



Caracterização de cogumelos silvestres da espécie *Amanita ponderosa*

Produção de metabolitos com atividade biológica

Cátia Sofia Clemente Salvador

Tese apresentada à Universidade de Évora
para obtenção do Grau de Doutor em Bioquímica

ORIENTADORAS: *Prof. Doutora Ana Teresa Fialho Caeiro Caldeira*
Prof. Doutora Maria do Rosário Caeiro Martins
Doutora Maria de Fátima Pereira Duarte

ÉVORA, DEZEMBRO 2014



Esta Tese teve o apoio financeiro da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) (Bolsa de Doutoramento, SFRH/BD/61184/2009), através do programa QREN-POPH-tipologia 4.1., coparticipado pelo Fundo Social Europeu (FSE) e Fundo Nacional MCTES.



*“ A alegria de ver e compreender é
a mais bela dádiva da natureza”*

Albert Einstein

Agradecimentos

À minha orientadora Professora Ana Teresa Caldeira e coorientadora Professora Maria do Rosário Martins apresento um profundo agradecimento pelo suporte prestado nesta longa etapa. Agradeço imenso pela permanente orientação, por todo o auxílio, dedicação e incansável disponibilidade durante a realização deste trabalho. Agradeço também a amizade, apoio e incentivo que me permitiu concluir este projeto.

À minha coorientadora Doutora Maria de Fátima Duarte, do centro de investigação CEBAL, agradeço pela forma como me acolheu na sua equipa de investigação, pela disponibilidade e interesse que sempre mostrou e principalmente pela orientação numa relevante parte do meu trabalho que foram os ensaios em cultura de células.

Ao Professor José Maria dos Santos Arteiro agradeço por todos os conhecimentos transmitidos desde que iniciei o trabalho no Laboratório de Biotecnologia e pelas importantes palavras de incentivo e encorajamento para continuar a apostar na investigação científica para a minha formação profissional.

Ao Professor Júlio da Cruz Morais agradeço pelo apoio, incentivo e auxílio prestado durante a fase inicial do meu doutoramento.

Diriijo também os meus agradecimentos aos Professores do Departamento de Química que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento do meu trabalho.

Ao Professor Henrique Vicente agradeço pela transmissão de conhecimentos e importante colaboração na valorização de parte da minha investigação. À Professora Dora Teixeira e ao Professor António Pereira agradeço pela ajuda na realização de alguns ensaios experimentais e análises químicas de compostos, Agradeço ainda ao Professor António Candeias pela cedência de verbas que possibilitaram a divulgação do meu trabalho em congressos científicos. A todos agradeço pela disponibilização de equipamentos e espaços laboratoriais fundamentais ao desenvolvimento do meu projeto de Doutoramento. Agradeço também às Professoras Célia Antunes e Ana

Rodrigues Costa e ao Professor Luís Martins por me terem acolhido e integrado nos projetos em curso durante a fase inicial do doutoramento, tornando possível a aprendizagem de novas metodologias indispensáveis à concretização de algumas etapas do meu trabalho de investigação.

Gostaria de agradecer ao grupo de investigação do Centro de Engenharia Química e Biotecnológica do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa. Ao Professor Amin Karmali, gostaria de agradecer pelo interesse que manifestou pelo meu trabalho, incentivando à aplicação de metodologias imunológicas, o que permitiu enriquecer e valorizar a investigação em curso. Agradeço ainda a colaboração da Doutora Sónia Martins e da Eng. Magda Semedo, pela cedência de anticorpos que produziram no seu centro de investigação, assim como a partilha de metodologias nesta área.

À Dr.^a Maria de Fátima Candeias quero agradecer pela importante colaboração na fase de realização dos ensaios toxicológicos em animais, pela sua constante disponibilidade, interesse e transmissão de conhecimentos nestas aplicações. Agradeço à Eng. Mónica Morais de Brito pela colaboração na obtenção das fotografias de microscópio, e à Eng. Maria do Céu Serralheiro pelo acompanhamento laboratorial durante a realização das análises inorgânicas.

Um especial obrigado ao meu grupo de Laboratório: Doutora Marina González, Mestres Mara Silva e Sílvia Arantes, e Drs. Tânia Rosado, Ana Branco, Patrícia Nunes, Ana Fialho e Ricardo Vieira pela amizade e companheirismo

Agradeço às técnicas de laboratório D. Maria Helena Carvalho, D. Anabela Cabeça e D. Esperança Alves por tornarem mais fácil a gestão de logística laboratorial.

Aos meus pais Maria Vicência e José Salvador pelo incansável apoio, compreensão, e constantes palavras de incentivo. Foi esse suporte emocional que me permitiu chegar até aqui. Agradeço também ao Carlos Travanca pelo suporte e incentivo, que me fez continuar quando tudo parecia mais difícil.

Obrigada a todos!

Resumo

Amanita ponderosa é uma espécie de cogumelos silvestres, comestível, característica de alguns microclimas mediterrânicos, existente na Península Ibérica. Neste estudo, avaliaram-se as propriedades biológicas e toxicológicas destes cogumelos e culturas, com vista a valorizar o seu potencial biotecnológico. Desenvolveu-se também uma metodologia de monitorização, utilizando técnicas de microanálise e imunológicas para *screening* e análise da especificidade de produção dos compostos bioativos.

Os corpos de frutificação apresentaram um relevante conteúdo mineral e um perfil molecular correlacionável com o local de colheita. Tanto os cogumelos como as culturas e seus extratos revelaram baixa toxicidade, *in vitro* e *in vivo*, apresentaram propriedades antioxidantes, capacidade hepatoprotetora e efeito antiproliferativo em células MDA-MB-231.

Estes resultados sugerem que *A. ponderosa* e/ou os seus extratos podem constituir uma importante fonte de compostos bioativos, com potencial valor nutracêutico e medicinal, podendo ser utilizados como suplementos alimentares, coadjuvantes no tratamento de doenças hepáticas e/ou tumorais.

Palavras-Chave: *Amanita ponderosa*; cogumelos silvestres comestíveis, composição inorgânica, M13-PCR, complexos proteína-polissacárido, propriedades antioxidantes, efeito hepatoprotetor, atividade antitumoral.

Characterisation of *Amanita ponderosa* wild mushrooms: production of metabolites with biological activity

Abstract

Amanita ponderosa is a species of wild edible mushrooms that grows in some Mediterranean microclimates in the Iberian Peninsula. In this study, we evaluated the biological and toxicological properties of these mushrooms and cultures, in order to enhance their biotechnological potential.

A monitoring methodology was also developed using microanalysis and immunological techniques, for screening and specificity evaluation of bioactive compounds production. The fruiting bodies presented a relevant mineral content and a characteristic molecular profile correlated with the geographical location. Either mushrooms or cultures and extracts have shown low toxicity *in vitro* and *in vivo*, and presented antioxidant properties, hepatoprotective effect and MDA-MB-231 antiproliferative activity. These results suggest that *A. ponderosa* and their extracts may constitute an important source of bioactive compounds with antioxidant benefits, nutraceutical potential and medicinal value, that can be used as dietetic supplements and as co-adjuvant of liver and cancer disease treatments.

Keywords: *Amanita ponderosa*; wild edible mushrooms, inorganic content, M13-PCR, protein-polysaccharide complexes, antioxidant properties, hepatoprotective effect, antitumoral activity.

Índice geral

| | |
|--|---------------|
| Agradecimentos | V |
| Resumo | VII |
| Abstract | IX |
| Índice geral | XI |
| Índice de figuras | XIX |
| Índice de tabelas | XXIX |
| Abreviaturas | XXXIII |
| Unidades de medida | XXXVII |
| Publicações relacionadas | XXXIX |
| Objetivos e metodologia do trabalho | 1 |
| | |
| Capítulo 1 – Cogumelos silvestres e seus metabolitos: propriedades biológicas 5 | |
| 1.1 Introdução | 7 |
| 1.2 Cogumelos: Algumas considerações | 8 |
| 1.3 Género <i>Amanita</i> | 10 |
| 1.3.1 Espécies venenosas do género <i>Amanita</i> | 11 |
| 1.3.2 Espécies comestíveis do género <i>Amanita</i> | 13 |
| 1.3.3 <i>Amanita ponderosa</i> | 15 |
| 1.4 Cogumelos silvestres comestíveis | 19 |
| 1.4.1 Valorização económica | 20 |
| 1.4.2 Valor nutricional | 21 |
| 1.4.3 Propriedades medicinais | 24 |
| 1.5 Compostos biologicamente ativos | 27 |
| 1.6 Atividades biológicas | 32 |
| 1.6.1 Propriedades antioxidantes | 32 |
| 1.6.2 Efeito hepatoprotetor | 36 |
| 1.6.3 Atividade antitumoral | 41 |

| | |
|---|-----------|
| Capítulo 2 – Caracterização inorgânica, isolamento e análise molecular de estirpes de <i>A. ponderosa</i> | 49 |
| 2.1 Introdução | 51 |
| 2.2 Metodologia | 55 |
| 2.2.1 Amostras | 55 |
| 2.2.2 Determinação da composição mineral | 57 |
| 2.2.2.1 Tratamento das amostras de corpos de frutificação | 57 |
| 2.2.2.2 Tratamento das amostras de solo | 58 |
| 2.2.2.3 Determinação do conteúdo mineral das amostras de corpos de frutificação e solo | 59 |
| 2.2.3 Isolamento, identificação e cultura de culturas puras | 60 |
| 2.2.4 Análise molecular das estirpes isoladas | 61 |
| 2.2.4.1 Extração do DNA – Método das microesferas adaptado | 62 |
| 2.2.4.2 Quantificação do DNA | 63 |
| 2.2.4.3 Amplificação do DNA por M13-PCR | 63 |
| 2.2.4.4 Amplificação de sequenciação da região ITS | 65 |
| 2.2.5 Análise estatística | 65 |
| 2.3 Resultados e discussão | 67 |
| 2.3.1 Análise da composição mineral presente nos corpos de frutificação | 67 |
| 2.3.2 Caracterização de culturas de <i>A. ponderosa</i> e estirpes fúngicas que vivem em associação com esta espécie | 82 |
| 2.3.3 Perfil genético de cogumelos <i>A. ponderosa</i> e de estirpes fúngicas que vivem em associação no seu <i>habitat</i> natural | 87 |
| | |
| Capítulo 3 – Produção e atividade biológica de compostos bioativos produzidos em culturas de <i>A. ponderosa</i> | 97 |
| 3.1 Introdução | 99 |
| 3.2 Metodologia | 102 |
| 3.2.1 Amostras | 102 |
| 3.2.2 Culturas líquidas | 102 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 3.2.2.1 | Obtenção da biomassa | 103 |
| 3.2.3 | Extração dos compostos lipofílicos | 103 |
| 3.2.4 | Extração de compostos fenólicos pelo método de desintegração com areia | 104 |
| 3.2.4.1 | Quantificação de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu | 105 |
| 3.2.5 | Extração dos complexos proteína-polissacárido dos corpos de frutificação e culturas | 105 |
| 3.2.5.1 | Quantificação de polissacáridos pelo método do fenol-ácido sulfúrico | 106 |
| 3.2.5.2 | Quantificação de proteína pelo método de Bradford | 107 |
| 3.2.6 | Avaliação das propriedades antioxidantes | 107 |
| 3.2.6.1 | Método de redução do radical DPPH | 107 |
| 3.2.6.2 | Método do β -caroteno/ácido linoleico | 109 |
| 3.2.6.3 | Atividade enzimática da catalase (CAT) | 110 |
| 3.2.6.4 | Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) | 111 |
| 3.2.7 | Avaliação do efeito das culturas de <i>A. ponderosa</i> em células MDA-MB231 | 113 |
| 3.2.7.1 | Cultura celular e manuseamento | 113 |
| 3.2.7.2 | Proliferação celular | 113 |
| 3.2.8 | Análise estatística | 115 |
| 3.3 | Resultados e discussão | 117 |
| 3.3.1 | Análise das propriedades antioxidantes presentes nos corpos de frutificação e nas culturas de <i>A. ponderosa</i> | 117 |
| 3.3.2 | Análise das propriedades antioxidantes nos extratos lipofílicos | 123 |
| 3.3.3 | Análise das propriedades antioxidantes nos extratos fenólicos | 127 |
| 3.3.4 | Análise das propriedades antioxidantes nos extratos de complexos proteína-polissacáridos | 133 |
| 3.3.5 | Análise do potencial antiproliferativo das culturas de <i>A. ponderosa</i> | 140 |

