



DETECÇÃO DE LACTOSE EM FORMULAÇÕES ALIMENTÍCIAS COMERCIAIS UTILIZANDO UM BIOSENSOR À BASE DE LECTINA DO COGUMELO *AGARICUS BISPORUS*

¹ André O. Santos; ¹ Vanessa E. Abrantes-Coutinho; ¹ Heryka Regina Abrantes da Costa; ² Simone
Morais; ³ Thiago M.B.F. Oliveira.

¹ Pós-Graduando(a) em Bioquímica e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Cariri –
UFCA; ² Prof.a. Dr.a no Instituto Politécnico do Porto – P.PORTO; ³ Prof. Dr. na Universidade
Federal do Cariri – UFCA.

Área temática: Biotecnologia e Inovação em Saúde

Modalidade: Comunicação Oral On-Line

E-mail dos autores: andre.oliveira@ufca.edu.br¹; vanessa.abrantes@ufca.edu.br¹;
herykablo@gmail.com; sbm@isep.ipp.pt²; thiago.mielle@ufca.edu.br³

RESUMO

INTRODUÇÃO: O cogumelo *Agaricus bisporus* é fonte de uma lectina com notável especificidade para a bioreconhecimento da lactose e, neste trabalho, essa característica foi explorada para desenvolver um biossensor fotoeletroquímico. **MÉTODOS:** A atividade ABL foi extensivamente caracterizada por eletroforese em gel bidimensional, espectroscopia UV-Visível, ensaios de hemaglutinação e técnicas voltamétricas. Dados complementares dos (bio)materiais foram obtidos por espectroscopia no infravermelho, análise térmica e microscopia eletrônica de varredura. A construção, detecção e desempenho analítico do biossensor também foram exaustivamente estudados por voltametria e espectroscopia de impedância eletroquímica. **RESULTADOS:** A alta atividade da lectina encontrada em extratos salinos desse macrofungo (640 HU mL⁻¹), mesmo em valores críticos de pH (4 - 10) e temperaturas (20 - 100 °C), permitiu seu uso direto como fonte de ABL. Evidências teóricas e experimentais revelaram condições eletrostáticas favoráveis e biocompatíveis para imobilizar a ABL na plataforma de vidro revestida de poli(azul de metileno)/óxido de estanho dopado com flúor, resultando no biossensor ABL/PMB/FTO. O polímero condutor adicionou maior fotoatividade ao dispositivo, permitindo identificar interações lectina-carboidrato com maior sensibilidade. As curvas de dose-resposta estudadas pela espectroscopia de impedância eletroquímica mostraram um perfil sigmoide bem ajustado pela equação de Hill, ampliando a faixa dinâmica de trabalho (15 - 540 nmol L⁻¹ de lactose; limite de detecção de 20,2 pmol L⁻¹) e evitando procedimentos indesejáveis de diluição ou pré-concentração da amostra. **CONCLUSÃO:** Sob as condições fotoeletroquímicas otimizadas, o biossensor ABL/PMB/FTO mostrou notável estabilidade de sinal, precisão, especificidade e seletividade para analisar lactose em produtos alimentícios comerciais. Essa pesquisa desperta interesse em biossensores à base de ABL e agrega valor ao extrato bruto de *Agaricus bisporus* para o desenvolvimento de abordagens biotecnológicas mais sustentáveis e ecológicas.

Palavras-chave: Técnicas Biossensoriais; Materiais Inteligentes; Lectinas.





1 INTRODUÇÃO

Macrofungos e microfungos são considerados importantes fontes de lectinas, proteínas de origem não imune com domínios específicos para carboidratos. A interação entre lectinas e carboidratos ou gliconjugados ocorre de forma reversível, mantendo a conformação nativa da proteína, o que é uma das principais características tecnológicas dessas biomoléculas (1). Estudos envolvendo fungos têm recebido bastante atenção uma vez que estas espécies possuem valor nutricional e farmacológico imensurável, demonstrando propriedades antiproliferativas, imunomoduladoras e antibacterianas associadas à atividade das lectinas (1).

