A precisão intermédia (SD_R), também denominada de reprodutibilidade interna, refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como, diferentes analistas, diferentes equipamentos e diferentes dias. Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados num laboratório. Para determinar a precisão intermédia de um método, efetuam-se “n” medições duplicadas, ou em ensaio único, sobre a amostra, nas condições pré-definidas. A precisão intermédia pode ser calculada (SGS, 2014):

$$R = 2,8 \times SD_R$$

7.4 Exatidão

A exatidão é definida como a concordância entre o valor real do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico. Os quatro métodos principais para o estudo da exatidão são baseados no uso de material de referência certificado, na comparação do método com um método de referência, no uso de ensaios de recuperação na matriz e em estudos colaborativos (Brito *et al.*, 2003). No presente trabalho, para a validação do método a exatidão foi avaliada pelo uso de ensaios de comparação com o uso das mesmas amostras com leite noutra laboratório (SGS, 2014).

7.5 Fontes de incerteza

As fontes de incerteza associadas a este método estão identificadas na tabela 7.1, assim como a forma de serem ultrapassadas e/ou minimizadas.

Tabela 7.1 - Fontes de incerteza e a sua resolução

Fontes de incerteza	Resolução
Extração	
Toma da amostra representativa	Balança calibrada. Uso de pipetas calibradas para doseamento de soluções de extração. Uso de soluções certificadas pelo kit. Pessoal treinado e com experiência/formação.
Equipamento	
Leitor ótico	Calibração externa. Uso de soluções padrão com concentrações conhecidas em cada ensaio. Pessoal treinado e com experiência/formação.
ELISA	
Eficiência da reação	Uso de reagentes à temperatura ambiente. Kits validados, sensibilidade e limite de deteção pelo fornecedor. Uso de micropipetas calibradas.
Estabilidade dos reagentes	Proteção da luz.

8 Metodologia Experimental

A implementação e validação da determinação de leite pelo método imunoenzimático ELISA no laboratório SGSMultilab destina-se a todos os produtos alimentares não processados e processados. Alimentos não processados são alimentos que são colhidos ou concebidos no seu estado natural, como por exemplo, o arroz. Por sua vez, alimentos processados são produtos que sofreram uma série de operações mecânicas ou químicas para modificá-lo ou preservá-lo, como por exemplo, as bolachas.

Neste processo de implementação e validação do método foi utilizado o kit comercial RIDASCREEN®FAST MILK para a extração e determinação de leite. Este possui todos os reagentes necessários para a extração de leite de uma matriz complexa como a matriz alimentar. RIDASCREEN®FAST é um ELISA em sandwich que deteta as duas principais proteínas alergénicas no leite: caseína e β -lactoglobulina. Eles são detetados independentemente por anticorpos específicos. Os resultados do ensaio são quantitativos quando a amostra contém leite ou leite em pó por intermédio de uma curva de calibração. O método pode ser aplicado para a determinação de proteínas do leite em biscoitos, fórmulas infantis, gelados, salsichas, entre outros. O RIDASCREEN®FAST permite a execução de um método de rápida triagem, simples e sensível que pode ajudar a reduzir o perigo de casos alérgicos de alimentos mal rotulados ou contaminados.

O princípio do teste consiste numa microplaca que está revestida com anticorpos específicos para caseínas e β -lactoglobulinas. Por adição de padrões e amostras aos poços, a proteína de leite presente irá ligar-se aos anticorpos específicos. Numa etapa de lavagem, os componentes não ligados são removidos. O anticorpo conjugado com peroxidase é adicionado. É formado um complexo Anticorpo-Antigénio-Anticorpo (*sandwich*). Qualquer componente não ligado é então removido num passo de lavagem. A deteção da proteína do leite ocorre através da adição de substrato / cromogénico para a enzima peroxidase. O conjugado enzimático converte o cromogénico num produto azul. A adição da solução de STOP leva a uma alteração de cor para amarelo. A medição é feita fotometricamente a 450 nm. A absorção é proporcional à concentração de proteínas do leite da amostra. O resultado é expresso em mg/kg de proteína de leite.

8.1 Equipamentos

Todos os equipamentos são registados no sistema informático. Toda a documentação relacionada com instruções, certificados, impressos de aceitação e registos de manutenção e verificação/calibração está armazenada num caderno afeto aos equipamentos de acordo com a sua identificação. Por predefinição, as calibrações dos equipamentos (onde é aplicável) são feitas anual ou bi-anualmente.

Para leitura da densidade ótica do ensaio de ELISA foi utilizado um leitor de ELISA (figura 8.1). Os resultados da absorvância referentes à densidade ótica são posteriormente convertidos em concentração. O equipamento possui uma calibração externa. Devido ao uso de padrões é feita uma calibração interna sempre que se faz o ensaio, através da qual quantificamos a proteína de leite, se estiver presente na amostra numa concentração igual ou superior ao LOD (limite de deteção).



Figura 8.1 - Leitor ótico r-bioharp

Foi utilizada uma balança (figura 8.2) para a pesagem de toma representativa da amostra homogeneizada e/ou moída. A calibração é verificada mensalmente.

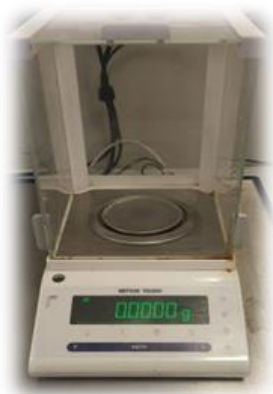


Figura 8.2 - Balança METTLER TOLEDO Modelo MS204S/01

Neste procedimento foram usadas 3 micropipetas da Bio-Rad (figura 8.3). Uma é dedicada para o uso de volumes maiores (100 a 1000 μL) no processo de extração na etapa de preparação da amostra. Outra micropipeta de volumes menores (10 a 100 μL) é usada no teste imunoenzimático. A micropipeta multi-canal é usada no processo de lavagem. Todas, exceto a multi-canal que serve exclusivamente para lavagem, são calibradas bi-anualmente até prova em contrário, i.e., quando existe um histórico suficiente para verificar a estabilidade das pipetagens, caso em que poderá ser diminuída, ou não, a periodicidade das calibrações.



Figura 8.3 - Micropipetas Transferpette ®: multi-canal (esquerda), 100-1000 μL (centro) e 10 a 100 μL (direita)

Para agitação das amostras no processo de extração das proteínas do leite recorreu-se a um agitador (figura 8.4). A centrífuga (figura 8.5) foi utilizada para separar as partículas sólidas do sobrenadante onde está o leite.

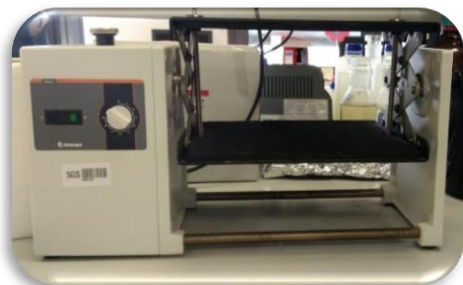


Figura 8.4 - Agitador Heidolph



Figura 8.5 - Centrífuga Universal 320R

Quando as amostras necessitavam de moagem era utilizada uma Picadora 1-2-3 Clássica Moulinex® Modelo A320R1 (figura 8.6). A higienização deste equipamento era efetuada utilizando etanol de modo a evitar a adição de interferentes e contaminações.