Capítulo 4 – Avaliação da atividade toxicológica das culturas e de extratos

| | |
|--|------------|
| bioativos de <i>A. ponderosa</i> | 145 |
| 4.1 Introdução | 147 |
| 4.2 Metodologia | 149 |
| 4.2.1 Amostras | 149 |
| 4.2.2 Avaliação da letalidade em <i>Artemia salina</i> | 149 |
| 4.2.3 Estudos em modelos animais | 151 |
| 4.2.3.1 Animais | 151 |
| 4.2.3.2 Avaliação da toxicidade aguda em murganhos <i>Swiss</i> | 151 |
| 4.2.3.3 Avaliação do efeito hepatoprotetor <i>in vivo</i> | 153 |
| 4.2.3.3.1 Determinação cinética de aspartato-aminotransferase (AST) | 155 |
| 4.2.3.3.2 Determinação cinética de alanina-aminotransferase (ALT) | 155 |
| 4.2.3.3.3 Determinação cinética de fosfatase alcalina (ALP) | 156 |
| 4.2.3.3.4 Determinação cinética de gama-glutamilttransferase (GGT) | 157 |
| 4.2.4 Análise estatística | 158 |
| 4.3 Resultados e discussão | 159 |
| 4.3.1 Avaliação da letalidade em <i>A. salina</i> dos corpos de frutificação, culturas e extratos bioativos | 159 |
| 4.3.2 Avaliação da toxicidade aguda dos corpos de frutificação e micélios das culturas em murganhos <i>Swiss</i> | 163 |
| 4.3.3 Avaliação do efeito hepatoprotetor dos corpos de frutificação e micélios das culturas | 164 |

Capítulo 5 – Caracterização e atividade biológica de complexos proteína – polissacárido produzidos em culturas de *A. ponderosa*

| | |
|----------------------------------|-----|
| 5.1 Introdução | 175 |
| 5.2 Metodologia | 177 |
| 5.2.1 Amostras | 177 |
| 5.2.2 Culturas líquidas | 177 |
| 5.2.2.1 Determinação da biomassa | 178 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 5.2.3 | Extração dos complexos PPS dos corpos de frutificação e culturas | 178 |
| 5.2.3.1 | Quantificação de polissacáridos e proteína nos extratos de complexos PPS | 178 |
| 5.2.4 | Análise dos compostos proteína-polissacárido (PPS) | 179 |
| 5.2.4.1 | Análise por FTIR-ATR | 179 |
| 5.2.4.2 | Análise por microscopia Raman | 180 |
| 5.2.4.3 | Caracterização dos complexos PPS por SEC-UV-RI-HPLC | 181 |
| 5.2.4.4 | Separação dos complexos PPS intracelulares por cromatografia de exclusão molecular (SEC) | 182 |
| 5.2.4.5 | Separação dos complexos PPS por cromatografia de troca iônica (IEC) | 183 |
| 5.2.5 | Avaliação do efeito dos extratos PPS de <i>A. ponderosa</i> em células MDA-MB231 | 184 |
| 5.2.5.1 | Cultura celular e manuseamento | 184 |
| 5.2.5.2 | Proliferação celular | 184 |
| 5.2.6 | Reconhecimento de complexos PPS por anticorpos específicos | 185 |
| 5.2.6.1 | <i>Screening</i> de detecção de complexos PPS pelos anticorpos produzidos através método <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA) | 185 |
| 5.2.6.2 | Deteção dos complexos PPS produzidos nas culturas e nas frações obtidas por análise cromatográfica | 186 |
| 5.2.6.3 | Análise do tipo de competição antigénica por ELISA | 187 |
| 5.2.7 | Confirmação da especificidade do anticorpo por <i>Western blotting</i> | 188 |
| 5.2.7.1 | Análise dos extratos de complexos PPS e frações purificadas por eletroforese PAGE-Nativa | 188 |
| 5.2.7.2 | Coloração com nitrato de prata | 189 |
| 5.2.7.3 | Transferência das amostras do gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose | 190 |
| 5.2.7.4 | Análise por ELISA da especificidade do anticorpo para o antígeno transferido em membrana de nitrocelulose | 191 |

| | | |
|---|--|------------|
| 5.2.8 | Análise estatística | 192 |
| 5.3 | Resultados e discussão | 193 |
| 5.3.1 | Produção e isolamento de complexos proteína-polissacárido em culturas de <i>A. ponderosa</i> | 193 |
| 5.3.2 | Deteção de compostos PPS por FTIR-ATR e Raman | 194 |
| 5.3.3 | Separação dos compostos PPS por SEC-UV-RI-HPLC | 198 |
| 5.3.4 | Análise do potencial antiproliferativo dos complexos PPS produzidos em culturas de <i>A. ponderosa</i> | 203 |
| 5.3.5 | Reconhecimento de complexos PPS de extratos de corpos de frutificação e culturas por anticorpos específicos | 207 |
| 5.3.6 | Análise do perfil de produção de complexos PPS em culturas de <i>A. ponderosa</i> | 208 |
| 5.3.7 | Purificação dos extratos de complexos PPS por cromatografia de exclusão molecular (SEC) e troca iónica (IEC) | 210 |
| 5.3.8 | Reconhecimento dos extratos de complexos PPS e frações purificadas por anticorpo específico | 216 |
| 5.3.9 | Análise da competitividade antigénica para os complexos PPS produzidos em culturas de <i>A. ponderosa</i> | 219 |
| 5.3.10 | Análise da especificidade do anticorpo para os complexos PPS produzidos em culturas de <i>A. ponderosa</i> | 221 |
| Capítulo 6 – Conclusões e perspectivas futuras | | 225 |
| Referências | | 237 |
| Anexos | | 259 |
| Anexo A – Composição química dos meios de cultura utilizados no isolamento das estirpes fúngicas e produção de culturas líquidas. | | 261 |
| Anexo B – Composição de algumas soluções utilizadas no capítulo 2 | | 263 |

| | |
|--|------|
| Anexo C – Curvas de calibração padrão utilizadas para quantificação dos compostos bioativos | 264 |
| Anexo D – Curvas de calibração padrão e dose resposta utilizadas para análise das atividades biológicas | 266 |
| Anexo E – Curvas de dose resposta obtidas nos ensaios de potencial antiproliferativo em células tumorais humanas MDA-MB-23 | 2668 |
| Anexo F – Composição do meio salino e curva de dose resposta utilizados nos ensaios de toxicidade em <i>Artemia salina</i> | 268 |
| Anexo G – Curvas de calibração padrão utilizadas para a caracterização dos extratos PPS | 271 |
| Anexo H – Registo da atividade dos anticorpos e curva de calibração para análise do reconhecimento dos compostos PPS | 2733 |
| Anexo I –Análise da produção de biomassa nas culturas de <i>A. ponderosa</i> | 2744 |
| Anexo J – Análise estatística | 2755 |
| J.I - Análise estatística referente à caracterização química e inorgânica dos corpos de frutificação de <i>A. ponderosa</i> e amostras de solos. | 2755 |
| J.II – Análise estatística referente à quantificação e avaliação das propriedades biológicas dos corpos de frutificação e culturas de <i>A. ponderosa</i> e extratos lipofílicos, fenólicos e complexos PPS. | 2955 |
| J.III – Análise estatística referente à avaliação do efeito hepatoprotetor pela avaliação das atividades enzimáticas AST, ALT, ALP e GGT. | 3022 |

Índice de figuras

- Figura 1.1. Aspetos morfológicos gerais de cogumelos (Adaptada de 1). 8
- Figura 1.2. Esquema representativo da formação de micorrizas entre cogumelos simbiotes e plantas (Adaptada de 2). 9
- Figura 1.3. Algumas espécies tóxicas do género *Amanita*: *A. phalloides* (a), *A. bisporigera* (b), *A. verna* (c), *A. virosa* (d), *A. pantherina* (e), *A. muscaria* (f), *A. boudieri* (g), *A. próxima* (h) (Adaptada de 3, 4, 5). 13
- Figura 1.4. Espécies de cogumelos comestíveis do género *Amanita*: *A. ponderosa* (a), *A. curtirpes* (b), *A. caesaria* (c) e *A. ovoidea* (d) (Adaptada de 6, 7). 14
- Figura 1.5. Classificação taxonómica da espécie *A. ponderosa*. 15
- Figura 1.6. Aspetos macroscópicos de cogumelos *A. ponderosa* em diferentes fases de crescimento: adulto na maturidade apresentando um chapéu de morfologia plana-convexa (a), adulto jovem com um chapéu de morfologia hemisférica (b) e jovem coberto pelo véu universal (c). 16
- Figura 1.7. Aspetos macroscópicos de cogumelos *A. ponderosa*: adulto jovem onde se observam a volva, o anel em torno do pé e margem do chapéu curvada para dentro com o restante do véu universal (a), pormenor do himénio lamelado (b) e detalhe da constituição interior do corpo de frutificação (c). 17
- Figura 1.8. Processo de recolha de cogumelos *A. ponderosa*: corpo de frutificação no seu *habitat* natural em associação com *C. ladanifer* (a), corpo de frutificação parcialmente emergido do solo (b) e totalmente extraído do solo (c). 18
- Figura 1.9. Representação exemplificativa das conexões β -(1,3) e (1,6) de D-glucanos (Adaptada de 8). 30
- Figura 1.10. Esquema exemplificativo da formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) e mecanismos antioxidantes nos sistemas biológicos (Adaptada de Grob *et al.* 2013). 34
- Figura 1.11. Principais vias metabólicas da utilização dos compostos de azoto na célula hepática (Adaptada de (Smith *et al.* 2007). 38
- Figura 1.12. Localização dos enzimas hepatocelulares (Adaptada de (McPherson & Pincus 2011). 38
- Figura 1.13. Mecanismo possível de ação dos β -D-glucanos como modificadores da resposta biológica (Adaptada de (Wasser 2002). 44
- Figura 2.1. Local de colheita da amostra de *A. ponderosa* da área florestal de montado da região de Évora, com exibição da vegetação envolvente de *Quercus suber* (a), *Cistus ladanifer* (b) e amostra de corpo de frutificação recolhido neste local (c). 55
- Figura 2.2. Amostras de corpos de frutificação de *A. ponderosa* após secagem em estufa a 100°C (a), carbonização das amostras secas em mufla (b), cinzas obtidas

após a carbonização das amostras (c) e cinzas após branqueamento com ácido nítrico 2 M (d). 58