Pesquisas realizadas com células, extratos e metabólitos isolados de *Agaricus bisporus* têm atestado seu grande valor biotecnológico (2). A lectina de *Agaricus bisporus* (ABL) apresenta alta afinidade por galactose- β -1,3-N-acetilgalactosamina (também conhecida como antígeno T) e galactose- β -1,3-N-acetilglicosamina (1, 3). Existem evidências teóricas e experimentais que comprovam que ABL também reconhece lactose (β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)-D-glicose) com boa afinidade (3). Essa característica é desejável em bioensaios que requerem alta especificidade e seletividade para quantificar esse dissacarídeo em amostras complexas, embora estudos relacionados sejam raros (1). Vale salientar que uma dieta rica em produtos à base de lactose garante vitaminas e minerais importantes para nossa saúde, mas pessoas com intolerância à lactose enfrentam problemas gastrointestinais e extra-intestinais graves (4). O controle de qualidade preciso de produtos naturais e formulações comerciais é muito importante para garantir dietas sem lactose, bem como para o desenvolvimento de estratégias nutricionais e terapêuticas mais adequadas (5).

Biossensores desenvolvidos a partir de extratos fúngicos associados a transdutores (foto)eletroquímicos adequados evitam etapas trabalhosas e demoradas de purificação de proteínas, comumente exigidas por métodos analíticos tradicionais, além de preservar a conformação e reatividade de estruturas nativas e reduzir drasticamente os custos de produção do dispositivo. A partir dessas premissas, propõe-se aqui um novo biossensor fotoeletroquímico altamente sensível e específico para lactose, usando uma plataforma de vidro revestida com um filme de óxido de estanho dopado com flúor (FTO) e poli(azul de metileno) (PMB), posteriormente modificado com um extrato proteico contendo a ABL. O biossensor fotoeletroquímico proposto foi capaz de quantificar lactose em produtos alimentícios comerciais com grande precisão, sensibilidade e especificidade.



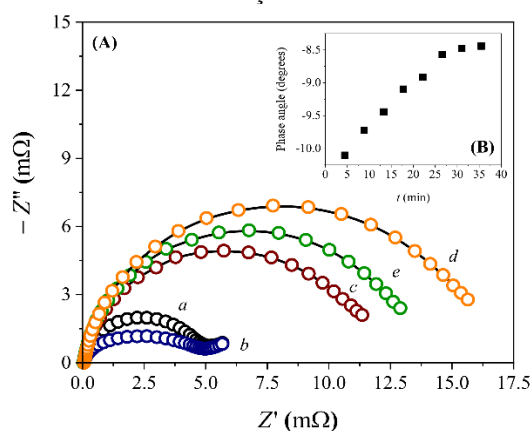
2 MÉTODOS

A atividade ABL foi extensivamente caracterizada por eletroforese em gel bidimensional, espectroscopia UV-Visível, ensaios de hemaglutinação e técnicas voltamétricas. Dados complementares dos (bio)materiais foram obtidos por espectroscopia no infravermelho, análise térmica e microscopia eletrônica de varredura. A construção, detecção e desempenho analítico do biossensor também foram exaustivamente estudados por voltametria e espectroscopia de impedância eletroquímica. A metodologia detalhada, incluindo os métodos estatísticos, pode ser consultada no trabalho publicado recentemente por nosso grupo de pesquisa (6).