Figura 8.6 - Picadora 1-2-3 utilizada no laboratório SGS

O equipamento Multistirrer magnetic stirrer (figura 8.7) foi utilizado para colocar as amostras em banho de água com temperaturas controladas.



Figura 8.7 - Multistirrer magnetic stirrer

8.2 Reagentes e Preparação de soluções

8.2.1 Reagentes

O kit (figura 8.8) utilizado era constituído pelos seguintes componentes: Microplaca com 48 poços revestida com anticorpos anti-caseína e anti- β -lactoglobulina, Cinco padrões, um de 0; 2,5; 7,5; 22,5 e 67,5 mg/kg de proteína do leite em solução aquosa prontas para uso; solução de conjugado, uma mistura de anti-caseína marcada com peroxidase de rábano e conjugado de anticorpo anti- β -

lactoglobulina concentrado 11x; tampão de conjugado; extractor 2 concentrado 2x; tampão de extração de alergénios concentrado de 10x; tampão de lavagem com um concentrado de 10x, substrato / cromogéneo, solução STOP e Aditivo 1 a ser dissolvida no tampão de extração de alergénios.

Foram utilizados dois reagentes adicionais, o Hidróxido de sódio 1 M (NaOH) e o Ácido clorídrico 1 M (HCl).



Figura 8.8 - Kit RIDASCREEN®FAST MILK

Todos os reagentes devem ser colocados à temperatura ambiente (20-25 °C) antes da utilização e após a utilização devem ser imediatamente colocados a 2-8 °C. A maioria dos reagentes e tampões são geralmente mantidos a esta temperatura para garantir a estabilidade por maior período de tempo. No entanto, eles precisam de ser levados à temperatura ambiente antes da utilização, uma vez que as temperaturas baixas diminuem a ligação do anticorpo-antígeno.

Os poços não podem secar entre os passos da análise pois a reprodutibilidade em qualquer ELISA depende em grande parte da consistência com a qual os poços são lavados. Durante todas as incubações deve-se evitar a luz solar direta e é recomendada a cobertura das microplacas. A reação do substrato / cromogéneo deve ser realizada no escuro.

Deve-se ter cuidado com o manuseamento do reagente Extractor 2, (necessário para a preparação da amostra, contém β -mercaptoetanol) e com a solução STOP (contém ácido sulfúrico 1 N) devendo evitar o contato com a pele e olhos.

8.2.2 Preparação de reagentes

O **tampão de extração alergénio** é fornecido como um concentrado de 10x. Antes da diluição, dissolver os cristais formados por aquecimento (banho de água a 37 °C) e misturar bem. Diluir o concentrado aquecido 1:10 com água destilada (por exemplo, concentrado de 100 mL + 900 mL de água destilada). O tampão de extração de alergénio diluído pode ser usado durante 12 semanas se for armazenado a 2-8 ° C.

Para a preparação do **tampão de extração de alergénio contendo o aditivo 1** (tampão A-AEP), pesou-se 1,35 g de Aditivo 1 em um copo de vidro e adicionou-se 15 mL de NaOH 1 M, mexendo até que o Aditivo 1 seja dissolvido. Adicionar a solução 15 mL de Aditivo 1 a 700 mL de tampão de extração de alergénio diluído no copo de vidro (gobelé), mexendo constantemente. Ajustou-se o tampão A-AEP para pH 9,0 com HCl 1 M e diluiu-se para 750 mL com tampão de extração de alergénio diluído (750 mL de tampão A-AEP é suficiente para 45 amostras).

O tampão pode ser usado durante 3 semanas à temperatura ambiente (20-25 °C) ou durante 8 semanas a 2-8 °C (se os cristais precipitarem, o tampão deve ser descartado).

O **Extractor 2** foi fornecido e teve que ser diluído 1/2 com água destilada (por exemplo, 50 mL Extractor 2 + 50 mL de água destilada). A solução Extractor 2 diluída é suficiente para 55 amostras e pode ser usada durante 3 meses à temperatura ambiente (20-25 °C).

O **tampão de lavagem** fornecido está concentrado 10x. Antes de ser utilizado, o tampão tem que ser diluído 1/10 com água destilada (por exemplo, 100 mL de concentrado de tampão + 900 mL de água destilada).

O tampão diluído é estável a 2-8 °C durante 4 semanas. Antes da diluição, dissolver completamente quaisquer cristais formados em banho-maria a 37 °C.

O **conjugado** (anticorpo ligado à enzima peroxidase) fornecido está concentrado de 11x. Como a solução de conjugado enzimático diluído tem uma estabilidade limitada, apenas a quantidade necessária deve ser diluída imediatamente antes do teste ELISA. Agitou-se cuidadosamente o conjugado concentrado antes de diluir. Para reconstituição, o conjugado concentrado foi diluído 1/11 com tampão de diluição conjugado (por exemplo, 200 µL de concentrado + 2 mL de tampão, suficiente para 2 tiras de microplaca, que equivale 16 poços).

8.2.3 Preparação da amostra

A possibilidade de uma contaminação cruzada durante a preparação da amostra pode proporcionar falsos positivos que não estão associados à técnica analítica. Esta questão torna-se mais crítica nos imunoensaios mais sensíveis.

A prevenção da contaminação cruzada durante a preparação da amostra deve fazer parte das boas práticas de laboratório e deve incluir a manipulação adequada da amostra, assegurando a limpeza de todo o material utilizado e a calibração do equipamento.

Primeiramente homogeneizou-se uma quantidade representativa da amostra, ou seja, uma porção suficientemente representativa da amostra original (5-50 g).

A amostra foi moída num moinho previamente limpo e seco. Esta tarefa foi realizada na sala de preparação de amostras à entrada do departamento de Química. Depois de trituração, a amostra foi colocada num coletor estéril, bem vedado e armazenado até à sua destruição.

Para amostras sólidas pesou-se 1 g de amostra e adicionar 4 mL de Extractor 2 diluído. Misturar vigorosamente, fechar o frasco e colocar durante 10 minutos a 100 °C em banho de água. Deixar a amostra arrefecer e adicionar 16 mL de tampão A-AEP pré-aquecido a 60 °C na amostra cozida. Amostras líquidas para 1 mL de amostra, adicionar 4 mL de Extractor 2 diluído. Misturar vigorosamente, fechar o frasco e colocar durante por 10 minutos a 100 °C em banho-maria. Deixar a amostra arrefecer e adicionar 15 mL de tampão A-AEP pré-aquecido a 60 °C na amostra cozida.