Figura 2.3. Processo de tratamento das amostras de solo: secagem (a), crivagem (b), extração (c) e filtração do extrato final (d). 59

Figura 2.4. Isolamento das estirpes da *A. ponderosa* em meio de cultura sólido: corpo de frutificação de *A. ponderosa* (a), inoculação das amostras de *A. ponderosa* (b) culturas puras de *A. ponderosa* (c) e culturas puras de estirpes fúngicas que vivem em associação com *A. ponderosa* (d). 61

Figura 2.5. Obtenção do DNA fúngico extraído após precipitação com etanol. 63

Figura 2.6. Conteúdo médio em água, massa seca, matéria orgânica e minerais presente nas amostras de *A. ponderosa* 69

Figura 2.7. Variação da concentração dos elementos presentes nos corpos de frutificação de *A. ponderosa* e nas amostras de solo. Os valores de concentração estão apresentados em escala logarítmica uma vez que o conteúdo de cada mineral é bastante distinto. 80

Figura 2.8. Corpo de frutificação de *A. ponderosa* (a), características micromorfológicas do himénio do corpo de frutificação, com observação dos basídios (b), micélio de *A. ponderosa* em meio sólido (c), características micromorfológicas do micélio com observação de hifas septadas ramificadas nas extremidades (d₁) e (d₂) e formação de ansas de anastomose (d₃). 84

Figura 2.9. Eletroforetograma de perfis de DNA obtidos por M13-PCR *fingerprinting* correspondente ao DNA de diferentes amostras de cogumelos *A. ponderosa* recolhidos em diferentes locais, quatro estirpes de *Basidiomycetes* e dez estirpes fúngicas isoladas que vivem em associação com esta espécie de cogumelos no seu *habitat* natural. M e M': marcador de massas moleculares de DNA 100 bp Plus (Fermentas), 1 – *A. ponderosa* (Azaruja); 2 – *A. ponderosa* (Guadalupe); 3 – *A. ponderosa* (Évora); 4 – micélio sp.1; 5 – micélio sp.2; 6 – *Penicillium* sp.1; 7 – *Mucor* sp.1; 8 – micélio sp.3; 9 – *Penicillium* sp.2; 10 – *Cladobotryum* sp. 1; 11 – *Aspergillus* sp.1; 12 – *Aspergillus* sp. 2; 13 – *Cladobotryum* sp.2; 14 – *L. edodes*; 15 – *P. ostreatus*; 16 – *C. versicolor*; 17 – *L. deliciosus*; 18 – Branco. 88

Figura 2.10. Eletroforetograma obtido através de M13-PCR *fingerprinting* correspondente ao DNA de diferentes amostras de cogumelos *A. ponderosa*, quatro estirpes de *Basidiomycetes*, uma estirpe de *Ascomycetes* e seis estirpes fúngicas de fungos isolados de *A. ponderosa*. M e M' – Marcador de DNA 100 bp Plus (Fermentas); 1 – *A. ponderosa* (Mértola); 2 – *A. ponderosa* (Rosal de la Frontera); 3 – *A. ponderosa* (S^{to} Aleixo R.); 4 – *A. ponderosa* (Beja); 5 – *A. ponderosa* (Evoramonte); 6 – *P. ostreatus*; 7 – *C. versicolor*; 8 – *L. deliciosus*; 9 – *L. edodes*; 10 – *T. arenaria*; 11 – *Mucor* sp.2; 12 – *Aspergillus* sp.3; 13 – *Penicillium* sp.3; 14 – *Cladobotryum* sp.3; 15 – *Penicillium* sp.4; 16 – *Penicillium* sp.5; 17 – Branco. 89

Figura 2.11. Dendograma baseado na análise dos perfis genéticos obtidos após M13-PCR *fingerprinting* para três amostras de *A. ponderosa*, quatro estirpes de *Basidiomycetes* (*P. ostreatus*, *C. versicolor*, *L. edodes* e *L. deliciosus*) e dez estirpes fúngicas isoladas. Os valores de distância entre os *clusters* são expressos como percentagem de similaridade (0-100%). 92

Figura 2.12. Dendograma baseado na análise dos perfis genéticos obtidos após M13-PCR *fingerprinting* para cinco amostras de *A. ponderosa*, quatro estirpes de

Basidiomycetes (*P. ostreatus*, *C. versicolor*, *L. edodes* e *L. deliciosus*), uma estirpe de *Ascomycete*, *T. arenaria*, e seis estirpes fúngicas isoladas. Os valores de distância entre os *clusters* são expressos como percentagem de similaridade (0-100%). 93

Figura 3.1. Produção de culturas líquidas de micélios isolados de *A. ponderosa*: incubação a 28°C em agitação orbital, a 150 rpm (a) e aspeto da cultura crescida ao fim de 15 dias de incubação (b). 102

Figura 3.2. Representação da montagem do extrator *Soxhlet* para a extração dos compostos lipofílicos (a), pormenor do cartucho contendo a amostra liofilizada de corpos de frutificação e micélios de *A. ponderosa* (b). 103

Figura 3.3. Representação da montagem da camara de vácuo para a extração dos compostos fenólicos totais nas amostras de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das culturas. 104

Figura 3.4. Extração dos extratos PPS extra e intracelulares por precipitação com a adição de etanol a 96% (a) e quantificação pelo método do fenol-ácido sulfúrico (b). 106

Figura 3.5. Cultura de células MDA-MB-231 em placa de 96 poços após 24 h de incubação com crescentes concentrações de extratos liofilizados de micélios e sobrenadantes de *A. ponderosa* (a), células em DMSO (b), células em presença de 500 µg mL⁻¹ de extrato liofilizado (c) e cristais de formazão dissolvidos na solução de DMSO/ etanol (1:1 v/v) para leitura da absorvância a 570 nm (d). 115

Figura 3.6. Cogumelo silvestre comestível da espécie *A. ponderosa*: características macroscópicas (a), micélio de culturas puras de *A. ponderosa* em meio sólido (b), culturas líquidas de micélios isolados de *A. ponderosa* (c), características morfológicas do micélio de *pellet* das culturas líquidas de *A. ponderosa* (d). 117

Figura 3.7. Atividade antioxidante presente nas amostras secas de corpos de frutificação de *A. ponderosa* e amostras liofilizadas de micélios e sobrenadantes das culturas líquidas das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R., avaliada pelo método do radical livre DPPH. Os valores apresentados são a média ± desvio padrão de seis réplicas. Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si ($p < 0,05$) para cada um dos parâmetros em análise. 120

Figura 3.8. Atividade antioxidante presente nas amostras secas de corpos de frutificação de *A. ponderosa* e amostras liofilizadas de micélios e sobrenadantes das culturas líquidas das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R., avaliada pelo método do β-caroteno/ácido linoleico. Os valores apresentados são a média ± desvio padrão de seis réplicas. Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si ($p < 0,05$) para cada um dos parâmetros em análise. 120

Figura 3.9. Atividade enzimática do enzima catalase avaliada em amostras secas de corpos de frutificação de *A. ponderosa* e amostras liofilizadas de micélios e sobrenadantes das culturas líquidas das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R.. Os valores apresentados são a média ± desvio padrão de três réplicas. Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si ($p < 0,05$). 122

Figura 3.10. Atividade enzimática do enzima superóxido dismutase avaliada em amostras secas de corpos de frutificação de *A. ponderosa* e amostras liofilizadas de micélios e sobrenadantes das culturas líquidas das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R.. Os valores apresentados são a média ± desvio padrão de três réplicas.

Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si ($p < 0,05$). 122

Figura 3.11. Atividade antioxidante determinada pelo DPPH presente nos extratos lipofílicos extraídos de corpos de frutificação e micélios das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R.. Os valores apresentados são a média \pm desvio padrão de seis réplicas. Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si ($p < 0,05$). 124

Figura 3.12. Atividade antioxidante determinada pelo método do β -caroteno/ácido linoleico presente nos extratos lipofílicos extraídos de corpos de frutificação e micélios das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R.. Os valores apresentados são a média \pm desvio padrão de seis réplicas. Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si ($p < 0,05$). 124

Figura 3.13. Atividade enzimática do enzima catalase avaliada extratos lipofílicos extraídos de corpos de frutificação e micélios das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R.. Os valores apresentados são a média \pm desvio padrão de três réplicas. Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si ($p < 0,05$). 126

Figura 3.14. Atividade enzimática do enzima superóxido dismutase avaliada extratos lipofílicos extraídos de corpos de frutificação e micélios das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R.. Os valores apresentados são a média \pm desvio padrão de três réplicas. Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si ($p < 0,05$). 126

Figura 3.15. Quantificação de compostos fenólicos extraídos de corpos de frutificação de *A. ponderosa* e amostras liofilizadas de micélios e sobrenadantes das culturas líquidas das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R.. Os valores apresentados são a média \pm desvio padrão de seis réplicas. Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si ($p < 0,05$). 128

Figura 3.16. Atividade antioxidante determinada pelo DPPH presente nos extratos fenólicos totais extraídos de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R.. Os valores apresentados são a média \pm desvio padrão de seis réplicas. Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si ($p < 0,05$). 130

Figura 3.17. Atividade antioxidante determinada pelo método do β -caroteno/ácido linoleico presente nos extratos fenólicos totais extraídos de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R.. Os valores apresentados são a média \pm desvio padrão de seis réplicas. Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si ($p < 0,05$). 130

Figura 3.18. Atividade enzimática do enzima catalase avaliada extratos fenólicos totais extraídos de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R.. Os valores apresentados são a média \pm desvio padrão de três réplicas. Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si ($p < 0,05$). 132

Figura 3.19. Atividade enzimática do enzima superóxido dismutase avaliada extratos fenólicos totais extraídos de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R.. Os valores apresentados são a média \pm desvio padrão de três réplicas. Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si ($p < 0,05$). 132

Figura 3.20. Quantificação de polissacáridos e de proteína de extratos obtidos de: (a) corpos de frutificação, (b) micélios e (c) sobrenadantes. Os valores apresentados são a média \pm desvio padrão de três réplicas. Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si ($p < 0,05$) para cada um dos parâmetros em análise de conteúdo polissacarídico e proteico. 135

Figura 3.21. Atividade antioxidante presente extratos de complexos proteína-polissacáridos extraídos de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R., avaliada pelo método do radical livre DPPH. Os valores apresentados são a média \pm desvio padrão de seis réplicas. Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si ($p < 0,05$). 137

Figura 3.22. Atividade antioxidante determinada pelo método do β -caroteno/ácido linoleico presente nos extratos de complexos proteína-polissacáridos extraídos de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R.. Os valores apresentados são a média \pm desvio padrão de seis réplicas. Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si ($p < 0,05$). 137

Figura 3.23. Atividade enzimática do enzima catalase avaliada extratos de complexos proteína-polissacáridos extraídos de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R.. Os valores apresentados são a média \pm desvio padrão de três réplicas. Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si ($p < 0,05$). 139

Figura 3.24. Atividade enzimática do enzima superóxido dismutase avaliada extratos de complexos proteína-polissacáridos extraídos de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R.. Os valores apresentados são a média \pm desvio padrão de três réplicas. Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si ($p < 0,05$). 139

Figura 3.25. Efeito das amostras liofilizadas de sobrenadantes das culturas de *A. ponderosa* na proliferação celular das células MDA-MB-231. As culturas de células MDA-MB-231 foram efetuadas em placas de 96 poços com a concentração de $2,5 \times 10^4$ células em meio DMEM com DMSO (a), sobrenadante das culturas de *A. ponderosa* na concentração de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ (b), $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (c) e $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ (d). 140

