



**II CONPESQ**  
**Congresso de Pesquisa,**  
**Pós-Graduação e Inovação**

Os novos rumos da ciência pós-pandemia

12 a 16 de abril de 2021 Universidade Federal do Cariri - UFCA

**ESTUDO BIOELETROQUÍMICO DO CONTEÚDO  
LECTÍNICO DE *AGARICUS BISPORUS* NA PRESENÇA DE  
LACTOSE**

**André Oliveira Santos<sup>1</sup>**

Centro de Ciência e Tecnologia,  
Universidade Federal do Cariri  
[andreasantos@gmail.com](mailto:andreasantos@gmail.com)

**Vanessa Erika Abrantes Coutinho<sup>2</sup>**

Centro de Ciência e Tecnologia,  
Universidade Federal do Cariri  
[vanessaerika.bio@gmail.com](mailto:vanessaerika.bio@gmail.com)

**Brenna Espíndola Bandeira Holanda<sup>3</sup>**

Centro de Ciência e Tecnologia,  
Universidade Federal do Cariri  
[brennaesp06@gmail.com](mailto:brennaesp06@gmail.com)

**Luiz Carlos do Carmo Arrais Junior<sup>4</sup>**

Centro de Ciência e Tecnologia,  
Universidade Federal do Cariri  
[luizcarlosarrais@gmail.com](mailto:luizcarlosarrais@gmail.com)

**Thiago Mielle Brito Ferreira Oliveira<sup>5</sup>**

Centro de Ciência e Tecnologia,  
Universidade Federal do Cariri  
[thiago.mielle@ufca.edu.br](mailto:thiago.mielle@ufca.edu.br)

---

1      Doutorando no Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Cariri.

2      Doutoranda no Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Cariri.

3      Graduanda em Engenharia de Materiais – Bolsista FUNCAP.

4      Graduando em Engenharia de Materiais – Bolsista PIBIT/UFCA, no Programa Institucional de Iniciação Científica e Tecnológica da Universidade Federal do Cariri.

5      Docente/Pesquisador do Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Federal do Cariri.

## 1 INTRODUÇÃO

O número de estudos sobre contaminantes emergentes e moléculas bioativas vêm crescendo gradativamente devido aos impactos negativos que essas substâncias causam ao meio ambiente e/ou efeitos nocivos à saúde humana a médio e longo prazos. Com isso, surge a necessidade de criar métodos analíticos para controle e fiscalização dessas substâncias, e entre as alternativas disponíveis estão os biossensores eletroquímicos. Os biossensores são definidos como dispositivos analíticos que possuem um elemento sensorial bioativo, desde organismos vivos a produtos derivados de sistemas biológicos, como enzimas, anticorpos, DNA, proteínas, entre outros. No caso dos biossensores eletroquímicos, a identificação do analito ocorre pela transdução em um sinal elétrico de interesse decorrente da interação bioelemento–analito (PATACAS, 2007; PERUMAL e HASHIM, 2014). Estes biossensores apresentam características que os tornam candidatos ideais para análises ambientais, como excelente sensibilidade, respostas rápidas e a facilidade para a miniaturização do dispositivo analítico em sistemas portáteis (LUONG, 2008; BARROCAS, 2008).

Na busca incessante pela prospecção de moléculas com relevância biotecnológica, muitos pesquisadores têm investido esforços para estudar as potencialidades dos macrofungos, em especial como importante fonte de compostos biologicamente ativos com propriedades imunomodulatórias, antitumorais e antimicrobianas (CHANG e WASSER, 2012). Os macrofungos são seres eucariontes pertencentes ao reino Fungi, que interagem com seres unicelulares e pluricelulares, como plantas, animais, bactérias, entre outros organismos (STAMETS, 2005; MCLAUGHLIN, 2009). Como exemplo, temos os basidiomicetos, representados pelos cogumelos e orelhas-de-pau, que possuem um corpo de frutificação em suas superfícies como uma das principais características (SMITH *et al.*, 2002).

A utilização dos biossensores vem crescendo bastante nos últimos anos, mas pouca atenção tem sido direcionada aos dispositivos configurados com lectinas, proteínas que conseguem se ligar reversivelmente a carboidratos específicos, seja de forma livre ou conjugada a outras biomoléculas (KARNAHANATAT, 2012). As lectinas podem ser extraídas de animais, vegetais, bactérias e fungos, e entre os macrofungos com bioativos de interesse na construção dos biossensores estão os da espécie *Agaricus bisporus* (FU *et al.*, 2002; ELMASTAS *et al.*, 2007; PUTTARAJU *et al.*, 2006). Estudos envolvendo a lectina de *Agaricus bisporus* (ABL, liga-se especificamente a resíduos de galactose) ainda são limitados e poucos contemplam aplicações envolvendo o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos.