Preparação adicional para amostras sólidas e líquidas - Misturar vigorosamente (agitador) e extrair durante 10 min a 60 °C em banho de água. Arrefecer as amostras até à temperatura ambiente (por exemplo, em água gelada) e centrifugar durante 10 minutos a 2500 x g à temperatura ambiente. Filtrar o sobrenadante com papel de filtro. Diluir a amostra 1/5 com tampão de extração de alergénio anteriormente diluído sem o Aditivo 1 (por exemplo, amostra de 100 µL + 400 µL de tampão de extração de alergénio diluído, o fator de diluição final é de 100). Usar 100 µL desta diluição no microplaca diretamente.

8.2.4 Análise - Ensaio imunoenzimático

Depois de extraído e diluído, o extrato foi usado para o ensaio imunoenzimático. Todos os reagentes e amostras devem estar a temperatura ambiente. O processo iniciou-se com adição de 100 µL dos padrões e amostras nos poços respetivos. Estes foram submetidos a uma breve e cuidada agitação e incubados durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, todas as soluções foram

descartadas e todos os poços foram lavados com 250 μL solução lavagem (4x). Depois de lavados, adicionou-se 100 μL de conjugado diluído 1/11 a todos os poços. Estes foram submetidos a uma breve agitação e incubados durante 10 minutos à temperatura ambiente. O passo de lavagem foi repetido, como descrito anteriormente, e adicionou-se 100 μL de solução de substrato/cromogéneo, deixando incubar durante 10 minutos à temperatura ambiente protegido da luz, devido à fotossensibilidade do substrato/cromogéneo. Para finalizar a reação, adicionou-se 100 μL de solução STOP, que irá originar uma mudança de cor para permitir a leitura a 450 nm.

8.2.5 Interpretação de resultados

O cálculo deve ser feito usando uma função de spline cúbica. Ao trabalhar de acordo com a preparação da amostra descrita, o fator de diluição final é 100. Neste caso, a concentração da proteína do leite pode ser lida diretamente da curva de calibração. O fator de diluição da amostra de 100 já é tido em consideração para as concentrações dos padrões. Para diluições de amostras superiores a 1/100, o fator de diluição adicional deve ser considerado para o cálculo da concentração de proteína do leite.

Uma diluição adicional e uma nova deteção das amostras são recomendadas para os valores de absorvância (a 450 nm) superiores ao padrão 5 (67,5 mg/kg). As amostras devem ser diluídas para que os resultados possam ser lidos dentro da curva de calibração. A extrapolação fora do intervalo de calibração não é recomendada. Os resultados são relatados em miligramas de proteínas do leite por quilograma ou litro de alimentos. O leite contém aproximadamente 3,2 % de proteína do leite. Assim, uma amostra que contém 1 mg/kg de proteína do leite corresponde a um teor de leite de aproximadamente 32 mg/kg.

8.3 Controlo dos parâmetros

Os seguintes parâmetros precisam de ser controlados durante o procedimento para garantir uma análise bem sucedida.

Um ponto crítico é evitar a contaminação cruzada durante o uso das microplacas, onde os poços adjacentes podem ficar contaminados, como por exemplo, durante a pipetagem e agitação manual excessiva nos períodos de incubação. Além disso, é estritamente necessário evitar tocar nos poços de modo a não levar à remoção do anticorpo ou antígeno de revestimento.

As amostras e os padrões devem ser distribuídos simultaneamente nos poços correspondentes, se possível, de modo a que todas as amostras sejam incubadas durante o mesmo período de tempo.

O uso de agitadores aumenta a exposição de antígenos a anticorpos que favorecem a ligação antigénio-anticorpo. Além disso, eles aumentam a distribuição homogénea do analito ou anticorpo em solução, o que aumenta a reprodutibilidade da amostra.

A formação de bolhas de ar deve ser evitada durante o procedimento, uma vez que estas afetam a medição do sinal.

9 Resultados e discussão

Para a validação do método segundo as *guidelines* aplicadas na SGS, o primeiro passo foi proceder à realização da curva de calibração para o cálculo da concentração das amostras medidas posteriormente. Para a realização da curva de calibração foram utilizados os padrões que estavam incluídos no kit. Realizaram-se ensaios distintos, em dias diferentes, onde foi feita a leitura da absorvância a 450 nm dos padrões de diferentes concentrações (0; 2,5; 7,5; 22,5; 67,5 ppm) e em cada ensaio foi feita a leitura do branco, constituído com todos os reagentes exceto a amostra, em duplicado para calcular posteriormente o LOD e LOQ.

Na tabela 9.1 estão representados as absorvâncias obtidas para cada padrão de concentrações diferentes. A partir da concentração conhecida dos padrões e da sua leitura, obtiveram-se os gráficos que estão representados nas figuras 9.1, 9.2 e 9.3. Todos os gráficos representam uma curva calibração não linear, nomeadamente uma polinomial de 3º grau, ou seja, ax^3+bx^2+cx+d , por ser a que se melhor ajustava à variação da concentração. Utilizando uma regressão linear verificou-se que em certos intervalos de crescimento de densidade ótica não é feito de igual forma, ou seja, não existe uma regressão linear perfeita entre as duas grandezas (concentração/densidade ótica). Deste modo, através de uma regressão polinomial do 3º grau verificou-se a obtenção de um $R > 0,995$ em todos os ensaios, o que vai de encontro com o critério de aceitação ($R > 0,995$). Em todos os ensaios o desvio entre a concentração do padrão e a concentração calculada, ou seja, a concentração real, deve ser inferior a $\pm 20\%$. Na tabela 9.1 verifica-se que o padrão 2,5 ppm de cada ensaio é superior a 20%. No entanto, verificou-se um desvio entre as absorvâncias inferior a 20% nos restantes padrões (concentração real *versus* concentração teórica). Segundo o laboratório da SGS pode-se admitir que a gama do kit se encontra ajustada.

Tabela 9.1 - Absorvâncias lidas do respetivo padrão e cálculo da concentração real dos três ensaios distintos

	Concentração do Padrão (ppm)	Absorvância lida (450 nm)	Concentração Real (ppm)	% Desvio concentração real vs concentração teórica
1 Ensaio	0	0,324		
	2,5	0,373	1,8	-28
	7,5	0,630	7,7	2,7
	22,5	1,372	22,5	0
	67,5	2,298	67,5	0
2 Ensaio	0	0,261		
	2,5	0,276	1,6	-36
	7,5	0,421	7,6	1,3
	22,5	1,156	22,5	0
	67,5	2,110	67,5	0
3 Ensaio	0	0,448		
	2,5	0,487	1,9	-24
	7,5	0,666	7,7	2,7
	22,5	1,232	22,5	0
	67,5	1,961	67,5	0