Figura 3.26. Curvas de crescimento da linha celular de cancro mamário humano (MDA-MB-231) incubadas a diferentes concentrações de micélios (a) e sobrenadantes (b) de culturas de *A. ponderosa* das estirpes isoladas de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R.. 141

Figura 4.1. Ensaio de toxicidade em *A. salina*: placa com náuplios eclodidos após período de incubação (a), exemplar de náuplio observado à lupa (ampliação de 400x) (b), esquema de placa de ensaio (c), observação de náuplios no poço de ensaio (d). 150

Figura 4.2. Ensaio de toxicidade de murganhos *Swiss*: representação de murganho *Swiss* do ensaio (a), administração oral das amostras (b), gaiola na qual os murganhos foram mantidos durante o ensaio (c), e testes de *screening* farmacológico, nomeadamente reflexo pineal (d), teste de tração (e) e atividade motora (f). 152

Figura 4.3. Ensaio de avaliação do efeito hepatoprotetor em ratos Wistar: representação de administração oral das amostras por sonda gástrica (a), gaiola na qual os animais foram mantidos durante o tempo de ensaio (b), rato Wistar do ensaio

(c) e recolha das amostras de sangue obtidas por punção do *plexus* retro-orbital (d).
154

Figura 4.4. Registo da mortalidade em *A. salina* para amostras liofilizadas de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das culturas das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R., com a concentração no poço de 1 mg mL⁻¹. Os valores apresentados são a média ± desvio padrão de três réplicas. 160

Figura 4.5. Registo da mortalidade em *A. salina* para amostras de extratos de compostos lipofílicos obtidos de corpos de frutificação e micélios das culturas das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R., com a concentração no poço de 1 mg mL⁻¹. Os valores apresentados são a média ± desvio padrão de três réplicas. 160

Figura 4.6. Registo da mortalidade em *A. salina* para amostras de extratos de compostos fenólicos totais obtidos de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das culturas das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R., com a concentração no poço de 1 mg mL⁻¹. Os valores apresentados são a média ± desvio padrão de três réplicas. 161

Figura 4.7. Registo da mortalidade em *A. salina* para amostras de extratos de complexos PPS obtidos de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das culturas das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R., com a concentração no poço de 1 mg mL⁻¹. Os valores apresentados são a média ± desvio padrão de três réplicas. 162

Figura 4.8. Efeito dos extratos liofilizados de *A. ponderosa* na atividade do enzima sérico AST. C – controlo negativo, E – etanol (controlo positivo), S – silimarina (0,2 g Kg⁻¹) + etanol, CF – corpo de frutificação de *A. ponderosa* (0,5 g Kg⁻¹) + etanol; CFC – corpo de frutificação de *A. ponderosa* (0,5 g Kg⁻¹); MB, MM e MS – micélio liofilizado das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R., respetivamente, (0,5 g Kg⁻¹) + etanol; MBC, MMC e MSC - micélio liofilizado das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R., respetivamente, (0,5 g Kg⁻¹). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). 166

Figura 4.9. Efeito dos extratos liofilizados de *A. ponderosa* na atividade do enzima sérico ALT. C – controlo negativo, E – etanol (controlo positivo), S – silimarina (0,2 g Kg⁻¹) + etanol, CF – corpo de frutificação de *A. ponderosa* (0,5 g Kg⁻¹) + etanol; CFC – corpo de frutificação de *A. ponderosa* (0,5 g Kg⁻¹); MB, MM e MS – micélio liofilizado das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R., respetivamente, (0,5 g Kg⁻¹) + etanol; MBC, MMC e MSC - micélio liofilizado das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R., respetivamente, (0,5 g Kg⁻¹). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). 167

Figura 4.10. Efeito dos extratos liofilizados de *A. ponderosa* na atividade do enzima sérico ALP. C – controlo negativo, E – etanol (controlo positivo), S – silimarina (0,2 g Kg⁻¹) + etanol, CF – corpo de frutificação de *A. ponderosa* (0,5 g Kg⁻¹) + etanol; CFC – corpo de frutificação de *A. ponderosa* (0,5 g Kg⁻¹); MB, MM e MS – micélio liofilizado das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R., respetivamente, (0,5 g Kg⁻¹) + etanol; MBC, MMC e MSC - micélio liofilizado das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R., respetivamente, (0,5 g Kg⁻¹). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). 169

Figura 4.11. Efeito dos extratos liofilizados de *A. ponderosa* na atividade do enzima sérico ALT. C – controlo negativo, E – etanol (controlo positivo), S – silimarina (0,2 g Kg⁻¹) + etanol, CF – corpo de frutificação de *A. ponderosa* (0,5 g Kg⁻¹) + etanol; CFC – corpo de frutificação de *A. ponderosa* (0,5 g Kg⁻¹); MB, MM e MS – micélio liofilizado das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R., respetivamente, (0,5 g Kg⁻¹) + etanol;

| | |
|---|-----|
| MBC, MMC e MSC - micélio liofilizado das estirpes de Beja, Mértola e S ^{to} Aleixo R., respetivamente, (0,5 g Kg ⁻¹). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). | 170 |
| Figura 5.1. Crescimento das culturas líquidas de 100 mL da estirpe de <i>A. ponderosa</i> de S ^{to} Aleixo R. | 177 |
| Figura 5.2. Módulo de ATR do espectrómetro de FTIR (BRUKER alfa). | 179 |
| Figura 5.3. Espectrómetro de Raman (HORIBA XPlora). | 180 |
| Figura 5.4. Sistema de SEC-UV-RI-HPLC. | 181 |
| Figura 5.5. Sistema cromatográfico utilizado para separação dos extratos de PPS por SEC. | 182 |
| Figura 5.6. Esquema representativo do processo de cromatografia de troca iónica | 183 |
| Figura 5.7. Placa de ELISA mostrando os resultados obtidos para o reconhecimento de complexos PPS a diferentes concentrações para a construção da curva de calibração. | 187 |
| Figura 5.8. Sistema de eletroforese para PAGE-Nativa. | 189 |
| Figura 5.9. Espectros de FITR-ATR referentes aos diferentes extratos de complexos PPS obtidos de corpos de frutificação de <i>A. ponderosa</i> (a), micélios (b) e sobrenadantes das culturas (c). Os espetros apresentados são a média de três medições independentes. | 196 |
| Figura 5.10. Espetros de Raman referentes aos diferentes extratos de complexos PPS obtidos de corpos de frutificação de <i>A. ponderosa</i> (a), micélios (b) e sobrenadantes das culturas (c). Os espetros apresentados são a média de três medições independentes. | 197 |
| Figura 5.11. Perfil cromatográfico obtido por HPLC, com sinal de RI (laranja) e sinal de UV (azul) registados em função do tempo de retenção para os extratos PPS obtidos dos corpos de frutificação de <i>A. ponderosa</i> das estirpes de Beja: (a), Mértola (b) e S ^{to} Aleixo R. (c). | 199 |
| Figura 5.12. Perfil cromatográfico obtido por HPLC, com sinal de RI (laranja) e sinal de UV (azul) registados em função do tempo de retenção para os extratos PPS obtidos dos micélios das culturas de <i>A. ponderosa</i> das estirpes de Beja: (a), Mértola (b) e S ^{to} Aleixo R. (c). | 200 |
| Figura 5.13. Perfil cromatográfico obtido por HPLC, com sinal de RI (laranja) e sinal de UV (azul) registados em função do tempo de retenção para os extratos PPS obtidos dos sobrenadantes das culturas de <i>A. ponderosa</i> das estirpes de Beja: (a), Mértola (b) e S ^{to} Aleixo R. (c). | 201 |
| Figura 5.14. Curvas de crescimento da linha celular de cancro mamário humano (MDA-MB-231) incubadas a diferentes concentrações de extratos de PPS obtido de micélios (a) e de sobrenadantes (b) de culturas de <i>A. ponderosa</i> das estirpes isoladas de Beja, Mértola e S ^{to} Aleixo R.. | 204 |

Figura 5.15. Perfil de produção de biomassa e cinética de produção de complexos proteína-polissacárido nas culturas de *A. ponderosa* da estirpe de S¹⁰ Aleixo R. Os valores apresentados são a média \pm desvio-padrão de três réplicas. 209

Figura 5.16. Perfil de fracionamento do extrato de PPS dos micélios das culturas de *A. ponderosa* da estirpe de S¹⁰ Aleixo R. ao 14^o dia de crescimento, obtido por cromatografia de exclusão molecular. Os valores apresentados são a média \pm desvio-padrão de três réplicas. 211

Figura 5.17. Perfil cromatográfico do extrato de PPS dos micélios das culturas de *A. ponderosa* da estirpe de S¹⁰ Aleixo R. ao 14^o dia de crescimento, obtido por cromatografia de troca iônica em gradiente de KCl. Os valores apresentados são a média \pm desvio-padrão de três réplicas. 212

Figura 5.18. Espectros de FITR-ATR referentes às frações obtidas por SEC (a) e IEC (b), dos extratos de complexos PPS intracelulares das culturas de *A. ponderosa* da estirpe de S¹⁰ Aleixo R.. Os espectros apresentados são a média de três medições independentes. 214

Figura 5.19. Perfil cromatográfico obtido por HPLC, com sinal de RI registados em função do tempo de retenção para as frações obtidas por SEC (a) e IEC (b), dos extratos de complexos PPS intracelulares das culturas de *A. ponderosa* da estirpe de S¹⁰ Aleixo R.. 215

Figura 5.20. Perfil de reconhecimento dos compostos PPS, pelo anticorpo 1E6-1E8-B3, produzidos nas culturas de *A. ponderosa* da estirpe de S¹⁰ Aleixo R. Os valores apresentados são a média \pm desvio-padrão de três réplicas. 216

Figura 5.21. Perfil de reconhecimento dos compostos PPS, pelo anticorpo 1E6-1E8-B3, presentes nas frações de SEC. Os valores apresentados são a média \pm desvio-padrão de três réplicas. 217

Figura 5.22. Perfil de reconhecimento dos compostos PPS, pelo anticorpo 1E6-1E8-B3, presentes nas frações de IEC. Os valores apresentados são a média \pm desvio-padrão de três réplicas. 218

Figura 5.23. Avaliação da competitividade antigénica para os extratos de complexos PPS intracelulares das culturas de *A. ponderosa* da estirpe de S¹⁰ Aleixo R., utilizando diferentes competidores antigénicos. Os valores apresentados são a média \pm desvio-padrão de três réplicas. 220

Figura 5.24. Análise eletroforética por PAGE-Nativa do extrato de complexos PPS das culturas *A. ponderosa* e frações purificadas por SEC (a) e IEC (b). 222

Figura 5.25. Membranas de nitrocelulose de análise da especificidade do anticorpo 1E6-1E8-B3 para o extrato de complexos PPS das culturas *A. ponderosa* e frações purificadas por SEC (a) e IEC (b). 223

Figura C.1. Curva de calibração do ácido cafeico para quantificação do conteúdo fenólico total efetuado pelo método pelo método do Folin-Ciocalteu. Os valores apresentados são a média \pm desvio-padrão de 6 réplicas. 264

Figura C.2. Curva de calibração de glucose para quantificação de polissacáridos pelo método do fenol-ácido sulfúrico. Os valores apresentados são a média \pm desvio-padrão de 3 réplicas. 264

