

LETROANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS UTILIZANDO UM BIOSSENSOR À BASE DE EXTRATOS DE *HEXAGONIA HYDNOIDES*

Waldiléia S. Rodrigues
Thiago Mielle B. F. Oliveira

Agência financiadora: CNPq

Eixo Temático/Área de Conhecimento: Ciências Exatas e da Terra/Química

1. INTRODUÇÃO

A floresta Amazônica possui uma ampla e rica biodiversidade, tornando-se um importante campo de estudo para trabalhos que explorem seus recursos naturais de forma sustentável (MARTINS *et al.*, 2016). Dentre as espécies que compõem este bioma estão os fungos (Reino Fungi), que são seres macro ou microscópicos, uni ou pluricelulares, eucariotas e heterótrofos, que podem ser divididos em cinco filos: *quitridiomycetos*, *ascomycetos*, *basidiomycetos*, *zigomicetos* e *os deuteromicetos*. Atualmente, são conhecidas cerca de 1,5 milhão de espécies fúngicas, sendo a maioria delas de natureza terrestres (JUSTO *et al.*, 2017). Algumas espécies de fungos apresentam potencial biotecnológico na biorremediação de áreas contaminadas, aplicações medicinais, ingrediente da culinária, entre outros (BONONI, 1998).

Em meio a grande diversidade de fungos estão os saprófitos, que são macroorganismos decompositores de material lignocelulósico,; utiliza a biomassa morta como fonte de nutrientes para sua sobrevivência. Desta maneira, os saprófitos são de grande importância para o ecossistema por desempenharem um importante papel na fertilidade do solo e manutenção do equilíbrio ecológico (HAWKSWORTH *et al.*, 1995). *Hexagonia hydnoides* (*Hex-hy*; Figura 1), popularmente conhecido como “orelha de pau”, apresenta características singulares quanto aos seus atributos fisiológicos e bioquímicos (WAKEFIELD, 1930), mas pouco se sabe sobre seus atributos biotecnológicos (JUSTO *et al.*, 2017).



Figura 1: Imagem do fungo saprófito *Hexagonia hydnoides*.

Os saprófitos são considerados fontes potenciais de enzimas e, por esta razão, há especulações em torno da utilização de sua biomassa como matéria-prima para a construção de biossensores eletroquímicos (GRAWE *et al.*, 2015). Esses dispositivos são capazes de fornecer informações analíticas simulando reações que acontecem *in vivo*. O sistema é composto por um receptor bioquímico imobilizado sobre um transdutor de sinal (eletrodo base), que converte a resposta química em um sinal elétrico apropriado, podendo ser potenciométrico, amperométrico, condutimétrico, piezelétrico, etc. (GUPTA *et al.*, 2011). Cada biossensor possui características e vantagens distintas e que variam de acordo o elemento de biorreconhecimento (proteínas, enzimas, anticorpos, etc.), podendo afetar a performance analítica em termos de sensibilidade, estabilidade da resposta, seletividade e vida útil para a determinação de várias substâncias-alvo (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Sabendo que podemos encontrar quantidades expressivas de polifenoloxidasas (enzimas que catalisam a reação de oxidação de compostos fenólicos) na biomassa de *Hex-hy*, este trabalho tem o propósito de investigar o potencial desta espécie fúngica como matéria-prima para o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para compostos fenólicos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A coleta do fungo saprófito foi realizada no município de Brejo Grande do Araguaia, localizado em uma microrregião amazônica pertencente ao estado do Pará. As amostras foram coletadas em sacos plásticos esterilizados e imediatamente levadas ao laboratório para a maceração e obtenção dos extratos proteicos. Para a extração, adicionou-se 5 g da biomassa fúngica em 50 mL de tampão fosfato (pH 7,0), mantido sob agitação constante por 12 h. O material resultante foi filtrado e usado para a construção do biossensor eletroquímico.

O dispositivo foi construído pela modificação de um eletrodo de carbono vítreo (ECV) com o extrato de *Hex-hy* por *drop-coating*. A atividade catalítica e expressão enzimática dos extratos em relação à reação de oxidação específica de compostos fenólicos foi avaliada por espectrofotometria UV-Visível (UV-Vis; espectrofotômetro Cary 50, Varian), utilizando o substrato *p*-aminofenol como molécula modelo, em meio de tampão acetato (pH 5,0).