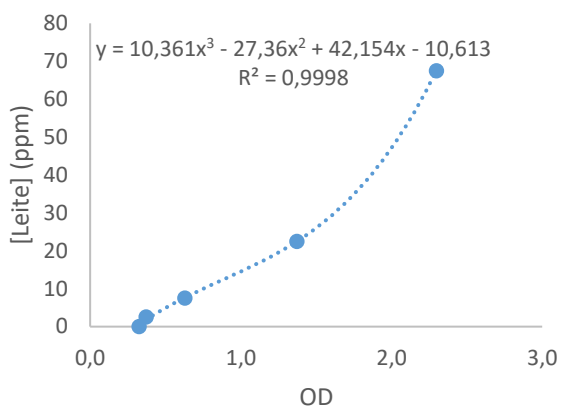


Figura 9.1 - Curva de Calibração do 1º Ensaio

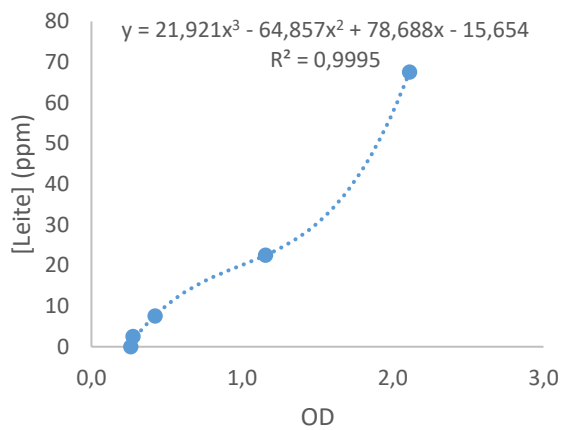


Figura 9.2 - Curva de Calibração do 2º Ensaio

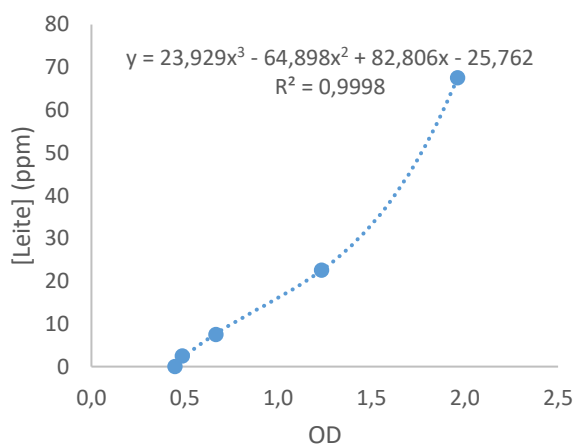


Figura 9.3 - Curva de Calibração do 3º Ensaio

Seguidamente, verificou-se o LOD e o LOQ do kit, onde foi calculado o desvio padrão de 6 brancos em condições de precisão intermédia, ou seja, em duplicado em dias distintos (tabela 9.2).

Tabela 9.2 - Absorvância do Branco

Absorvância lida (450 nm)				Desvio	LOD $LOD = 3,3 \times 0,0703$	LOQ $LOQ = 10 \times 0,0703$
Branco	0,593	0,621	0,448	0,0703	0,232	0,703
	0,497	0,619	0,552			

Através das equações obtidas nas curvas de calibração dos 3 ensaios (figura 9.1, 9.2 e 9.3) calculou-se a média da concentração real.

Verificou-se neste kit que em condições de precisão intermédia, utilizando a leitura dos brancos, o LOD com a absorvância de 0,232 corresponde a 4,18 mg/kg e o LOQ com absorvância de 0,703 a 11,0 mg/kg de proteína de leite. Estes parâmetros indicam a concentração a partir da qual é possível detetar ou quantificar o analito em análise. Deste modo, o LOD e o LOQ encontram-se validados nestas condições de execução do método.

Para estudar o parâmetro da repetibilidade e reprodutibilidade foi necessário a escolha de um alimento. A seleção deste tornou-se difícil, uma vez que é utilizada uma gama de concentrações de baixa quantidade, ou seja, ppm. Deste modo, o alimento escolhido teria que conter uma quantidade vestigial de leite. Assim, a matriz escolhida foi um produto processado derivado de cereais, nomeadamente a bolacha.

Para proceder ao estudo a amostra foram realizados uma série de ensaios utilizando várias diluições da amostra de modo a que o valor obtido se encontre dentro da curva de calibração. Dos resultados obtidos selecionou-se a diluição 1/5.

De modo a estudar a repetibilidade do método, para a amostra em estudo, foram realizadas 6 determinações e calculadas as concentrações de analito presentes, assim como o respetivo valor médio, desvio e limite de repetibilidade.

Visto a repetibilidade e reprodutibilidade ter sido analisada posteriormente aos outros parâmetros, sendo que também a matriz foi analisada em dias diferentes, foram preparadas novas curvas de calibração, resultando em $y=4,75x^3-12,498x^2+28,28,697x-10,969$ ($R^2=0,9999$) no primeiro ensaio e $y=4,744$

Tabela 9.3 - Repetibilidade através do cálculo da Concentração Real para cada amostra

	Absorvância lida (450 nm)	Concentração (ppm)	Fator de diluição	Concentração Real (ppm)
Amostra	1,143	12,5	5	62,5
Amostra	1,083	11,4	5	57,0
Amostra	0,934	8,8	5	44,0
Amostra	1,018	10,3	5	51,5
Amostra	1,053	10,9	5	54,5
Amostra	1,056	10,9	5	54,5
Média				54,0
Desvio padrão				6,1
Repetibilidade				17,1

Analisando a tabela 9.3 verifica-se que a repetibilidade foi de 17,1 mg/kg, isto é, a diferença absoluta entre futuros resultados de ensaios em duplicado, obtidos em condições de repetibilidade, não deverá exceder o valor de 17,1 mg/kg.

Tabela 9.4 - Reprodutibilidade através do cálculo da Concentração Real para cada amostra

	Absorvância lida (450 nm)	Concentração (ppm)	Fator de diluição	Concentração Real (ppm)
Amostra	1,143	12,5	5	62,5
Amostra	1,083	11,4	5	57,0
Amostra	0,934	8,8	5	44,0
Amostra	1,018	10,3	5	51,5
Amostra	1,053	10,9	5	54,5
Amostra	1,056	10,9	5	54,5
Amostra	0,799	7,9	5	39,5
Amostra	0,751	6,9	5	34,5
Amostra	0,857	9,1	5	45,5
Amostra	0,802	8,0	5	40,0
Amostra	0,768	7,3	5	36,5
Amostra	0,857	9,1	5	45,5
Média				47,1
Desvio padrão				8,8
Reprodutibilidade				24,7

A reprodutibilidade foi avaliada através de dados que foram recolhidos em dias diferentes (ensaio representado na tabela 9.4), calculando o limite associado à reprodutibilidade através do desvio foi de 24,7 mg/kg. Estes valores foram aceites uma vez que o valor da repetibilidade tem de ser inferior ao valor de reprodutibilidade ($17,1 \text{ mg/kg} < 24,7 \text{ mg/kg}$).

A exatidão foi avaliada pelo uso de ensaios de comparação com o uso das mesmas amostras com leite utilizada nos parâmetros repetibilidade e reprodutibilidade noutra laboratório subcontratado. O valor obtido pelo laboratório foi de 50,7 ppm de proteína total de leite por ELISA que se encontra no Anexo

I. Este valor encontra-se próximo do valor médio obtido no laboratório SGSMultilab que foi 47,1 ppm. Este valor foi aceite uma vez que a média da concentração real obtida no laboratório (47,1 ppm) está próximo do valor obtido do laboratório subcontratado (50,7 ppm).