3 RESULTADOS

A imobilização ABL em PMB/FTO foi avaliada por EIS. A partir dos diagramas de Nyquist da Figura 1, plotados pela relação entre impedâncias real (Z') e imaginária ($-Z''$), observou-se que tanto FTO ($R_{ct} = 4,48 \times 10^2 \Omega$; Figura 1, linha a) quanto PMB/FTO ($R_{ct} = 3,82 \times 10^2 \Omega$; Figura 1, linha b) apresentaram semicírculos de diâmetro reduzido, implicando baixa resistência à transferência de carga. Após a modificação do PMB/FTO com o extrato ABL por *drop-coating*, houve um aumento pronunciado (ca. 2,4 a 2,8 vezes) no raio do arco capacitivo ($R_{ct} = 1,08 \times 10^3 \Omega$; Figura 1, linha c), possivelmente causada pelo sucesso da imobilização das proteínas na superfície eletroativa do dispositivo. Os experimentos de impedância também mostraram uma forte interação entre lactose e ABL/PMB/FTO, atestada pelo aumento do semicírculo mesmo em baixas concentrações desse carboidrato ($R_{ct} = 1,64 \times 10^3 \Omega$ para 500 nmol L^{-1} de lactose; Figura 1, linha d).

Figura 1. (A) Diagramas de Nyquist registrados com (a) FTO, (b) PMB/FTO, (c) ABL/PMB/FTO, (d) ABL/PMB/FTO e 500 nmol L^{-1} lactose sem irradiação, e (e) sob influência de luz azul. (B) Efeito da irradiação sobre a resposta do biossensor ao longo do tempo, utilizando as mesmas condições citadas anteriormente.



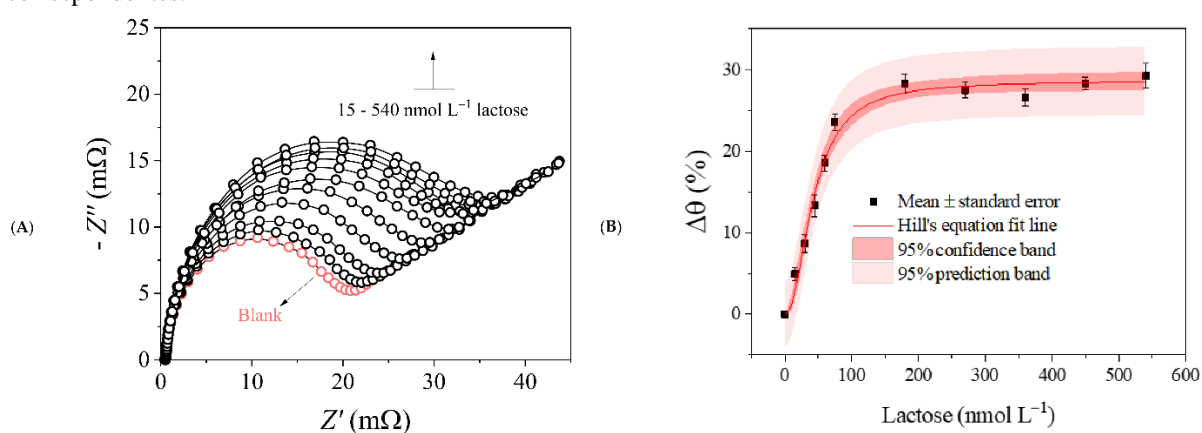
Fonte: SANTOS, A.O. *et al.*, 2023.



Sabendo que o polímero PMB possui band-gap igual a 1,65 eV, foi avaliada a sensibilidade do sistema sob irradiação de luz azul. Os dados de EIS obtidos durante 1 h de irradiação mostraram uma diminuição nos valores das impedâncias ($R_{ct} = 1,27 \times 10^3 \Omega$ para 500 nmol L^{-1} de lactose; Figura 1, linha e), quando comparadas aos resultados sem irradiação. O efeito fotoeletroquímico atingiu a condição de equilíbrio após 30 min de irradiação contínua, como pode ser observado pelos valores do ângulo de fase na Figura 4B.