## 2 OBJETIVOS

Avaliar a presença de lectinas em extratos de *Agaricus bisporus*, visando a aplicação destas proteínas no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos voltados para análise de lactose em amostras diversas.

## 3 METODOLOGIA

Corpos de frutificação ainda frescos de *Agaricus bisporus* var. Portobello foram utilizados como fontes das lectinas de interesse. Diferentes soluções de extração (tampão tris/fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0; cloreto de sódio 0,1 M; tampão tris 0,1 M pH 6,8; água destilada) foram preparadas em água destilada e utilizando reagentes de grau analítico. Amostras frescas foram trituradas e sujeitas a processo de extração (1:10%, m/v) por 12 horas em agitador orbital ajustado a 1000 rpm, mantendo as amostras a 25 °C. Em seguida, o material foi filtrado por gravidade e o extrato mantido sob refrigeração a 4 °C até o momento de sua

utilização. A presença de proteínas nos extratos foi avaliada qualitativamente pelo método de Bradford (ZOR e SELINGER, 1996). Não quantificação de proteínas em nenhuma solução utilizada neste trabalho. A presença de lectinas no extrato foi avaliada por testes de atividade hemaglutinante, usando eritrócitos de camundongos. A purificação do conteúdo proteico foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose (Sepharose 4B; Sigma-Aldrich). A lactose utilizada nos estudos de interação foi extraída de leite em pó desnatado, conforme descrito em outro trabalho (LEVITON, 1949).

O biossensor foi construído utilizando como suporte eletródico uma placa de quartzo revestida com óxido de estanho dopado com índio (ITO), modificado eletroquimicamente com poli(azul de metileno) por voltametria cíclica, variando o potencial entre -0,3 e 0,9 V (vs. Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup><sub>saturado</sub>) por 50 ciclos, a uma velocidade de 50 mV s<sup>-1</sup> (KAPLAN, DAĞCI e ALANYALIOĞLU, 2010). A estabilização/ativação da superfície do eletrodo ITO/PAM foi realizada em tampão borato de sódio 0,1 M pH 9,0. Na sequência, 15 µL da solução proteica foi depositada na superfície do ITO/PAM por *drop-caoting* e o dispositivo de trabalho, ITO/PAM/ABL, foi obtido após evaporação do solvente.

O comportamento eletroquímico do biossensor ITO/PAM/ABL na detecção de lactose foi estudado por voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica, usando uma sonda de hexacianoferrato 0,01 M em KCl 0,1 M. As medidas foram realizadas em célula eletroquímica de três eletrodos, constituída do biossensor de trabalho, eletrodo de referência do tipo Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup><sub>saturado</sub> e eletrodo auxiliar de platina.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A escolha da biomassa de *Agaricus bisporus* como fonte de lectinas se deu em função de trabalhos já publicados informando sobre quantidades importante dessas proteínas na variedade de cogumelo estudada, o que torna o processo de comparação e validação dos biossensores desenvolvidos neste trabalho mais fácil. A avaliação da atividade hemaglutinante e do teor de proteínas totais e (Tabela 1) mostraram que, ainda que todas as soluções extratoras promovessem a obtenção de material proteico com atividade lectínica, o tampão tris 0,1 M pH 6,8 foi mais eficiente para a extração, oferecendo melhor rendimento.

**Tabela 1** – Avaliação da atividade hemaglutinante e presença de proteínas nos extratos

<i>Solução de extração</i>	<i>Teste de Bradford</i>	<i>Título de hemaglutinação</i>
Tampão tris/fosfato 0,1 M pH 7,0	Positivo	1:8
Tampão tris 0,1 M pH 6,8	Positivo	1:16
Cloreto de sódio 0,15 M	Positivo	1:4
Água destilada	Positivo	1:2

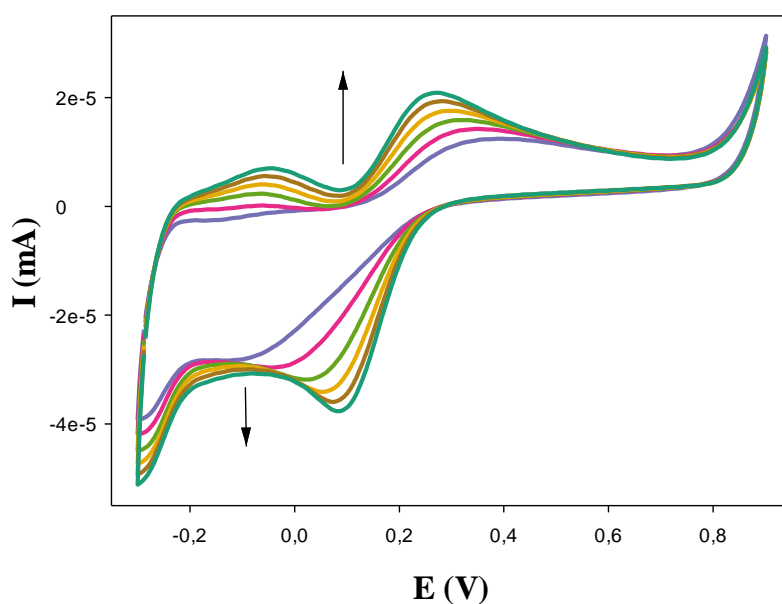
**Fonte:** Autoria própria.