10 Conclusão

As alergias e intolerâncias alimentares têm adquirido uma elevada importância na sociedade devido à sua crescente prevalência e ao forte impacto na vida da população. Para a maioria das pessoas o consumo de alimentos não representa qualquer perigo. Contudo, noutros casos, este consumo pode causar alergias alimentares e restringir dramaticamente a qualidade de vida. Os cientistas estimam que aproximadamente 1 a 2 % dos adultos e até 8 % das crianças sofram de alergias alimentares, bem como um grande número de pessoas tenham intolerâncias alimentares. As alergias alimentares são altamente perigosas para os pacientes e são causadas por proteínas que provocam reações imunológicas. As reações adversas alimentares resultam da ingestão de um alimento ou seus constituintes. Estas podem ter uma causa imunológica e serem desencadeadas por anticorpos IgE ou podem resultar de mecanismos imunológicos desencadeados por células ou outros mediadores do sistema imunológico. Por sua vez, as reações adversas sem causa imunológica representam o grupo das intolerâncias alimentares.

A aplicação do Regulamento (UE) N.º 1169/2011 tem como base a obrigação e responsabilidade dos operadores do setor alimentar de informarem sobre as substâncias suscetíveis de provocar alergia ou intolerância alimentar utilizadas no fabrico ou preparação de um género alimentício e que continuem a existir no produto final, com o intuito de ajudar o consumidor a tomar decisões informadas e facilitar escolhas alimentares conscientes.

O leite é um alimento que faz parte da alimentação de crianças e adultos de todas as idades, não só por ser um alimento com boas propriedades organolépticas e nutricionais, mas também porque o consumo acarreta inúmeras vantagens para a saúde humana. Contudo, é um dos alimentos que desencadeia maior número de casos de reações alimentares adversas. Assim surge a importância deste trabalho que consiste na deteção e quantificação de leite pelo método ELISA. O ELISA tem sido usado como ferramenta de controlo de qualidade em indústrias alimentares devido ao seu baixo custo, facilidade de manuseamento e obtenção de resultados fiáveis em poucas horas.

Com base nos resultados obtidos segundo as *Guidelines for Method Validation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays applied to Food Samples* aplicadas na empresa quanto aos procedimentos de validação dos métodos de ELISA, pode concluir-se que foi possível a implementação e validação do método para a deteção e quantificação de leite em matrizes alimentares na empresa SGS Portugal, S.A.

Face aos resultados obtidos, em que se exclui sempre o segundo padrão de cada ensaio, e para a implementação do método segundo a *Guidelines for Method Validation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays applied to Food Samples* é obrigatoriamente necessário os 5 padrões, propõe-se como perspectivas futuras, a alteração de fabricante ou alteração do Kit de modo obter resultados de acordo com *Guidelines for Method Validation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays applied to Food Samples* aplicada na empresa SGS Portugal, S.A.

Bibliografia

- Achouri, A., & Boye, J. I. (2013). Thermal processing , salt and high pressure treatment effects on molecular structure and antigenicity of sesame protein isolate. *Food Research International*, 53(1), 240–251. doi.org/10.1016/j.foodres.2013.04.016
- Adams, J. J., Anderson, B. F., Norris, G. E., Creamer, L. K., & Jameson, G. B. (2006). Structure of bovine β -lactoglobulin (variant A) at very low ionic strength. *Journal of Structural Biology*, 154(3), 246–254. doi.org/10.1016/J.JSB.2005.12.010
- Ambifood. (2017). *Alergêneos Resumo dos produtos da R-Biopharm*. Porto.
- Battaglia, F. (2008). *Analysis of Allergenic Proteins by Mass Spectrometry*. Dissertação para obtenção do Grau de Doutorado em Bioquímica e Biotecnologia. Università degli Studi di Padova Centro.
- Bernard, H., Creminon, C., Negroni, L., Peltre, G., & Wal, J.-M. (1999). IgE Cross-reactivity with Caseins from Different Species in Humans Allergic to Cow's Milk. *Food and Agricultural Immunology*, 11(101–111). doi.org/10.1080/09540109999960
- Boyce, J. A., Finkelman, F., Shearer, W. T., Vercelli, D., & Lack, G. (2014). Mechanisms of allergic diseases Update on risk factors for food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129(5), 1187–1197. doi.org/10.1016/j.jaci.2012.02.036
- Brito, N. M., Junior, O. D. P. A., Polese, L., & RIBEIRO, M. L. (2003). Validação De Métodos Analíticos: Estratégia E Discussão. *Pesticidas: R.Ecotoxicol. E Meio Ambiente*, 13, 129–146. doi.org/10.5380/pes.v13i0.3173
- Cawthorn, K. M., Permyakov, E., & Berliner, L. J. (1996). Membrane-bound states of alpha-lactalbumin: implications for the protein stability and conformation. *Protein Science*, 5(7), 1394–405. doi.org/10.1002/pro.5560050718
- Cianferoni, A., & Spergel, J. M. (2009). Food Allergy: Review, Classification and Diagnosis. *Allergology International*, 58(4), 457–466. doi.org/10.2332/allergolint.09-RAI-0138
- Claeys, W. L., Verraes, C., Cardoen, S., De Block, J., Huyghebaert, A., Raes, K., Dewettinck, K., & Herman, L. (2014). Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control*, 42, 188–201. doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.045
- Cohen, S. G. (2008). The Allergy Archives: Pioneers and Milestones Sheldon. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, (June), 1521–1524.e1. doi.org/10.1016/j.jaci.2009.08.032
- Contador, R., Delgado, F. J., Garrido, M., & Ramírez, R. (2015). Volatile profile of breast milk subjected to high-pressure processing or thermal treatment. *Food Chemistry*, 180, 17–24. doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.019
- Dabrowski, W. M., & Sikorski, Z. E. (2004). *Toxins in food*. Kucharska, E., (eds) CRC Press. Polónia. 105-120.
- Damage, I. M. (2017). Mecanismos de dano imunológico. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 23(458), 458–463. doi.org/10.1016/S0716-8640(12)70336-X
- Downs, M. L., Baumert, J. L., Taylor, S. L., & Mills, E. N. C. (2016). Mass spectrometric analysis of allergens in roasted walnuts. *Journal of Proteomics*, 142, 62–69. doi.org/10.1016/j.jprot.2016.04.045
- Downs, M. L., & Taylor, S. L. (2010). Effects of thermal processing on the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detection of milk residues in a model food matrix. *Journal of Agricultural and Food*