Figura C.3. Curva de calibração de BSA para quantificação de proteína pelo método de Bradford. Os valores apresentados são a média \pm desvio-padrão de 3 réplicas. 265

Figura D.1. Avaliação da percentagem de inibição do ácido ascórbico: pelo método do radical livre DPPH (a) e pelo método do β -caroteno/ácido linoleico (b). Os valores apresentados são a média \pm desvio-padrão de 6 réplicas. 266

Figura D.2. Determinação dos valores de IC_{50} para os sobrenadantes liofilizados obtidos nas culturas líquidas de *A. ponderosa* das estirpes de Beja (a), Mértola (b) e S¹⁰ Aleixo R. (c). Os valores apresentados são a média \pm desvio-padrão de 3 réplicas 267

Figura E.1. Determinação dos valores de IC_{50} de potencial antiproliferativo, obtidos em ensaios de células humanas MDA-MB-231, para as amostras de micélios liofilizados obtidos nas culturas de *A. ponderosa* das estirpes de Beja (a), Mértola (b) e S¹⁰ Aleixo R. (c) e sobrenadantes liofilizados das culturas das estirpes de Beja (d), Mértola (e) e S¹⁰ Aleixo R. (f). Os valores apresentados são a média \pm desvio-padrão de três ensaios independentes ($n = 3$) efetuados em triplicado. 268

Figura E.2. Determinação dos valores de IC_{50} de potencial antiproliferativo, obtidos em ensaios de células humanas MDA-MB-231, para as amostras de extratos de compostos PPS obtidos de micélios das culturas de *A. ponderosa* das estirpes de Beja (a), Mértola (b) e S¹⁰ Aleixo R. (c) e extratos de compostos PPS obtidos de sobrenadantes das culturas das estirpes de Beja (d), Mértola (e) e S¹⁰ Aleixo R. (f). Os valores apresentados são a média \pm desvio-padrão de três ensaios independentes ($n = 3$) efetuados em triplicado. 269

Figura F.1. Curva dose-resposta para o dicromato de potássio, com determinação do LC_{50} . Os valores apresentados são a média \pm desvio-padrão de 3 réplicas. 270

Figura G.1. Perfil cromatográfico de RI dos compostos polietilenoglicol (PEG) com massas moleculares de 20, 6, 3 e 1,5 kDa, por análise de exclusão molecular em sistema de HPLC. 272

Figura G.2. Curva de calibração da coluna de SEC-UV-RI-HPLC, utilizando padrões de polietilenoglicol (PEG) com massas moleculares de 1,5, 3, 6 e 20 kDa. Os valores apresentados são a média \pm desvio-padrão de 3 réplicas. 272

Figura G.3. Perfil cromatográfico dos compostos padrão por SEC, utilizando Sephacryl S-300 como fase estacionária. 271

Figura G.4. Curva de calibração da coluna de SEC, utilizando Sephacryl S-300 como fase estacionária, para os padrões citocromo C, ovalbumina e urease com massas moleculares de 12, 46 e 400 kDa, respetivamente. Os valores apresentados são a média \pm desvio-padrão de 3 réplicas. 271

Figura H.1. Curva de calibração de reconhecimento de polissacáridos pelo anticorpo 1E6-1E8-B3, utilizando extratos de polissacáridos nas concentrações de 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 e 1500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os valores apresentados são a média \pm desvio-padrão de 3 réplicas. 273

Figura I.1. Perfil de biomassa e concentração de PPS intracelulares nas culturas líquidas de *A. ponderosa* de S¹⁰ Aleixo R., com determinação da taxa específica de crescimento e produção de PPS. Os valores apresentados são a média \pm desvio-padrão de 3 réplicas. 274

Índice de tabelas

| | |
|--|-----|
| Tabela 2.1. Descrição dos locais de colheita das amostras de <i>A. ponderosa</i> e solos. | 56 |
| Tabela 2.2. Conteúdos em água, matéria orgânica, e minerais presentes nos corpos de frutificação das amostras de <i>A. ponderosa</i> recolhidos nos diferentes locais. | 68 |
| Tabela 2.3. Conteúdo mineral dos elementos Al, Ca, Fe e K, presente nos corpos de frutificação de <i>A. ponderosa</i> colhidos nos diferentes locais e nas amostras de solo respetivas. | 76 |
| Tabela 2.4. Conteúdo mineral dos elementos Mg, Mn, Na e P, presente nos corpos de frutificação de <i>A. ponderosa</i> colhidos nos diferentes locais e nas amostras de solo respetivas. | 77 |
| Tabela 2.5. Conteúdo mineral dos elementos Ag, Ba, Cd e Cr, presente nos corpos de frutificação de <i>A. ponderosa</i> recolhidos nos diferentes locais e nas amostras de solo respetivas. | 78 |
| Tabela 2.6. Conteúdo mineral dos elementos Cu, Pb e Zn, presente nos corpos de frutificação de <i>A. ponderosa</i> recolhidos nos diferentes locais e nas amostras de solo respetivas. | 79 |
| Tabela 2.7. Aspetos macroscópicos e microscópicos das estirpes isoladas da microbiota de <i>A. ponderosa</i> . | 85 |
| Tabela 3.1. Valores de IC ₅₀ de proliferação de células humanas MDA-MB-231 obtidos para as amostras de micélios e sobrenadantes de <i>A. ponderosa</i> , quando incubadas com diferentes concentrações de extratos por 48 h. | 143 |
| Tabela 5.1. Conteúdo em polissacáridos e proteína nos extratos de complexos PPS obtidos nos corpo de frutificação, micélios e sobrenadantes de <i>A. ponderosa</i> das estirpes de Beja, Mértola e S ^{to} Aleixo R.. | 193 |
| Tabela 5.2. Massas moleculares médias dos compostos PPS presentes nos extratos de <i>A. ponderosa</i> obtidas por cromatografia de exclusão molecular em sistema de HPLC. | 202 |
| Tabela 5.3. Valores de IC ₅₀ de proliferação de células humanas MDA-MB-231 obtidos para as amostras de PPS de micélios e sobrenadantes de <i>A. ponderosa</i> , quando incubadas com diferentes concentrações de extratos por 48 h. | 205 |
| Tabela 5.4. Massas moleculares dos compostos PPS, presentes nos extratos dos micélios das culturas de <i>A. ponderosa</i> da estirpe de S ^{to} aleixo R., obtidas por cromatografia de exclusão molecular. | 211 |
| Tabela A.1. Composição do meio de Hagen modificado. | 261 |
| Tabela A.2. Composição do meio de Melin-Norkans modificado (MMN). | 261 |
| Tabela A.3. Composição do meio <i>potato dextrose agar</i> (PDA) | 262 |
| Tabela A.4. Composição do meio de meio <i>malt extract agar</i> (MEA) | 262 |

| | |
|--|-----|
| Tabela A.5. Composição do meio <i>malt extract</i> (ME) | 262 |
| Tabela F.1. Composição do meio de sais, utilizado nos ensaios com <i>Artemia salina</i> . | 270 |
| Tabela H.1. Registo dos valores de atividade dos quatro anticorpos testados obtidos no ensaio de <i>screening</i> de reconhecimento dos compostos PPS presentes nos diferentes extratos obtidos de corpos de frutificação e culturas de <i>A. ponderosa</i> das estirpes de Beja, Mértola e S ^{to} Aleixo R. | 273 |
| Tabela I.1. Registo dos valores médios das amostras de micélios e sobrenadantes liofilizados obtidos nas culturas líquidas de <i>A. ponderosa</i> de 500 mL ao fim de 15 dias de crescimento. | 274 |
| Tabela J.I.1. Análise de variância (ANOVA) dos conteúdos em água, matéria orgânica e minerais presentes nos corpos de frutificação das estirpes de <i>A. ponderosa</i> recolhidos nos diferentes locais. | 275 |
| Tabela J.I.2. Comparação múltipla de médias do conteúdo em água (a), matéria orgânica (b) e minerais (c), presente nos corpos de frutificação das estirpes de <i>A. ponderosa</i> dos diferentes locais, pelo teste de <i>Tukey HSD</i> . | 275 |
| Tabela J.I.3. Análise de variância (ANOVA) do conteúdo mineral presente nos corpos de frutificação das estirpes de <i>A. ponderosa</i> recolhidos dos diferentes locais. | 277 |
| Tabela J.I.4. Comparação múltipla de médias do conteúdo em minerais: Ag (a), Al (b), Ba (c), Ca (d), Cd (e), Cr (f), Cu (g), Fe (h), K (i), Mg (j), Mn (k), Na (l), P (m), Pb (n), Zn (o), presente nos corpos de frutificação das estirpes de <i>A. ponderosa</i> dos diferentes locais, pelo teste de <i>Tukey HSD</i> . | 278 |
| Tabela J.I.5. Análise de variância (ANOVA) do conteúdo mineral presente nas amostras de solo correspondentes aos locais de recolha das diferentes estirpes de <i>A. ponderosa</i> . | 286 |
| Tabela J.I.6. Comparação múltipla de médias do conteúdo em minerais: Ag (a), Al (b), Ba (c), Ca (d), Cd (e), Cr (f), Cu (g), Fe (h), K (i), Mg (j), Mn (k), Na (l), P (m), Pb (n), Zn (o), presente nas amostras de solo dos diferentes locais, pelo teste de <i>Tukey HSD</i> . | 287 |
| Tabela J.II.1. Análise de variância (ANOVA) das propriedades biológicas presentes nos corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das culturas de <i>A. ponderosa</i> de Beja, Mértola e S ^{to} Aleixo R.. | 295 |
| Tabela J.II.2. Comparação múltipla de médias das propriedades biológicas presentes nos corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das culturas, pelo teste de <i>Tukey HSD</i> . | 295 |
| Tabela J.II.3. Análise de variância (ANOVA) das propriedades biológicas presentes nos extratos lipofílicos obtidos de corpos de frutificação e micélios das culturas de <i>A. ponderosa</i> de Beja, Mértola e S ^{to} Aleixo R.. | 296 |
| Tabela J.II.4. Comparação múltipla de médias das propriedades biológicas presentes nos extratos lipofílicos obtidos de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes, pelo teste de <i>Tukey HSD</i> . | 296 |

