
XIII EQA

PORTO

14-16 SETEMBRO



LIVRO DE ATAS

Livro de Atas do XIII Encontro de Química dos Alimentos

Disponibilidade, valorização e inovação: uma abordagem
multidimensional dos alimentos

14 A 16 DE SETEMBRO DE 2016

PORTO, PORTUGAL

**UNIVERSIDADE DO PORTO
LAQV/REQUIMTE
SOCIEDADE PORTUGUESA DE QUÍMICA**

Ficha Técnica

Título: Livro de Atas do XIII Encontro de Química dos Alimentos

Autor: Comissão Organizadora

Tipo de suporte: Eletrónico

Detalhe do suporte: PDF

Edição: 1.^a Edição

ISBN: 978-989-8124-15-9

Ano 2016

Esta publicação reúne as comunicações apresentadas no XIII Encontro de Química dos Alimentos sob a forma de ata científica.

A aceitação das comunicações foi feita com base nos resumos apresentados: o texto integral que aqui se reúne é da inteira responsabilidade dos autores.

Otimização da extração de Ara h 6 (um alergénio do amendoim) a partir de uma matriz alimentar à base de chocolate

Rita C. Alves^{a*}, *Filipa B. Pimentel*^a, *Henri P.A. Nouws*^b, *M. Beatriz P. P. Oliveira*^a,
Cristina Delerue-Matos^b

^a REQUIMTE/LAQV, Departamento de Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Portugal, Rua Jorge Viterbo Ferreira, 228, 4050-313 Porto, Portugal.

^b REQUIMTE/LAQV, Instituto Superior de Engenharia do Instituto Politécnico do Porto, Portugal, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 431, 4200-072 Porto, Portugal

* rita.c.alves@gmail.com

Palavras-chave: amendoim; alergénios; extração; aditivos; imunossensor

RESUMO

A extração de Ara h 6 (um alergénio do amendoim) de uma matriz alimentar à base de chocolate foi otimizada, testando-se diferentes tempos e temperaturas de extração, assim como a influência da presença de cloreto de sódio (NaCl) e leite em pó, num total de 36 condições de extração. A concentração do alergénio foi determinada utilizando um imunossensor eletroquímico.

Selecionaram-se três condições de extração como as mais eficientes, uma vez que permitiram extrair quantidades significativamente superiores ($p < 0,05$) de Ara h 6. Estas consistem na extração de 2 g de amostra com 20,00 mL de Tris-HNO₃ (pH = 8) contendo: a) NaCl 0,1 M e 10% de leite em pó (21°C, 60 min); b) NaCl 1 M e 5% de leite em pó (21°C, 60 min); e c) 10% de leite em pó (60°C, 60 min).

Este trabalho destaca a importância de ajustar os procedimentos de extração não só ao analito de interesse, mas também ao tipo de matriz alimentar.

1. INTRODUÇÃO

Cerca de 90% das reações alérgicas alimentares são atribuídas a oito grupos restritos de alimentos conhecidos como "the big eight", nomeadamente os ovos, o leite, a soja, o trigo, os crustáceos, o peixe, o amendoim e os frutos de casca rija.

O amendoim (*Arachis hypogaeae*) é uma leguminosa da família *Fabaceae*, natural da América do Sul. Estão descritos, até à data, 17 alergénios neste alimento [1]. A proteína Ara h 1 (globulina 7S) foi identificada inicialmente como o principal alergénio do amendoim. No entanto, vários estudos mostraram que a Ara h 2 (albumina 2S) apresenta uma maior capacidade de induzir a libertação de histamina por basófilos humanos, contendo imunoglobulinas E (IgE) específicas para o amendoim, bem como uma reatividade da pele superior em indivíduos alérgicos [2,3]. Mais recentemente, foi dada elevada importância a uma outra proteína alergénica, a Ara h 6, uma vez que apresenta uma soroprevalência semelhante à da Ara h 2 e uma capacidade semelhante para provocar a libertação de histamina por basófilos [4,5]. Além disso, a Ara h 2 e a Ara h 6 são muito mais resistentes à digestão péptica do que a Ara h 1, o que pode explicar o facto de estas proteínas serem mais

frequentemente reconhecidas pelas IgE presentes no soro de indivíduos alérgicos ao amendoim [6].

Devido à sua elevada resistência ao calor e aos processamentos alimentares, a Ara h 6 pode ser considerada um marcador adequado para identificar a presença de amendoim em produtos alimentares e de linhas de produção industriais.

Neste trabalho, pretendeu-se otimizar a extração de Ara h 6 de uma matriz alimentar complexa, à base de chocolate. Testaram-se diferentes temperaturas e tempos de extração, bem como o uso de aditivos, tais como o NaCl e o leite em pó, num total de 36 condições diferentes. A deteção do alergénio foi realizada utilizando um imunossensor eletroquímico previamente desenvolvido e validado [7].