Chemistry, 58(18), 10085–10091. doi.org/10.1021/jf101718f

- Ecker, C., Ertl, A., Pulverer, W., Nemes, A., Szekely, P., Petrasch, A., Linsberger-Martin, G., & Cichna-Markl, M. (2013). Validation and comparison of a sandwich ELISA, two competitive ELISAs and a real-time PCR method for the detection of lupine in food. *Food Chemistry*, 141(1), 407–418. doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.091
- Cultek. (2017). Protocolo y Técnicas. Fundamentos y Tipos de ELISAs. Disponível em <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-ELISA-protocolos.pdf> Consultado a 9 de junho 2017
- European Food Safety Authority. (2014). Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes. *EFSA Journal*, 12(11), 3894. doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3894
- Fao, J., & Consultation, I. E. (1998). Validation Of Analytical Methods For Food Control A Report of a Joint FAO / IAEA Expert Consultation, (December 1997).
- Farrell, H. M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., L., Hollar, C.M., Ng-Kwai-Hang, K.F., & Swaisgood, H. E. (2004). Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. *Journal of Dairy Science*, 87(6), 1641–1674. doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73319-6
- Fiocchi, A., Brozek, J., Schünemann, H., Bahna, S. L., Berg, A. Von, Beyer, K., Bozzola, M., Bradsher, J., Brozek, J., Compalati, E., Ebisawa, M., Guzmán, M.A., Li, H., Heine, R.G., Keith, P., Lack, G., Landi, M., Martelli, A., Rancé, F., Sampson, H., Stein, A., Terracciano, L., & Vieths, S. (2010). World allergy organization (WAO) diagnosis and rationale for action against cow's milk allergy (DRACMA) guidelines. *Pediatric Allergy and Immunology*, 21(SUPPL. 21), 1–125. doi.org/10.1111/j.1399-3038.2010.01068.x
- Fox, P. F., & Brodtkorb, A. (2008). The casein micelle : Historical aspects , current concepts and significance. *International Dairy Journal*, 18, 677–684. doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.002
- Galan-Malo, P., López, M., Ortiz, J.-C., Pérez, M. D., Sánchez, L., Razquin, P., & Mata, L. (2017). Detection of egg and milk residues on working surfaces by ELISA and lateral flow immunoassay tests. *Food Control*, 74, 45–53. doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.11.027
- Gupta, R., Holdford, D., Bilaver, L., Dyer, A., Holl, J. L., & Meltzer, D. (2013). The economic impact of childhood food allergy in the United States. *JAMA Pediatrics*, 167(11), 1026–31. doi.org/10.1001/jamapediatrics.2013.2376
- Hochwallner, H., Schulmeister, U., Swoboda, I., Balic, N., Geller, B., Nystrand, M., Härlin, A., Thalhamer, J., Scheiblhofer, S., Niggemann, B., Quirce, S., Ebner, C., Mari, A., Pauli, G., Herz, U., Van Tol, E. A.F., Valenta, R., & Spitzauer, S. (2010). Microarray and allergenic activity assessment of milk allergens. *Clinical and Experimental Allergy*, 40(12), 1809–1818. doi.org/10.1111/j.1365-2222.2010.03602.x
- Hochwallner, H., Schulmeister, U., Swoboda, I., Spitzauer, S., & Valenta, R. (2014). Cow's milk allergy: From allergens to new forms of diagnosis, therapy and prevention. *Methods*, 66(1), 22–33. doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.08.005
- Holck, A. L., Diaz-Amigo, C., Kerbach, S., Popping, B., Mustorp, S., & Axelsson, C. E. (2011). Detection of allergens in food. *Current Topics on Food Authentication*, (January), 173–210.
- Jackson, L. S., Al-Taher, F. M., Moorman, M., DeVries, J. W., Tippett, R., Swanson, K. M. J., Fu, T., Salter, R., Dunaif, G., Estes, S., Albillos, S., & Gendel, S. M. (2008). Cleaning and other control and validation strategies to prevent allergen cross-contact in food-processing operations. *Journal*

- of Food Protection*, 71(41), 445–458. doi.org/10.4315/0362-028X-71.2.445
- Jarvinen, K.M., & Suomalainen, H. (2001). Development of cow's milk allergy in breast-fed infants. *Clinical and Experimental Allergy*, 31, 978–987. doi.org/10.1046/j.1365-2222.2001.01151
- Ji, J., Zhu, P., Pi, F., Sun, C., Sun, J., Jia, M., Ying, C., Zhang, Y., & Sun, X. (2016). Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous detection of the main milk allergens. *Food Control*, 74, 79–88. doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.11.030
- KPL, I. (2005). Technical Guide for ELISA, pp. 1–39. Gaithersburg.
- Kruif, C. G. De, Huppertz, T., Urban, V. S., & Petukhov, A. V. (2012). Casein micelles and their internal structure. *Advances in Colloid and Interface Science*, 171–172, 36–52. doi.org/10.1016/j.cis.2012.01.002
- Lequin, R. M. (2005). Enzyme Immunoassay (EIA)/ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), 2418, 2415–2418. doi.org/10.1373/clinchem.2005.051532
- Lim, P. W. (2010). *Development Of An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) For The Detection Of Pistachio Residues In Processed Foods*. University of Nebraska.
- Lima, C. D. L. C., Lima, L. A., Cerqueira, M. M. O. P., Ferreira, E. G., & Rosa, C. A. (2009). Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária E Zootecnia*, 61(1), 266–272.
- Linacero, R., Ballesteros, I., Sanchiz, A., Prieto, N., Iniesto, E., Martinez, Y., Pedrosa, M.M., Muzquizb, M., Cabanillas, B., Rovira, M., Burbano, C., & Cuadrado, C. (2016). Detection by real time PCR of walnut allergen coding sequences in processed foods. *Food Chemistry*, 202, 334–340. doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.132
- Liu, A. H., Jaramillo, R., Sicherer, S. H., Wood, R. A., Bock, S. A., Burks, A. W., Massing, M., Cohn, R.D., & Zeldin, D. C. (2006). National prevalence and risk factors for food allergy and relationship to asthma : Results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126(4), 798–806.e14. doi.org/10.1016/j.jaci.2010.07.026
- Mafra, I., Ferreira, I. M. P. L. V. O., & Oliveira, M. B. P. P. (2008). Food authentication by PCR-based methods. *European Food Research and Technology*, 227(3), 649–665. doi.org/10.1007/s00217-007-0782-x
- Martinovi, T., & Josi, D. (2017). Omics methods as a tool for investigation of food allergies. *Trends in Analytical Chemistry*, in press. doi.org/10.1016/j.trac.2017.07.011
- Meng, X., Bai, Y., Gao, J., Li, X., & Chen, H. (2017). Effects of high hydrostatic pressure on the structure and potential allergenicity of the major allergen bovine b -lactoglobulin. *Food Chemistry*, 219, 290–296. doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.153
- Miciński, J., M.Kowalskib, I., Zwierzchowski, G., Szarek, J., Pierożyński, B., & Zabłocka, E. (2013). Characteristics of cow's milk proteins including allergenic properties and methods for its reduction. *Polish Annals of Medicine*, 20(1), 69–76. doi.org/10.1016/J.POAMED.2013.07.006
- Monaci, L., Brohée, M., Tregoeat, V., & Van Hengel, A. (2011). Influence of baking time and matrix effects on the detection of milk allergens in cookie model food system by ELISA. *Food Chemistry*, 127(2), 669–675. doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.113
- Monaci, L., Tregoeat, V., Van Hengel, A. J., & Anklam, E. (2006). Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review. *European Food Research and Technology*, 223(2), 149–179. doi.org/10.1007/s00217-005-0178-8
- Muller-Renaud, S., Dupont, D., & Dulieu, P. (2004). Quantification of β -Casein in Milk and Cheese Using