- Tabela J.II.5. Análise de variância (ANOVA) do conteúdo em fenólico presente nos extratos obtidos de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das culturas de *A. ponderosa* de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R.. 297
- Tabela J.II.6. Comparação múltipla de médias do conteúdo em fenóis totais, pelo teste de *Tukey* HSD. 297
- Tabela J.II.7. Análise de variância (ANOVA) das propriedades biológicas presentes nos extratos fenólicos totais obtidos de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das culturas de *A. ponderosa* de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R.. 298
- Tabela J.II.8. Comparação múltipla de médias das propriedades biológicas presentes nos extratos fenólicos totais obtidos de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes, pelo teste de *Tukey* HSD. 298
- Tabela J.II.9. Análise de variância (ANOVA) dos conteúdos em polissacáridos e proteína presente nos extratos de complexos proteína-polissacárido extraídos de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das culturas de *A. ponderosa* de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R.. 299
- Tabela J.II.10. Comparação múltipla de médias dos conteúdos em polissacáridos e proteína presente nos extratos de PPS, pelo teste de *Tukey* HSD. 299
- Tabela J.II.11. Análise de variância (ANOVA) das propriedades biológicas presentes nos extratos PPS obtidos de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das culturas de *A. ponderosa* de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R.. 300
- Tabela J.II.12. Comparação múltipla de médias das propriedades biológicas presentes nos extratos PPS obtidos de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes, pelo teste de *Tukey* HSD. 300
- Tabela J.II.13. Análise de variância (ANOVA) para os valores de IC₅₀ de proliferação celular, obtidos em ensaios de células humanas MDA-MB-231, para as amostras de micélios e sobrenadantes de *A. ponderosa*. 301
- Tabela J.II.14. Comparação múltipla de médias dos valores de IC₅₀ de proliferação celular, para as amostras de micélios e sobrenadantes de *A. ponderosa*, pelo teste de *Tukey* HSD. 301
- Tabela J.II.15. Análise de variância (ANOVA) para os valores de IC₅₀ de proliferação celular, obtidos em ensaios de células humanas MDA-MB-231, para as amostras de complexos PPS extraídos de micélios e sobrenadantes de *A. ponderosa*. 301
- Tabela J.II.16. Comparação múltipla de médias dos valores de IC₅₀ de proliferação celular, para as amostras de PPS extraídos de micélios e sobrenadantes de *A. ponderosa*, pelo teste de *Tukey* HSD. 301
- Tabela J.III.1. Análise de variância (ANOVA) das atividades enzimáticas dos enzimas séricos AST, ALT, ALP e GGT correspondentes às amostras de corpos de frutificação de *A. ponderosa* de Beja, micélios liofilizados das culturas de *A. ponderosa* de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R., controlos positivo e negativo e fármaco padrão silimarina. 302
- Tabela J.III.2. Comparação múltipla de médias das atividades enzimáticas dos enzimas séricos AST, ALT, ALP e GGT para as diferentes amostras testadas, pelo teste de *Tukey* HSD. 303

Abreviaturas

| | |
|----------|---|
| Abs | Absorvância |
| AFLP | <i>Amplified fragment length polymorphism</i> |
| ALP | Fosfatase alcalina, do inglês <i>alkaline phosphatase</i> |
| ALT | Alanina aminotransferase, do inglês <i>alanine aminotransferase</i> |
| ARDRA | <i>Amplified ribosomal DNA restriction analysis of internal transcribed spacers</i> |
| AST | Aspartato aminotransferase, do inglês <i>aspartate aminotransferase</i> |
| BCIP | 5-bromo-4-cloro-indolil fosfato, do inglês <i>5-bromo-4-chloro-3'-indolyl phosphate</i> |
| bp | Par de bases, do inglês <i>base pair</i> |
| BSA | Albumina de soro bovino, do inglês <i>bovine serum albumin</i> |
| CAT | Catalase |
| DDR | Dose diária recomendada |
| DEAE | Dietilaminoetanol, do inglês <i>diethylaminoethanol</i> |
| DMEM | Meio Dulbecco-Eagle modificado, do inglês <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> |
| DMSO | Dimetilsulfóxido, do inglês <i>dimethyl sulfoxide</i> |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i> |
| dNTPs | Desoxinucleotídeos trifosfato |
| DPPH | 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo, do inglês <i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i> |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês <i>ethylenediamine tetra acetic acid</i> |
| ELISA | <i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> |
| FAAS | Espectrometria de absorção atômica de chama, do inglês <i>flame atomic absorption spectrometry</i> |
| FBS | Soro fetal bovino, do inglês <i>fetal bovine serum</i> |
| FEP | Fotometria de chama de emissão, do inglês <i>flame emission photometry</i> |
| FTIR-ATR | Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier usando a reflexão total atenuada, do inglês <i>Fourier-transform infrared using the attenuated total reflection</i> |

| | |
|-------------------------|--|
| GGT | Gama-glutamilttransferase, do inglês <i>gamma-glutamyl transferase</i> |
| HPLC | Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês <i>high performance liquid chromatography</i> |
| IC ₅₀ | Concentração inibitória de 50 % da oxidação, do inglês <i>inhibitory concentration 50%</i> |
| IEC | Cromatografia de troca iônica, do inglês <i>ion exchange chromatography</i> |
| Ig | Imunoglobulina |
| ITS | Espaçador de transcrição interno, do inglês <i>internal transcribed spacer</i> |
| IR | Infravermelho, do inglês <i>Infrared</i> |
| LC ₅₀ | Concentração letal para 50% da população, do inglês <i>lethal concentration 50%</i> |
| LD ₅₀ | Dose letal para 50% da população, do inglês <i>lethal dose 50%</i> |
| LDH | Lactato desidrogenase, do inglês <i>lactate dehydrogenase</i> |
| M13-PCR | <i>Microsatellite-Primed-PCR</i> |
| MDH | Malato desidrogenase, do inglês <i>malate dehydrogenase</i> |
| ME | <i>Malt extract</i> |
| MEA | <i>Malt extract agar</i> |
| MM | Massa molecular |
| MMN | Meio de Melin-Norkans modificado, do inglês <i>modified Melin-Norkans medium</i> |
| MTT | Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, do inglês <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i> |
| NAD ⁺ / NADH | Dinucleótido de nicotinamida e adenina (oxidado/reduzido), do inglês <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i> |
| OD | Densidade óptica, do inglês <i>optical density</i> |
| PAGE-Nativa | Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas, do inglês <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> |
| PBS | Tampão fosfato-salino, do inglês <i>phosphate buffered saline</i> |
| PCR | Reações em cadeia da polimerase, do inglês <i>polymerase chain reaction</i> |
| PDA | <i>Potato dextrose agar</i> |
| PEG | Poli(etil)enoglicol, do inglês <i>polyethylene glycol</i> |
| p-NPP | p-nitrofenilfosfato, do inglês <i>p-nitrophenyl phosphate</i> |

| | |
|---------|---|
| PPS | Proteína-polissacárido |
| RAPD | <i>Random amplified polymorphic DNA</i> |
| rep-PCR | <i>Repetitive-sequence-based PCR</i> |
| RFLP | <i>Restriction fragment length polymorphism</i> |
| RI | Índice de refração, do inglês <i>refraction index</i> |
| RNase | <i>Ribonuclease</i> |
| ROS | Espécies reativas de oxigênio, do inglês <i>reactive oxygen species</i> |
| RSA | Capacidade de captação do radical DPPH, do inglês <i>radical scavenging activity</i> |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio, do inglês <i>sodium dodecyl sulphate</i> |
| SEC | Cromatografia de exclusão molecular, do inglês <i>size exclusion chromatography</i> |
| SOD | Superóxido dismutase, do inglês <i>superoxide dismutase</i> |
| SSDM | Método de desintegração com a areia, do inglês <i>sea sand disruption method</i> |
| Taq | Polimerase termoestável isolada a partir de uma bactéria termofílica <i>Thermus aquaticus</i> |
| TBE | Tampão tris borato–EDTA |
| TE | Tampão de extração |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina, do inglês N,N,N',N'- <i>tetramethylethylenediamine</i> |
| TTBS | Tampão salino Tris com o detergente tween 20, do inglês <i>tween 20 Tris buffered saline</i> |
| UPGMA | Método de agrupamento não ponderado de pares com média aritmética, do inglês <i>unweighted pair group method with arithmetic averages</i> |
| UV | Ultravioleta, do inglês <i>ultraviolet</i> |
| Vis | Visível, do inglês <i>visible</i> |
| XOD | Xantina oxidase, do inglês <i>xanthine oxidase</i> |

Unidades de medida

| | |
|---------------------------|--|
| % | Porcentagem |
| m, cm, μm , nm | Metro, centímetro, micrómetro, nanómetro |
| Da, kDa | Dalton, kilodalton |
| <i>g</i> | Aceleração gravítica |
| h, min, s | Horas, minutos, segundos |
| Kg, g, mg, μg | Quilograma, grama, miligrama, micrograma |
| L, mL μL | Litros, mililitros, microlitros |
| M, mM, μM | Molar, milimolar, micromolar |
| mmol, μmol | Milimol, micromol |
| $^{\circ}\text{C}$ | Graus Celsius |
| rpm | Rotações por minuto |
| U | Unidade de atividade enzimática |
| UFC | Unidades formadoras de colónias |
| V | Volts |

Publicações relacionadas

Martins M R, Salvador C, Vicente H, Neves J, Arteiro J M, Caldeira A T (2010) A Data Mining approach to characterize *Amanita ponderosa* mushrooms using inorganic profile and M13-PCR molecular Data. *FoodSim*, June 24-26, 2010, CIMO Research Centre, Bragança, Portugal. Edited by V. Cadavez and D. Thiel, June 2010, ISBN: 978-90-77381-56-1: 5 – 12.

Arteiro J M, Martins M R, Salvador C, Candeias M F, Karmali A, Caldeira A T (2012) Protein-Polysaccharides of *Trametes versicolor*: Production and Biological Activities. *Medicinal Chemistry Research* 21(6): 937 – 943, DOI: 10.1007/s00044-011-9604-6.

Salvador C, Martins M R, Candeias M F, Karmali A, Arteiro J M, Caldeira A T (2012) Characterization and biological activities of protein-bound polysaccharides produced by cultures of *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Agricultural Science and Technology A* 2: 1296 – 1306.

Salvador C, Martins M R, Vicente H, Neves J, Arteiro J M, Caldeira A T (2013) Modelling molecular and inorganic data of *Amanita ponderosa* mushrooms using artificial neural networks. *Agroforestry Systems* 87: 295 – 302, DOI: 10.1007/s10457-012-9548-y.

Salvador C, Martins M R, Arteiro J M, Caldeira A T (2013) Molecular evaluation of some *Amanita ponderosa* and the fungal strains living in association with these mushrooms in the southwestern Iberian Peninsula. *Annals of Microbiology* DOI:10.1007/s13213-013-0757-z.

Salvador C, Candeias M F, Martins M R, Caldeira A T (2013) Culturas de fungos basidiomicetos em resíduos agroindustriais para produção de compostos bioativos. (*Bio*) *Energia*, Évora, Portugal, ISBN: 978-989-8550-13-2: 56 – 67.

Ragonezi C, Caldeira A T, Martins M R, Salvador C, Santos-Silva C, Ganhão E, Klimaszewska K, Zavattieri A (2013) Molecular approach to characterize ectomycorrhizae fungi from mediterranean pine stands in Portugal. *Brazilian Journal of Microbiology* 44(2): 663 – 670.

Salvador C, Martins M R, Caldeira A T (2014) Microanalysis characterisation of bioactive protein-bound polysaccharides produced by *Amanita ponderosa* cultures. *Microscopy and Microanalysis*, DOI:10.1017/S1431927614013099.

Salvador C, Martins M R, Duarte M F, Candeias M F, Caldeira A T (2014) *Amanita ponderosa*: toxicological approach, antioxidant properties and antiproliferative effect against human breast cancer cells. *Food Research International*, manuscript submitted.

Objetivos e metodologia do trabalho

Os cogumelos silvestres comestíveis da espécie *Amanita ponderosa* crescem nalguns microclimas, em particular no Sudoeste da Península Ibérica, nomeadamente no Alentejo e na Andaluzia. Este estudo pretende ser um contributo para aprofundar o conhecimento sobre esta espécie, no que respeita à sua caracterização molecular, valor nutricional e potencial biotecnológico. O trabalho proposto constitui uma abordagem inovadora no que concerne à produção de metabolitos bioativos a partir de culturas de *A. ponderosa*.