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostras

A matriz alimentar à base de chocolate foi adquirida num supermercado local, no Porto. Além de amendoim, continha os seguintes ingredientes: chocolate de leite, açúcar, leite em pó e proteínas do leite, manteiga de cacau, gordura de palma, gordura de leite, amido, glucose, lecitina de soja, óleo de coco, sal, agentes estabilizantes, aromatizantes e corantes. Como controlo negativo foi usada uma amostra em tudo semelhante à anterior, mas sem amendoim como ingrediente.

2.2. Preparação da amostra

As amostras foram congeladas a -20°C e imediatamente moídas (GM 200, Retsch, Alemanha) a 10 000 rpm durante 20 s ($3\times$).

Cada extrato foi preparado utilizando uma quantidade rigorosa ($\sim 2,00$ g) de amostra e $20,00 \pm 0,04$ ml de solução tampão Tris- HNO_3 0,1 M pH = 8, com ou sem a adição de quantidades diferentes de NaCl e/ou leite em pó desnatado (**Tabela 1**), sendo: **A**) tampão Tris- HNO_3 (pH = 8); **B**) adição de NaCl (0,1 ou 1 M); **C**) adição de leite em pó desnatado (5 ou 10%).

A extração foi efetuada a temperaturas ($21\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $60\pm 1^{\circ}\text{C}$) e tempos (15 ou 60 min) controlados, sob agitação constante. Subsequentemente, as amostras foram submetidas a um primeiro passo de centrifugação (5000 rpm) durante 5 min (Labofuge Ae, Heraeus Sepatech, Alemanha). Uma alíquota (1 ml) do sobrenadante foi ainda centrifugada a 10 000 rpm durante 3 min (Heraeus Fresco Centrífuga 17, Thermo Fisher Scientific, Alemanha) e o sobrenadante resultante foi diluído (1: 250) e analisado, em triplicado, com o imunossensor eletroquímico.

2.3 Imunossensor eletroquímico

Para construir o imunossensor eletroquímico foi utilizado um eléctrodo de carbono serigrafado (*screen-printed carbon electrode*, SPCE). Inicialmente modificou-se a superfície do eléctrodo

de trabalho do SPCE com nanopartículas de ouro, produzidas *in situ*. Após a modificação da superfície do eletrodo de trabalho, o anticorpo monoclonal de captura (IgG anti-Ara h 6 3B8, Indoor Biotechnologies) foi imobilizado no sensor. A presença do alergénio (nas soluções de calibração ou na amostra) foi detetada pela ligação de um segundo anticorpo monoclonal (IgG anti-Ara h 6 3E12, Indoor Biotechnologies) biotilado e ligado à enzima fosfatase alcalina, por meio da ligação biotina-estreptavidina. Na presença do substrato 3-indoxilfosfato e iões prata, desencadeia-se uma reação de oxidação-redução na qual os iões prata são reduzidos à prata metálica. Após 20 min de reação, recorreu-se à voltametria de varrimento linear (-0,02 a +0,4 V; 50 mV/s) para oxidar electroquimicamente a prata metálica produzida, obtendo-se uma corrente proporcional à quantidade de alergénio presente no extrato.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1. Concentrações de Ara h 6 obtidas usando diferentes condições de extração.

Condições de extração	[Ara h 6] (mg/100 g)	Condições de extração	[Ara h 6] (mg/100 g)
A (21°C, 15 min)	3,9 ± 0,7	A (60°C, 15 min)	4,8 ± 1,5
A/0.1B (21°C, 15 min)	4,9 ± 0,3	A/0.1B (60°C, 15 min)	5,3 ± 1,2
A/1B (21°C, 15 min)	5,9 ± 0,8	A/1B (60°C, 15 min)	9,7 ± 0,2
A/1C (21°C, 15 min)	7,9 ± 0,4	A/1C (60°C, 15 min)	11,6 ± 0,3
A/2C (21°C, 15 min)	5,4 ± 0,9	A/2C (60°C, 15 min)	10,9 ± 1,8
A/0.1B/1C (21°C, 15 min)	5,4 ± 1,1	A/0.1B/1C (60°C, 15 min)	6,9 ± 0,0
A/0.1B/2C (21°C, 15 min)	12,2 ± 1,9	A/0.1B/2C (60°C, 15 min)	9,6 ± 1,6
A/1B/1C (21°C, 15 min)	10,6 ± 1,9	A/1B/1C (60°C, 15 min)	6,0 ± 1,1
A/1B/2C (21°C, 15 min)	8,3 ± 1,4	A/1B/2C (60°C, 15 min)	8,7 ± 1,4
A (21°C, 60 min)	4,8 ± 0,5	A (60°C, 60 min)	4,7 ± 0,6
A/0.1B (21°C, 60 min)	5,5 ± 1,2	A/0.1B (60°C, 60 min)	5,1 ± 0,5
A/1B (21°C, 60 min)	5,1 ± 0,9	A/1B (60°C, 60 min)	3,9 ± 0,7
A/1C (21°C, 60 min)	8,9 ± 1,0	A/1C (60°C, 60 min)	7,3 ± 1,4
A/2C (21°C, 60 min)	10,6 ± 1,5	A/2C (60°C, 60 min)	14,5 ± 2,3
A/0.1B/1C (21°C, 60 min)	5,3 ± 1,1	A/0.1B/1C (60°C, 60 min)	8,6 ± 2,2
A/0.1B/2C (21°C, 60 min)	14,6 ± 2,4	A/0.1B/2C (60°C, 60 min)	8,3 ± 0,6
A/1B/1C (21°C, 60 min)	14,6 ± 2,7	A/1B/1C (60°C, 60 min)	6,0 ± 1,0
A/1B/2C (21°C, 60 min)	9,9 ± 0,2	A/1B/2C (60°C, 60 min)	6,1 ± 0,8