- an Optical Immunosensor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(4), 659–664. doi.org/10.1021/jf034723o
- Muraro, A., Hoffmann-Sommergruber, K., Holzhauser, T., Poulsen, L. K., Gowland, M. H., Akdis, C. A., Mills, E.N.C., Papadopoulos, N., Roberts, G., Schnadt, S., Ree, R.V., Sheikh, A., & Vieths, S. (2014). EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines. Protecting consumers with food allergies: Understanding food consumption, meeting regulations and identifying unmet needs. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 69(11), 1464–1472. doi.org/10.1111/all.12453
- Nielsen, S. S. (2014). Food Analysis. *Basic Principles of Spectroscopy*. Penner, M. H., (eds) Springer Science. Oregon. 375-386. ISBN: 9781441914774
- Nowak-we, A. (2015). Current perspectives Non – IgE-mediated gastrointestinal food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135(5), 1114–1124. doi.org/ 10.1016/j.jaci.2015.03.025
- Nunes, M., Barros, R., Moreira, P., Moreira, A., & Almeida, M. (2012). Alergia Alimentar. *Alergia Alimentar*, 1–22. doi.org/10.14195/978-989-26-0658-3
- Organon, N. V. (1971). Immunoassay Using Antigen- Ezyme Conjugates. *Febs Letters*, 15(3), 232–236.
- Ortolani, C., & Pastorello, E. A. (2006). Food allergies and food intolerances. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, 20(3), 467–483. doi.org/10.1016/j.bpg.2005.11.010
- Paidassi, H. (2017). Cellules T régulatrices et tolérance orale : rôle de l'intégrine $\alpha\beta 8$ exprimée par les cellules dendritiques. *Revue Française d'Allergologie*, 57(3), 125–127. doi.org/10.1016/j.reval.2017.02.016
- Panesar, S. S., Javad, S., De Silva, D., Nwaru, B. I., Hickstein, L., Muraro, A., Roberts, G., Worm , M., Biló, M.B., Cardona, V., Dubois, A.E.J., Galvin, A.D., Eigenmann, P., Fernandez-Rivas, M., Halken, S., Lack, G., Niggemann, B., Santos, A.F., Vlieg-Boerstra, B.J, Zolkipli, Z.Q., & Sheikh, A. (2013). The epidemiology of anaphylaxis in Europe: A systematic review. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 68(11), 1353–1361. doi.org/10.1111/all.12272
- Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. (2011). REGULAMENTO (UE) N. o 1169/2011 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 25 de Outubro de 2011. *Jornal Oficial Da União Europeia*, 2011, 18–63.
- Permyakov, E. a, & Berliner, L. J. (2000). alpha-Lactalbumin: structure and function. *FEBS Letters*, 473(3), 269–274. doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01546-5
- Plaza-Martin, A. M. (2016). Food allergies in paediatrics: Current concepts. *Anales de Pediatría (Barcelona, Spain : 2003)*, 85(1), 50.e1-5. doi.org/10.1016/j.anpedi.2016.01.017
- Poms, R. E., Klein, C. L., & Anklam, E. (2004). Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Additives and Contaminants*, 21(1), 1–31. doi.org/10.1080/02652030310001620423
- Popping, B., Diaz-amigo, C., & Hoenicke, K. (2010). *Molecular biological and immunological techniques and applications for food chemists*. Baumgartner, S., (eds) John Wiley & Sons. Austria, 349-358 ISBN: 9780470068090
- Posthuma-Trumpie, G. A., Korf, J., & Van Amerongen, A. (2009). Lateral flow (immuno)assay: Its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(2), 569–582. doi.org/10.1007/s00216-008-2287-2
- Rahaman, T., Vasiljevic, T., & Ramchandran, L. (2016). Trends in Food Science & Technology Effect of processing on conformational changes of food proteins related to allergenicity. *Trends in Food Science & Technology*, 49, 24–34. doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.001
- Rance, K., Cpnnp, DNP, Goldberg, P., MD, & FAAAAI. (2015). Food Allergy in Clinical Practice. *The*

Journal for Nurse Practitioners, 9(4), 187–196. doi.org/10.1016/j.nurpra.2013.01.007

- Reese, I., Holzhauser, T., Schnadt, S., Dölle, S., Kleine-Tebbe, J., Raithel, M., Worm, M., Zuberbier, T., & Vieths, S. (2015). Allergen and allergy risk assessment, allergen management, and gaps in the European Food Information Regulation (FIR): Are allergic consumers adequately protected by current statutory food safety and labelling regulations? *Allergo Journal International*, 24, 180–184. doi.org/10.1007/s40629-015-0066-0
- Restani, P., Velona, T., Plebani, A., Ugazio, AG., Poiesi, C., Muraro, A., & Galli, CL. (1995). Evaluation by SDS-PAGE and immunoblotting of residual antigenicity in hydrolysed protein formulas. *Clinical and Experimental Allergy*, 25, 651-658. doi.org/10.1111/j.1365-2222.1995.tb01113.x
- Ruiter, B., Tregoeat, V., M'Rabet, L., Garssen, J., Bruijnzeel-Koomen, CA., Knol, EF., & Hoffen, E. (2006). Characterization of T cell epitopes in alphas1-casein in cow's milk allergic, atopic and non-atopic children. *Clinical and Experimental Allergy*, 36, 303-310. doi.org/10.1111/j.1365-2222.2006.02436.x
- Sakiyama, T., Sato, K., Tsuda, S., Sugiyama, H., & Hagiwara, T. (2013). Citric acid pretreatment for suppressing adhesion of major egg allergens to a stainless steel surface. *Food Control*, 32(2), 702–706. doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.02.002
- Sampson, H. A. (2016). Food allergy: Past, present and future. *Allergology International*, 65(4), 363–369. doi.org/10.1016/j.alit.2016.08.006
- Savilahti, E. (1981). Cow's Milk Allergy. *Allergy*, 36, 73–88. doi.org/10.1111/j.1398-9995.1981.tb04101.x
- Savilahti, E. M., & Savilahti, E. (2013). Development of natural tolerance and induced desensitization in cow's milk allergy, 24, 114–121. doi.org/10.1111/pai.12004
- Schubert-Ullrich, P., Rudolf, J., Ansari, P., Galler, B., Führer, M., Molinelli, A., & Baumgartner, S. (2009). Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: An overview. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(1), 69–81. doi.org/10.1007/s00216-009-2715-y
- SGS. (2016). *Leadership and innovation*.
- SGS (2014). Consumer Testing Services Quality System. *Guidelines for Method Validation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays applied to Food Samples*. 1-21
- SGS, 2017. Société Générale de Surveillance. <http://www.sgs.pt/>. Consultado 10 de Janeiro de 2017.
- Sino Biological Inc. (2017). ELISA encyclopedia. Direct ELISA, Simple and Time- Saving. Disponível em <http://www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction/ELISA-types/direct-elisa>. Consultado a 9 de junho 2017
- Shrivastava, A., Gupta, V., & Article, R. (2011). Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists*, 2(1), 21–25. doi.org/10.4103/2229-5186.79345
- Sicherer, S. H., Munoz-Furlong, A., & Sampson, H. A. (2004). Prevalence of seafood allergy in the United States determined by a random telephone survey. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114(1), 159–165. doi.org/10.1016/j.jaci.2004.04.018
- Sicherer, S. H., & Sampson, H. A. (2014). Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(2), 291–307.e5. doi.org/10.1016/j.jaci.2013.11.020