Nos ensaios cromatográficos, houve retenção de material proteico na coluna de Sepharose, sugerindo a presença de lectinas específicas para resíduos de galactose no extrato. Uma extensa revisão sobre estas lectinas (ISMAYA, TJANDRAWINATA e RACHMAWATI, 2020) indicou que o macrofungo *Agaricus bisporus* é fonte de quatro isoformas de ABL, que apresentam pontos isoelétricos diferentes, mas todos abaixo de 6,7. Ao se trabalhar com tampão tris com pH ajustado abaixo do pK<sub>a</sub> do seu ácido conjugado (pK<sub>a</sub> = 8,07), garante-se que este composto esteja protonado, logo com carga positiva. Neste mesmo pH de trabalho, todas as isoformas da ABL apresentam carga líquida negativa, sugerindo que as forças eletrostáticas

existentes entre as espécies solvatadas estejam entre os fatores principais que auxiliam o tampão tris na extração de maior conteúdo deste material.

Os estudos voltamétricos mostraram, num primeiro momento, que houve efetiva modificação da superfície condutora do ITO com PAM, refletida no aumento das correntes registradas a cada ciclo de potencial (Figura 1). Este aumento de sinal deve-se às propriedades condutoras do filme de PAM (LIU e MU, 1999), que apresenta cargas superficiais positivas e permite que os processos eletroquímicos ocorram com maior facilidade.

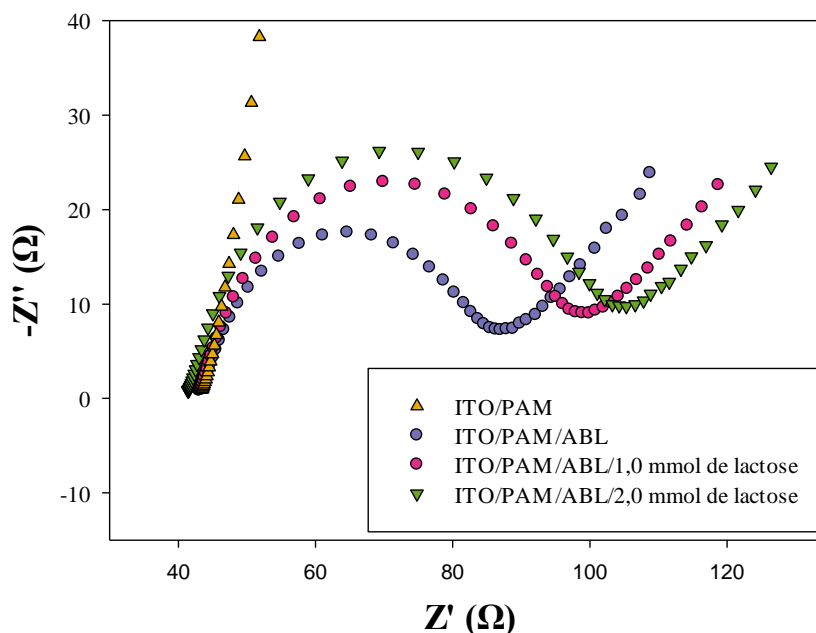
**Figura 1** – Voltamogramas do processo de modificação do ITO com PAM. As setas mostram a direção na alteração das correntes de pico após cada 10 ciclos do início do processo (em roxo).



Fonte: Autoria própria.

Os resultados obtidos por espectroscopia de impedância eletroquímica (Figura 2) mostram fortes indícios quanto à possível aplicação desse material, seja de forma isolada ou como extrato proteico, na construção de biossensores eletroquímicos para detecção de lactose. O eletrodo modificado apenas com PAM não ofereceu praticamente nenhuma resistência à transferência de carga (Figura 2, em amarelo), característico de processos redox com cinética controlada por difusão. No entanto, a modificação com o conteúdo proteico de *Agaricus bisporus* aumentou a resistência de transferência de carga, indicada pela formação do arco capacitivo (Figura 2, em roxo). A adição de quantidades crescentes de lactose (Figura 2, em vermelho e verde), por sua vez, ampliou a magnitude dos arcos, sugerindo que houve interação efetiva da lactose com a superfície do biossensor.