Com base na atividade fotoeletroquímica detectada frente à lactose, curvas dose-resposta ($15\text{--}540 \text{ nmol L}^{-1}$ de lactose; Figura 2A) foram construídas por meio de medidas de EIS. O ângulo de fase (θ) correspondente foi registrado em 200 mHz. Os dados da curva de saturação foram bem ajustados pela equação de Hill (Figura 2B), considerando $\Delta\theta_{\max} = 0,11\%$, $K_D = 319,7 \text{ nmol L}^{-1}$ e $n = 2$. Os valores médios mostraram baixa dispersão e variância aceitável para 95% de confiança, indicando alta precisão da medida. Um valor baixo de *qui*-quadrado ($\chi^2 = 1,06 \times 10^{-5}$) também foi obtido, bem como um coeficiente de correlação próximo à unidade ($R^2 = 0,9940$), comprovando que o modelo matemático explica bem a variância dos dados. Sob condições analíticas ótimas, o ABL/PMB/FTO foi capaz de detectar lactose com limite de detecção igual a $20,2 \text{ pmol L}^{-1}$ e limite de quantificação igual a $66,4 \text{ pmol L}^{-1}$, além de desvio quadrático médio $< 5,4\%$ para testes de repetibilidade e reprodutibilidade.

Figura 2. (A) Diagramas de Nyquist registrados para lactose de 15 a 540 nmol L^{-1} , usando o biossensor ABL/PMB/FTO sob irradiação de luz azul. (B) Curva dose-resposta e ajuste sigmoidal de Hill para as análises fotoeletroquímicas correspondentes.



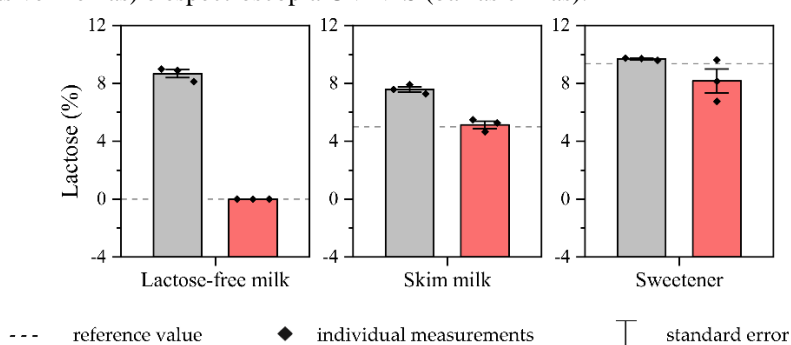
Fonte: Adaptado de SANTOS, A.O. *et al.*, 2023.

O procedimento desenvolvido com o biossensor foi adaptado para a detecção e quantificação de lactose em amostras comerciais de leite sem lactose, leite desnatado (6,0% de lactose; m/v), e



adoçante dietético (sucralose, 9,0% de lactose; m/v). Os resultados foram consistentes com as informações dos fabricantes (92,1-102,7% de recuperação), confirmando o sucesso da aplicação de ABL/PMB/FTO para a inspeção dos produtos comerciais estudados. Os resultados foram comparados aos obtidos pelo método espectrofotométrico padrão para açúcares redutores, baseado na reação com ácido 3,5-dinitrosalisílico, mostrando boa correlação e baixo erro padrão para as triplicatas (Figura 3). Resultados complementares podem ser encontrados no nosso trabalho recém-publicado (6).

Figura 3. Resultados obtidos para as análises de lactose em produtos alimentícios comerciais, utilizando o biossensor ABL/PMB/FTO (barras vermelhas) e espectroscopia UV-VIS (barras cinzas).



Fonte: SANTOS, A.O. *et al.*, 2023.

4 DISCUSSÃO

O grupo axial hidroxila C-3 na lactose é apontado como o principal sítio de ligação ABL-carboidrato [3]. Tais evidências confirmam que o extrato de *Agaricus bisporus* é um valioso recurso biotecnológico para o biossensoriamento da lactose, agregando valor ao biomaterial precursor e evitando etapas complexas, demoradas e caras para a purificação de proteínas.