- Ślowianek, M., & Majak, I. (2011). Methods of allergen detection based on DNA analysis. *Biotechnology and Food Science*, 75(2), 39–44.
- Soller, L., Ben-Shoshan, M., Harrington, D. W., Fragapane, J., Joseph, L., Pierre, Y. S., Godefroy, S. B., Vieille, S.L., Elliott, S.J., & Clarke, A. E. (2012). Overall prevalence of self-reported food allergy in Canada. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 130(4), 986–988. doi.org/10.1016/j.jaci.2012.06.029
- Surojanametakul, V., Khaiprapai, P., Jithan, P., Varayanond, W., Shoji, M., Ito, T., & Tamura, H. (2012). Investigation of undeclared food allergens in commercial Thai food products. *Food Control*, 23(1), 1–6. doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.06.013
- Svensson, M., Håkansson, A., Mossberg, A., Linse, S., & Svanborg, C. (2000). Conversion of alpha-lactalbumin to a protein inducing apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(8), 4221–4226. doi.org/10.1073/pnas.97.8.4221
- Szefalusi, Z., Loibichler, C., Pichler, J., Reisenberger, K., Ebner, C., & Urbanek, R. (2000). Direct evidence for transplacental allergen transfer. *Pediatr. Res.*, 48(3), 404–407. doi.org/10.1203/00006450-200009000-00024
- Taverniers, I., De Loose, M., & Van Bockstaele, E. (2004). Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 23(8), 535–552. doi.org/10.1016/j.trac.2004.04.001
- Taylor, S. L., Baumert, J. L., Kruijzinga, A. G., Remington, B. C., Crevel, R. W. R., Brooke-Taylor, S., Allen, K.J., & Houben, G. (2014). Establishment of Reference Doses for residues of allergenic foods: Report of the VITAL Expert Panel. *Food and Chemical Toxicology*, 63, 9–17. doi.org/10.1016/j.fct.2013.10.032
- Taylor, S. L., & Hefle, S. L. (2001). Food allergies and other food sensitivities. *Food Technology*, 55(9), 68–83.
- Taylor, S. L., Nordlee, J. A., Niemann, L. M., & Lambrecht, D. M. (2009). Allergen immunoassays-considerations for use of naturally incurred standards. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(1), 83–92. doi.org/10.1007/s00216-009-2944-0
- Tong, P., Gao, J., Chen, H., Li, X., Zhang, Y., Jian, S., & Wichers, H. (2012). Effect of heat treatment on the potential allergenicity and conformational structure of egg allergen ovotransferrin. *Food Chemistry*, 131(2), 603–610. doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.084
- Untersmayr, E. M., & Jensen-Jarolim, E. M. (2010). The role of protein digestibility and antacids on food allergy outcomes. *Allergy and Clinical Immunology*, 121(6), 1301–1308. doi.org/10.1016/j.jaci.2008.04.025
- Verhoeckx, K. C. M., Vissers, Y. M., Baumert, J. L., Faludi, R., Feys, M., Flanagan, S., Herouet-Guicheney, C., Holzhauser, T., Shimojo, R., Bolt, N.V.D., Wichers, H., & Kimber, I. (2015). Food processing and allergenicity. *Food and Chemical Toxicology*, 80, 223–240. doi.org/10.1016/j.fct.2015.03.005
- Vickery, B. P., Scurlock, A. M., Jones, S. M., & Burks, A. W. (2011). Mechanisms of immune tolerance relevant to food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(3), 576–584. doi.org/10.1016/j.jaci.2010.12.1116
- Visser, S., Slangen, C. J., Lagerwerf, F. J. M., Dongen, W. D. V., & Haverkamp, J. (1995). Identification of a new genetic variant of bovine β -casein using reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectrometric analysis. *Journal of Chromatography A*, 711(1), 141–150. doi.org/10.1016/0021-9673(95)00058-U
- Wal, J. M. (2002). Cow's milk proteins/allergens. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 89(6), 3–10. doi.org/10.1016/S1081-1206(10)62115-1

Wal, J.M. (2004). Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. *Journal of Dairy Science*, 87(6), 1641–1674. doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(04)73319-6

ANEXOS

ANEXO I. Resultado da análise da exatidão do laboratório subcontratado



Relatório de ensaios

Tipo de relatório	Data
Original	2016-10-28

16_12767.15719

AMOSTRA N.º 15719

Entrada N.º: 12767
 Designação: Bolacha Maria
 Código da amostra: 584.001
 Lote: N/A
 Data de validade: N/A
 V/ Requisição: 6766
 Data receção: 21/10/2016
 Transporte BIOPREMIER: Não
 Tipo de produto: Alimentar
 Tipo de pedido: Pontual

DADOS CLIENTE

A/C: Departamento de Qualidade
 Entidade: SGS Portugal, S.A.
 Morada: Polo Tecnológico de Lisboa, nº 6, Piso 2
 Código Postal: 1600-546 Lisboa
 País: Portugal

Data receção	Data de entrada	Data Conclusão
2016-10-21	2016-10-21	2016-10-28

Parâmetros de análise Físico-Química

Data Início: 2016-10-26 Data fim: 2016-10-28

Ensaio	Código de ensaio	Unidade	Resultado
Determinação do teor de proteína total de leite por ELISA	PT00.131	ppm (LQ - 2.5 ppm)	50,7

Legenda:

LD - Limite de detecção; LQ - Limite de quantificação; N/A - Não aplicável
 As notas, observações, apreciações e outros comentários estão fora do âmbito de acreditação. Após o envio do relatório de ensaios, o remanescente da amostra será guardado durante 5 dias úteis, sendo possível a sua devolução neste prazo, caso solicitado pelo cliente. Este relatório não pode ser reproduzido parcialmente sem autorização do Responsável de Laboratório.
 Os resultados produzidos referem-se unicamente aos itens ensaiados. Qualquer emenda ou rasura anula a validade deste relatório. O presente relatório foi emitido com assinatura electrónica.

Ana Catarina Fernandes Trindade

Catarina Fernandes
 Responsável Técnico
 Físico-Química