O principal objetivo deste projeto consiste em isolar e caracterizar estirpes de *A. ponderosa*, de habitats florestais de diferentes locais do Alentejo (Portugal), e avaliar o potencial de produção de novos compostos com atividade biológica. Esta proposta envolve as seguintes tarefas: recolher cogumelos silvestres; caracterizar quimicamente esses cogumelos; isolar os micélios; identificar perfis genéticos dos cogumelos e dos isolados e produzir novos compostos com atividade biológica em cultura de estirpes selecionadas. A metodologia de trabalho adotada para este estudo, consistiu em:

- ✓ selecionar cogumelos da espécie *A. ponderosa* de diferentes locais do Alentejo;
- ✓ determinar o conteúdo orgânico e inorgânico dos cogumelos com vista à caracterização da composição mineral;
- ✓ caracterizar a composição mineral do solo envolvente de modo a avaliar a possível influência na composição dos cogumelos, em particular o conteúdo mineral;
- ✓ isolar micélios de *A. ponderosa* em meios de cultura adequados;

-
- ✓ isolar e identificar as diferentes estirpes fúngicas que vivem em associação com estes cogumelos no seu *habitat* natural;
 - ✓ caracterizar por técnicas moleculares, nomeadamente M13-PCR, os diferentes cogumelos e os isolados;
 - ✓ efetuar culturas em meio líquido das estirpes isoladas de *A. ponderosa* selecionadas para produção de compostos com atividade biológica;
 - ✓ obter e caracterizar extratos ricos em compostos bioativos, derivados de *A. ponderosa*, nomeadamente extratos lipofílicos, compostos fenólicos totais e complexos proteína-polissacárido;
 - ✓ avaliar a capacidade antioxidante nas amostras de cogumelos, nas culturas (micélios e sobrenadantes) e nos extratos bioativos, através da determinação da atividade antioxidante pelos métodos do radical livre DPPH e do β -caroteno/ácido linoleico e pela capacidade para mimetizar a atividade dos enzimas CAT e SOD;
 - ✓ avaliar a letalidade em *Artemia salina* de amostras de cogumelos, culturas e extratos bioativos;
 - ✓ avaliar a toxicidade aguda em murganhos *Swiss*; de amostras de cogumelos e culturas
 - ✓ avaliar o efeito hepatoprotetor de cogumelos e de micélios de *A. ponderosa* em ratos *Wistar* por determinação das atividades ALT, AST, ALP e GGT;
 - ✓ avaliar a atividade antitumoral, das culturas e extratos bioativos, utilizando uma linha celular tumoral mamária humana MDA-MB-231;

- ✓ determinar o perfil de produção de complexos proteína-polissacárido em culturas de *A. ponderosa*;
- ✓ caracterizar os complexos proteína-polissacárido produzidos;
- ✓ desenvolver uma metodologia de monitorização da produção destes compostos, envolvendo técnicas de microanálise para *screening* dos compostos e técnicas imunológicas para controlo de especificidade de produção.

Cogumelos silvestres e seus metabolitos: principais propriedades biológicas



1.1 Introdução

Os cogumelos são conhecidos desde a antiguidade pelas suas propriedades medicinais e o seu elevado valor nutritivo, existindo inúmeras espécies com composição muito diversificada, muitas delas comestíveis, e outras bastante tóxicas.

O consumo de cogumelos comestíveis vem aumentando e ganhou destaque em virtude das qualidades gastronómicas e valor nutricional, devido ao seu elevado conteúdo proteico e mineral e fibras dietéticas, essenciais ao bom funcionamento do organismo.

Para além das propriedades nutricionais, muitas espécies são conhecidas pelas propriedades medicinais associadas a alguns dos seus constituintes, podendo ter um papel importante como nutracêuticos e/ou agentes terapêuticos.

Nos últimos anos, tem-se verificado uma grande procura de cogumelos silvestres e apenas uma pequena percentagem do potencial micológico existente em Portugal está a ser aproveitado. Portugal, pelas características mediterrânicas, diversidade de flora e microbiota, é um dos países europeus com maiores potencialidades para a produção de cogumelos silvestres. A sul do País existe uma maior predominância da espécie comestível *Amanita ponderosa*. Gastronomicamente, esta espécie é muito relevante devido não só ao tradicional consumo nas populações rurais, como ao seu valor comercial nos mercados *gourmet*. Por vezes os cogumelos silvestres produzidos em Portugal são comercializados noutros países nomeadamente em Espanha, França e Itália.

Este trabalho pretende efetuar uma caracterização inorgânica e molecular contribuindo para um melhor conhecimento desta espécie; e ainda desenvolver metodologias que possam ser aplicadas a processos de certificação. O principal foco deste projeto incide na pesquisa de um potencial biotecnológico desta espécie de cogumelos silvestres. A

obtenção de extratos biologicamente ativos em culturas de *A. ponderosa* será avaliada por determinação das atividades biológicas, nomeadamente antioxidantes, hepatoprotetoras e antitumorais. Pretende-se ainda desenvolver metodologias de monitorização e controlo de especificidade de produção destes compostos bioativos.

1.2 Cogumelos: Algumas considerações

Os cogumelos são macrofungos com corpos de frutificação visíveis e distintos que podem apresentar crescimento hipógeos ou epigeos (Guillamón *et al.* 2010). Estes fungos são na sua maioria pertencentes à classe *Basidiomycetes* (fungos que produzem basidiósporos) e alguns fungos da classe *Ascomycetes* (fungos que produzem ascósporos). Na verdade, o corpo de frutificação do fungo ou carpóforo é a estrutura que é chamada de cogumelo, enquanto o micélio é a parte vegetativa, composto por um sistema de segmentos ramificados, hifas, que podem dar origem ao corpo de frutificação sob condições ambientais favoráveis (Figura 1.1) (Chang 2008; Kalac 2010).

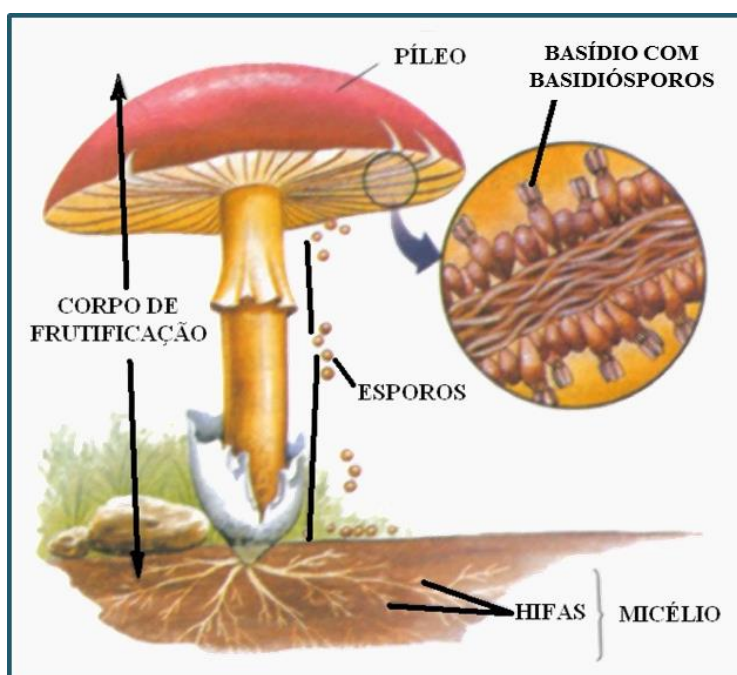


Figura 1.1. Aspectos morfológicos gerais de cogumelos (Adaptada de 1).

O tempo de vida da maior parte dos corpos de frutificação é apenas de 10 a 14 dias. Os cogumelos podem ser simbiotes, saprófitas ou parasitas, sendo que grande parte das espécies de *Basidiomycetes* estabelece associações micorrízicas (Figura 1.2). Os micélios das espécies micorrízicas vivem em simbiose com raízes de plantas, nomeadamente espécies arbusculares e arbóreas, permitindo aumentar a superfície de absorção ou rizosfera das raízes, auxiliando a planta na função de absorção de água e sais minerais do solo. Em retorno desta simbiose, os fungos recebem da planta a fonte de carbono, glúcidos fotoassimilados, que necessitam para a sua sobrevivência e que não conseguem sintetizar. Deste modo as plantas, seres autotróficos, podem absorver mais água e adaptar-se a climas mais secos, tornando-as mais eficientes na colonização de *habitats* pouco hospitaleiros. As micorrizas ajudam ainda na proteção das raízes contra infeções por parte de outros microrganismos do solo (Kalac 2010). Desta forma, os cogumelos silvestres, na sua maioria, desempenham um papel importante no ecossistema, permitindo manter a riqueza da floresta, servindo de alimento, promovendo a proteção de espécies de plantas presentes nos seus *habitats* naturais ou degradando a matéria orgânica morta (saprófitas).



Figura 1.2. Esquema representativo da formação de micorrizas entre cogumelos simbiotes e plantas (Adaptada de 2).

1.3 Gênero *Amanita*

O gênero *Amanita* é um dos mais conhecidos e característicos da ordem dos *Agaricales*, sendo caracterizado maioritariamente por basidiomas terrestres e sobretudo ectomicorrizícos, formando associações com plantas permitindo estimular o seu crescimento e defesa contra diversas fontes de *stress*, desempenhando um papel significativo nos ecossistemas florestais (Vargas *et al.* 2011).

Este gênero de *Basidiomycetes* compreende inúmeras espécies distribuídas por todo o mundo, algumas são comestíveis e outras venenosas por possuírem toxinas e/ou compostos com propriedades alucinogénicas (González *et al.* 2002; Moreno *et al.* 2008). Este gênero tem sido extensivamente estudado tanto a nível morfológico como molecular, embora alguns problemas taxonómicos permaneçam ainda por esclarecer (Moreno *et al.* 2008). A análise filogenética baseada em sequências do gene 28S rRNA permite agrupar as espécies *Amanita* de acordo com diferentes secções. As espécies *A. caesaria* (Secção *Caesareae*) e *A. vaginata* (Secção *Vaginatae*) são comestíveis. As espécies venenosas podem ser encontradas em todas as outras secções deste gênero. Algumas espécies são bem conhecidas devido às suas propriedades tóxicas ou alucinogénias, nomeadamente *A. phalloides*, *A. virosa* e *A. bisporigera* (Secção *Phalloideae*), *A. muscaria* e *A. pantherina* (Secção *Amanita*) e *A. rubescens* e *A. citrina* (Secção *Validae*). As secções *Lepidella* e *Amidella*, englobam espécies que são tóxicas, como *A. boudieri* (Secção *Lepidella*) e *A. próxima* (Secção *Amidella*) e outras que são comestíveis e bastante apreciadas na gastronomia, nomeadamente *A. ovoidea*, *A. ponderosa* e *A. curtipes*. (Secção *Amidella*) (González *et al.* 2002; Kirchmair *et al.* 2012; Malençon & Heim 1942; Moncalvo *et al.* 2002; Moreno *et al.* 2008).

Os membros da secção *Amidella*, no qual se insere a espécie *A. ponderosa*, são macroscopicamente caracterizados por possuírem basidiomas bastante robustos,

constituição interior de cor branca, a presença de um véu universal e uma volva muito característica com uma margem livre e membranosa. O anel é frágil e a margem do chapéu apendiculada (Caldeira *et al.* 2009; Moreno-Rojas *et al.* 2004; Moreno *et al.* 2008). As suas características microscópicas principais são a presença de esporos de formato amiloide e elipsoidal a subcilíndrico (González *et al.* 2002; Li & Oberlies 2005; Pinho-Almeida 1994).