Os experimentos eletroquímicos foram realizados em um potenciostato/galvanostato (μ - Autolab Type III, Methrom) conectado a uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos: *Hex-hy*/ECV como o eletrodo de trabalho, eletrodo de platina como auxiliar e eletrodo de Ag/AgCl/Cl⁻ saturado como referência. O comportamento eletroquímico do substrato foi avaliado por voltametria cíclica (VC), usando velocidades de varredura de 100 mV s⁻¹, utilizando tampão fosfato (pH 7,0) como eletrólito.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O potencial dos extratos proteicos de *Hexagonia hydnoidea* para catalisar a reação de oxidação do substrato *p*-aminofenol ($5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) foi avaliado em tampão acetato (pH 5,0) por espectrofotometria UV-Vis, ao longo de 3h de reação. Este valor de pH está dentro da faixa ideal para manter a atividade das polifenoloxidasas. Nestas condições, a banda característica do substrato ($\lambda_{\max} = 300$ nm) diminuiu com o tempo, em detrimento do aumento de uma banda próxima a 200 nm, justificada pela oxidação do *p*-aminofenol a derivados quinônicos, por um mecanismo envolvendo 2 H⁺ e 2 e⁻ (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Foi estimado que a atividade enzimática, provavelmente devido à polifenoloxidasas contidas no conteúdo proteico, foi expressada por 12 U mL⁻¹. Do ponto de vista eletroquímico, usando VC a 100 mV s⁻¹, o perfil voltamétrico do substrato foi caracterizado por um processo redox quase-reversível, com picos de oxidação (0,25 V) e redução (0,15 V) bem definidos. Em contato com o biossensor, houve a eletrocatalise da reação de oxidação do substrato, que foi representada por um processo redox irreversível em -0,1 V, relacionado com a redução de hidroquinona em benzoquinona (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Variando-se a concentração do substrato entre $2,5 \times 10^{-6}$ e $6,4 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, obteve-se elevada correlação ($r = 0,9989$) e reprodutibilidade adequada (%RSD < 6,5 para $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ do substrato; $n = 3$) das medidas, mesmo em baixas concentrações do analito. O limite de detecção obtido foi de $5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, mostrando a sensibilidade de *Hex-hy*/ECV para fins eletroanalíticos e o potencial biotecnológico dos fungos saprófitos nesta linha de pesquisa.

4. CONDIÇÕES FINAIS

O presente trabalho mostra que a biomassa de *Hexagonia hydnoidea* possui conteúdo proteico capaz de catalisar a reação de oxidação de derivados fenólicos. O potencial biotecnológico desta espécie foi comprovado pela utilização de extratos de sua biomassa na configuração do biossensor eletroquímico *Hex-hy*/ECV que, por sua vez, apresentou elevada atividade eletrocatalítica em relação à oxidação do substrato *p*-aminofenol, além de permitir determiná-lo em baixas concentrações (limite de detecção de $5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹) e com precisão adequada das medidas (%RSD < 6,5 para $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ do substrato; $n=3$).

REFERÊNCIAS

- BONONI, V.L R. Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. Instituto de Botânica, São Paulo, p.107-128, 1998.
- GRAWE, G. F.; OLIVEIRA, T. R.; NARCISO, E. A.; MOCCELINI, S. K. CASTILHO, M. Electrochemical biosensor for carbofuran pesticide based on esterases from *Eupenicillium shearii* FREI-39 endophytic fungus. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 63, p. 407-413, 2015.

- GUPTA, V.K.; JAIN, R.; RADHAPYARI, K.; JADON, N.; AGARWAL, S. Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals—A review. **Analytical Biochemistry**, v. 408, p. 179–196, 2011.
- HAWKSWORTH, D. L. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. Cambridge: CAB International, p. 616, 1995.
- JUSTO, A.; MIETTINEN, O.; FLOUDAS, D.; ORTIZ-SANTANA B.; HIBBETT, D. S. A revised family-level classification of the Polyporales (Basidiomycota). **Fungal Biology**, v. 121, p. 798-824, 2017.
- MARTINS, F. J.; CANESCHI, C. A.; VIEIRA, J. L. F.; BARBOSA, W.; RAPOSO, N.R.B. Aintioxidant acitivity and potencial photoprotective from amazona native flora extracts. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 161 p. 34-39, 2016.
- OLIVEIRA, T. M. B. F. Biossensores enzimáticos para detecção e quantificação de carbonato em amostras de alimentos. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Ceará, Fortaleza-CE, 2013.
- OLIVEIRA, T. M. B. F.; BARROSO, M.F.; MORAIS, S. ARAUJO, M.; FREIRE, C.; DE LIMA-NETO, P.; ADRIANA N. CORREIA, A. N.; OLIVEIRA, M.B.P.P.; DELERUE-MATOS, C. **Sensitive bi-enzymatic biosensor based on polyphenoloxidases-gold nanoparticles- chitosan hybrid film–graphene doped carbono paste electrode for carbamates detection**. *Bioelectrochemistry*, v. 98, p. 20-29, 2014.
- PUTZKE, J. Lista dos fungos Agaricales (Hymenomycetes, Basidiomycotina) referidos para o Brasil. Caderno de Pesquisa. Sér. Bot'; Universidade de Santa Cruz do Sul, p. 186, 1994.
- WAKEFIELD E. M. Transactions of the British Mycological Society. **Fungi Exotici: Past work and present problems**. v. 15, 12-31, 1930.