Média ± desvio-padrão, valores calculados resultantes da análise de 3 extratos preparados em dias diferentes. Cada extrato foi analisado em triplicado. A, só tampão Tris-HNO₃ (pH=8);

A/0.1B, Tris-HNO₃ com NaCl 0,1 M; **A/1B**, Tris-HNO₃ com NaCl 1 M; **A/5C** Tris-HNO₃ com 5% de leite em pó; **A/10C**, Tris-HNO₃ com 10% de leite em pó; **A/0.1B/5C** Tris-HNO₃ com NaCl 0,1 M e 5% de leite em pó; **A/0.1B/10C**, Tris-HNO₃ com NaCl 0,1 M e 10% de leite em pó; **A/1B/1C**, Tris-HNO₃ com NaCl 1 M e 5% de leite em pó; **A/1B/2C**, Tris-HNO₃ com NaCl 1 M e 10% de leite em pó.

A presença de chocolate nos produtos alimentares prejudica a deteção de proteínas por imunoensaios, devido à elevada quantidade de compostos fenólicos presentes na amostra. Estes podem complexar, não só a proteína a detetar, mas também os anticorpos utilizados no imunoensaio, prejudicando, assim, a análise. Os aditivos selecionados, NaCl e leite em pó,

quando adicionados ao solvente de extração, permitem, respetivamente, modular a força iónica da solução e complexar compostos fenólicos, o que vai influenciar a solubilidade e extração do alergénio em questão.

Os resultados deste trabalho (**Tabela 1**) mostram, de facto, que o uso destes aditivos melhora significativamente a extração da Ara h 6. Observa-se, ainda, que tempos de extração mais longos (60 min) são mais eficientes, exceto em algumas situações em que foi utilizada a temperatura de 60°C. Com base numa análise de clusters, agruparam-se três condições que permitiram maximizar a extração da Ara h 6 da matriz analisada: NaCl 0,1 M e 10% de leite em pó, a 21°C, durante 60 min; b) NaCl 1 M e 5% de leite em pó, a 21°C, durante 60 min; e c) 10% de leite em pó, a 60°C, durante 60 min.

4. CONCLUSÃO

Este trabalho mostra a importância da preparação da amostra e a necessidade de ajustar os procedimentos de extração, tendo em consideração não só o analito alvo, mas também a composição da matriz alimentar. Esta é uma questão à qual deve ser dada devida importância, principalmente no que respeita ao desenvolvimento de kits comerciais para análise de alergénios em vários tipos de alimentos.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro ao projeto Operação NORTE-01-0145-FEDER-000011 - Qualidade e Segurança Alimentar - uma abordagem (nano)tecnológica. Este trabalho foi, ainda, financiado pelo projeto UID/QUI/50006/2013 - POCI/01/0145/FEDER/007265, apoiado financeiramente pela FCT/MEC através de fundos nacionais e co-financiado pelo FEDER. Filipa B. Pimentel agradece à FCT a concessão de uma bolsa de doutoramento (SFRH/BD/109042/2015), financiada pelo MCTES e FSE através do POCH - Programa Operacional Capital Humano.

Referências

- [1] IUIS allergen nomenclature sub-committee. Allergen nomenclature. Disponível em: <http://www.allergen.org/>. Consultado em 01 Maio 2016.
- [2] SJ Koppelman, M Wensing, M Ertmann, AC Knulst, EF Knol, Clin. Exp. Allergy 2004, 34, 583-590.
- [3] GW Palmer, DAJr Dibbern, AW Burks, GA Bannon, SA Bock, HS Porterfield, RA McDermott, SC Dreskin, C. Clin. Immunol 2005, 115, 302–312.
- [4] A Koid, M Chapman, R Hamilton, R van Ree, S Versteeg, S Dreskin, SJ Koppelman, S Wünschmann, J Agric Food Chem 2014, 62, 206–213.
- [5] S Koppelman, G Jong, M Laaper-Ertmann, K Peeters, A Knulst, SL Hefle, E Knol, Clin Exp Allergy 2005, 35, 490–497.
- [6] S Koppelman, S Hefle, S Taylor, G de Jong, Mol Nutr Food Res 2010, 54, 1711-1721.
- [7] RC Alves, FB Pimentel, HPA Nouws, W Correr, MB González-García, MBPP Oliveira, C Delerue-Matos, Anal Bioanal Chem 2015, 407, 7157-7163.