**Figura 2** – Diagramas de Nyquist registrados com diferentes dispositivos, na presença e ausência de lactose, para uma faixa de frequência de 10 kHz a 100 MHz e amplitudes de 10 mV.



Fonte: Autoria própria.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os basidiomicetos são importantes fontes de lectinas e, neste trabalho, os resultados preliminares de atividade hemaglutinante e do teste de Bradford evidenciam a presença de lectinas nos extratos de *Agaricus bisporus*. Ainda, um biossensor construído à base desses extratos (ITO/PAM/ABL) demonstrou boa estabilidade e sensibilidade para a detecção de lactose. Tendo em vista os dados obtidos neste trabalho, espera-se que extratos proteicos e/ou lectinas isoladas de *Agaricus bisporus* possam ser utilizadas na construção de biossensores eletroquímicos para detecção de lactose e derivados de galactose em amostras reais.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade federal do Cariri (UFCA) e à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio (Edital 01/2019).

## REFERÊNCIAS

BARROCAS, Paulo Rubens Guimarães *et al.* BIOSSENSORES PARA O MONITORAMENTO DA EXPOSIÇÃO A POLUENTES AMBIENTAIS. **CAD. SAÚDE COLET**, Rio de Janeiro, p. 677 - 700, 8 dez. 2008.

CHANG, Shu- Ting; WASSER, Solomon P. The role of culinary-medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, 14 (2012), pp. 95-134

ELMASTAS, Mahfuz; ISILDAK, Omer; TURKEKUL, Ibrahim; Temur, Nuri. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms, **Journal of Food**

**Composition and Analysis**, 20 (2007), pp. 337-345.

FU, Hui- Yin; SHIEH, Den- En; HO, Chi- Tang. Antioxidant and edible mushroom-free radical cleansing activities, **Journal of Food Lipids**, 9 (2002), pp. 35-46.

ISMAYA, Wangsa Tirta; TJANDRAWINATA, Raymond Rubianto; RACHMAWATI, Heni. Lectins from the Edible Mushroom *Agaricus bisporus* and Their Therapeutic Potentials. **Molecules**, v. 25, n. 10, pp. 2368, 2020.

KAPLAN, Ibrahim Hakki; DAĞCI, Kader; ALANYALIOĞLU, Murat. Nucleation and Growth Mechanism of Electropolymerization of Methylene Blue: The Effect of Preparation Potential on Poly(methylene blue) Structure. **Electroanalysis**, v. 22, n. 22, pp. 2694-2701, 2010.

KARNCHANATAT, Aphichart. Antimicrobial activity of lectins from plants. **Antimicrob Agents** (Ed.), InTech (2012), pp. 145-178.

LEVITON, Abraham. Methanol Extraction of Lactose and Soluble Proteins from Skim Milk Powder. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 41, n. 7, pp. 1351-1357, 1949.

LIU, Jincui; MU, Shaolin. Electrochemical polymerization of methylene blue and properties of polymethylene blue. **Synthetic Metals**, v. 107, n. 3, pp. 159-165, 1999.

LUONG, John H. T; MALE, Keith B.; GLENNON, Jeremy D. Biosensor technology: technology push versus market pull, **Biotechnol. Adv.**, 26 (2008), pp. 492-500

MCLAUGHLIN, David J.; HIBBET, David S.; LUTZONI, F. et al. The search for the fungal tree of life. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 11, p. 488–497, 2009.

PATACAS, Rafael de Cirne. **Desenvolvimento, caracterização e otimização de um biossensor amperométrico para a determinação de nitrato baseado em microinterfaces gelificadas**. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Porto, Portugal, 2007.

PERUMAL, Veeradasan; HASHIM, Uda. Advances in biosensors: principle, architecture and applications, **J. Appl. Biomed.**, 12 (2014), pp. 1-15

PUTTARAJU, Nethravathi Guthalu; VENKATESHAIAH, Sathisha Upparahalli; DHARMESH, Shylaja Mallaiiah; URS, Shashirekha Mysore Nanjaraj; SOMASUNDARAM, Rajarathnam. Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54 (2006), 9764–9772.

SMITH, John; ROWAN, Neil; SULLIVAN, Richard (2002). Medicinal Mushrooms: Their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments. **British Library**.

STAMETS, Paul. Mycelium running: how mushrooms can help save the world. Nova Iorque: **Ten Speed Press**. 2005.

ZOR, Tsaffir; SELINGER, Zvi. Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its Sensitivity: Theoretical and Experimental Studies, **Anal. Biochem.**, v. 236, n. 2, p. 302-308, 1996.