A luz azul incidente no biossensor reduz a taxa de recombinação dos pares elétron-buraco fotogerados no material polimérico, tornando os fenômenos interfaciais mais evidentes e melhorando a sensibilidade dos biossensores. Os tamanhos dos arcos capacitivos foram delimitados pela relaxação da dupla camada elétrica, seguida pela impedância de Warburg associada a processos difusionais.

Sem o ajuste estatístico dos dados ao modelo de Hill, seria possível trabalhar com diferentes faixas lineares de concentração, mas esse procedimento tornaria a faixa dinâmica muito estreita (saturação da superfície do biossensor em concentrações de lactose $> 100 \text{ nmol L}^{-1}$ foi observada), exigindo diluição da amostra ou etapas de pré-concentração que muitas vezes levam a erros sistemáticos nos resultados.



Uma vantagem importante do biossensor ABL/PMB/FTO foi a seletividade para análise de leite sem lactose, uma vez que o método espectrofotométrico não distingue os diferentes açúcares redutores presentes na amostra, gerando resultados falso-positivos.

5 CONCLUSÃO

A lectina do cogumelo *Agaricus bisporus* tem uma forte afinidade pela lactose, permitindo a sua detecção através de um mecanismo altamente específico e seletivo. Adaptando esta proteína a transdutores (foto)eletroquímicos adequados, é possível construir biossensores com alto desempenho analítico para detectar e quantificar este dissacarídeo. Adicionalmente, este estudo agrega valor à biomassa de *Agaricus bisporus* como um biomaterial com enorme potencial biotecnológico.

REFERÊNCIAS

1. ABRANTES-COUTINHO, V.E.; SANTOS, A.O.; MOURA, R.B.; PEREIRA-JUNIOR, F.N.; MASCARO, L.H.; MORAIS, S.; OLIVEIRA, T.M.B.F. Systematic Review on Lectin-Based Electrochemical Biosensors for Clinically Relevant Carbohydrates and Glycoconjugates. **Colloids Surfaces B Biointerfaces**, v. 208, artigo 112148, 2021. DOI:10.1016/j.colsurfb.2021.112148.
2. MOROSANOVA, M.A.; FEDOROVA, T. V.; POLYAKOVA, A.S.; MOROSANOVA, E.I. Agaricus Bisporus Crude Extract: Characterization and Analytical Application. **Molecules**, v. 25, n. 24: 5996, 2020. DOI:10.3390/molecules25245996.
3. IRAZOQUI, F.J.; VIDES, M.A.; NORES, G.A. Structural Requirements of Carbohydrates to Bind Agaricus Bisporus Lectin. **Glycobiology**, 1999, 9, 59–64, doi:10.1093/glycob/9.1.59.
4. FACIONI, M.S.; RASPINI, B.; PIVARI, F.; DOGLIOTTI, E.; CENA, H. Nutritional Management of Lactose Intolerance: The Importance of Diet and Food Labelling. **J. Transl. Med.**, v. 18, artigo 260, 2020. DOI:10.1186/s12967-020-02429-2.
5. ENKO, D.; REZANKA, E.; STOLBA, R.; HALWACHS-BAUMANN, G. Lactose Malabsorption Testing in Daily Clinical Practice: A Critical Retrospective Analysis and Comparison of the Hydrogen/Methane Breath Test and Genetic Test (C/T–13910 Polymorphism) Results. **Gastroenterol. Res. Pract.**, v. 2014, artigo 464382, 2014. DOI:10.1155/2014/464382.
6. SANTOS, A.O.; ABRANTES-COUTINHO, V.E.; MORAIS, S.; OLIVEIRA, T.M.B.F. *Agaricus bisporus* Wild Mushroom Extract as Lectin Source for Engineering a Lactose Photoelectrochemical Biosensor. **Biosensors**, v. 13, n. 2, p. 224, 2023. <https://doi.org/10.3390/bios13020224>.