1.3.1 Espécies venenosas do género *Amanita*

Uma característica proeminente de grande parte das espécies *Amanita* é a presença de compostos altamente tóxicos, tendo sido bastante discutida a sua ocorrência, assim como composição química e efeitos toxicológicos. Quimicamente, as estruturas dos compostos tóxicos isolados de espécies *Amanita* caracterizados até à data podem ser subdivididos em seis categorias: péptidos, amavadin, isoxazoles, aminoácidos simples, esteroides e ceramidas. Algumas espécies de *Amanita* produzem os péptidos mais ativos (toxinas), conhecidos como ciclopéptidos, octapéptidos bicíclicos termoestáveis, que contêm enxofre ligado a uma unidade de triptofano, podendo em alguns casos, a sua distribuição variar ao longo de todo o cogumelo, sendo o chapéu a parte mais tóxica (Brandão *et al.* 2011). Esses péptidos considerados as principais toxinas de *Amanita* são classificados em três grupos: amatoxinas, falotoxinas e virotoxinas. As amatoxinas (venenos de ação lenta) são 10-20 vezes mais tóxicos que falotoxinas e virotoxinas (venenos de ação rápida) (Brandão *et al.* 2011; Li & Oberlies 2005; Zhang *et al.* 2005). O facto de serem termoestáveis implica que não são destruídos mesmo que os cogumelos sejam cozinhados, sendo a dose letal para um adulto de 0,1 mg/kg, logo a ingestão de 20 a 25 g de cogumelo pode ser fatal uma vez que implica o consumo de 5 a 8 mg de amatoxina (Schenk-Jaeger *et al.* 2012).

A toxicidade das amatoxinas é devido à inibição da RNA polimerase II, afetando a síntese de proteínas. As toxinas são absorvidas preferencialmente pelo fígado,

circulando depois pelo interior do circuito entero-hepático, sendo a insuficiência hepática a causa mais comum de morte por envenenamento com amatoxinas em seres humanos (Zhang *et al.* 2005).

As falotoxinas promovem a destruição das células hepáticas, mas pelo facto de não serem absorvidas pelo intestino não estão envolvidas em processos de toxicidade aguda. Estudos toxicológicos têm-se centrado na espécie *A. phalloides* (Figura 1.3 (a)), que é o cogumelo mais tóxico deste grupo que contém ciclopéptidos (Brandão *et al.* 2011). Apesar de ter sido um dos primeiros cogumelos tóxicos a ser identificado e no qual a falotoxina foi encontrada pela primeira vez, no entanto as falotoxinas pouco contribuem para a toxicidade elevada desta espécie, sendo esta devida à presença também de elevados níveis de amatoxinas, nomeadamente α e β – amanitinas. Além disso, várias outras espécies, incluindo *A. bisporigera*, *A. verna* e *A. virosa* (Figura 1.3 (b), (c) e (d)), produzem também falotoxinas e amatoxinas. As virotoxinas são as mais recentes toxinas descritas em *Amanita* tendo sido encontradas apenas em *A. virosa* e *A. phalloides*. Apresentam um mecanismo de ação semelhante ao das falotoxinas, não causando toxicidade aguda (Vargas *et al.* 2011).

Outro tipo de toxinas, pertencente à classe das neurotoxinas, nomeadamente ácido iboténico e seu produto de descarboxilação o muscimol, são isoxazoles, encontradas sobretudo em cogumelos das espécies *A. pantherina* e *A. muscaria* (Figura 1.3 (e) e (f)) (Li & Oberlies 2005; Tsujikawa *et al.* 2006).

Existe ainda uma outra classe de toxinas, as nefrotoxinas, aminoácidos com a capacidade de causar insuficiência renal aguda devido à nefrite intersticial aguda, sendo encontradas em espécies como *A. boudieri* e *A. próxima* (Figura 1.3 (g) e (h)) (Kirchmair *et al.* 2012).

Mais de 90% dos casos de envenenamento por cogumelos têm sido associados a duas das espécies mais venenosas do género *Amanita*, a *A. phalloides* e a *A. virosa*

(Figura 1.3 (a) e (d)), por estas se assemelharem a algumas espécies comestíveis (Li & Oberlies 2005; Zhang *et al.* 2005).



Figura 1.3. Algumas espécies tóxicas do género *Amanita* *A. phalloides* (a), *A. bisporigera* (b), *A. verna* (c), *A. virosa* (d), *A. pantherina* (e), *A. muscaria* (f), *A. boudieri* (g), *A. próxima* (h) (Adaptada de 3, 4, 5).

1.3.2 Espécies comestíveis do género *Amanita*

Alguns cogumelos do género *Amanita* são cogumelos silvestres comestíveis muito apreciados, na gastronomia em vários países. Entre estes distinguem-se as espécies *A. ponderosa*, *A. curtipes*, *A. caesaria* e *A. ovoidea* (Figura 1.4).

Uma das causas de envenenamento por cogumelos silvestres, nomeadamente na região do Alentejo, ocorre com o equívoco no reconhecimento da espécie comestível *A. ponderosa*, com algumas espécies venenosas (Malençon & Heim 1942), que apesar de possuir características macroscópicas bastante bem definidas, pode levar a confusão com algumas espécies semelhantes que são tóxicas, devido a falta de experiência na identificação da espécie. O caso mais recorrente é o da espécie mortal *A. verna*, pois esta frutifica nos mesmos locais e macroscopicamente são bastante semelhantes (Figura 1.3 (c)) (Morgado *et al.* 2006). Outras espécies de características

semelhantes a *A. ponderosa* são as espécies nefrotóxicas *A. boudieri* e *A. proxima* (Figura 1.3 (g) e (h)). A espécie mais semelhante é *A. curtipes* (Figura 1.4 (b)), espécie de *habitat* mediterrânico próximo, mas apresenta um pé mais curto e brota no Outono, não apresentando no entanto perigo pois esta é também uma espécie comestível (Moreno *et al.* 2008).



Figura 1.4. Espécies de cogumelos comestíveis do género *Amanita*: *A. ponderosa* (a), *A. curtipes* (b), *A. caesaria* (c) e *A. ovoidea* (d) (Adaptada de 6, 7).

Algumas das espécies de cogumelos do género *Amanita* têm sido fortemente investigados. O número de espécies deste género encontrado na Península Ibérica é de aproximadamente 45, e novas espécies são descritas frequentemente (González *et al.* 2002; Li & Oberlies 2005).

1.3.3 *Amanita ponderosa*

A espécie *A. ponderosa* (Figura 1.5) foi descrita pela primeira vez por Malençon e Heim (1942). Esta espécie é pouco conhecida na maior parte dos países europeus, sendo mais abundante no sudoeste da Península Ibérica, devido à presença de um clima de características mediterrânicas nomeadamente no Alentejo (Portugal) e Andaluzia (Espanha), Marrocos e mais raramente na Itália. Encontra-se estritamente na primavera ou nos meses que a antecedem nas regiões mais a sul, onde pode aparecer em janeiro, em anos mais quentes (Moreno *et al.* 2008).

| |
|--|
| Reino: <i>Fungi</i> |
| Filo: <i>Basidiomycota</i> |
| Classe: <i>Basidiomycetes</i> |
| Subclasse: <i>Hymenomycetes</i> |
| Ordem: <i>Agaricales</i> |
| Família: <i>Amanitaceae</i> |
| Género: <i>Amanita</i> |
| Espécie: <i>Amanita ponderosa</i> |

Figura 1.5. Classificação taxonómica da espécie *A. ponderosa*.

A espécie *A. ponderosa* é caracterizada por possuir um corpo frutífero largo e robusto, apresentado um chapéu com 8–7 cm de diâmetro, podendo chegar a 22 cm, com uma morfologia hemisférica quando jovem e plano-convexa na maturidade, com uma ligeira depressão no centro (Figura 1.6 (a), (b)) (Caldeira *et al.* 2009; Moreno-Rojas *et al.* 2004).

Quando jovens, aparecem cobertos por uma membrana espessa, a que se chama véu universal (Figura 1.6 (c)) (Moreno *et al.* 2008). A margem do

chapéu é curvada para dentro, com (ocasionalmente) o restante do véu parcial (Figura 1.7 (a)). A cutícula é lisa e facilmente retirada, a sua cor é creme esbranquiçada quando jovem ou enquanto se encontra no subsolo, ficando castanho-avermelhado ou com manchas negras após o envelhecimento. É organizada em cútis, constituída por hifas cilíndricas com 3–5 µm de diâmetro, hialinas e asseptadas (Moreno-Rojas *et al.* 2004).

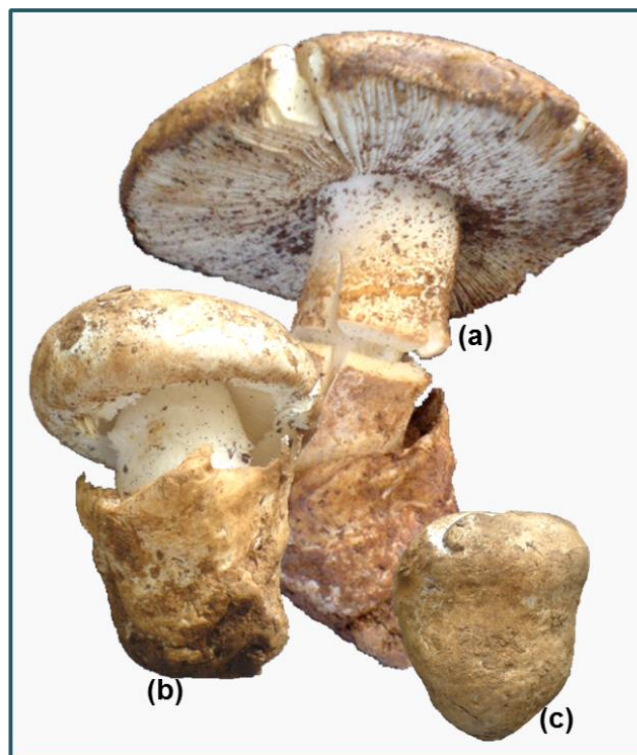


Figura 1.6. Aspectos macroscópicos de cogumelos *A. ponderosa* em diferentes fases de crescimento: adulto na maturidade apresentando um chapéu de morfologia plano-convexa (a), adulto jovem com um chapéu de morfologia hemisférica (b) e jovem coberto pelo véu universal (c).

O himénio (parte interior do chapéu) é constituído de lâminas largas, um pouco serradas, livres ou sub-aderidas, com algumas lamelas brancas mas com tendência a ficarem rosadas, ou acastanhadas em corpos de frutificação envelhecidos ou secos (Figura 1.7 (b)). A constituição interior do cogumelo é firme, muito compacta, branca, ficando rosada quando contacta com o ar (Figura 1.7 (c)), com um forte odor a terra húmida que facilita a sua identificação. O pé é cilíndrico, parcialmente liso a ligeiramente fibroso, com 4–10 cm de comprimento e 2–3 cm de diâmetro, apresentando uma cor mais pálida que o chapéu ou exibindo um tom rosado acastanhado. Possui um anel em torno do pé, quebrado pelo crescimento do corpo frutífero, da mesma cor que o pé (Figura 1.7 (a)). A base é constituída por uma volva membranosa, espessa e da mesma cor que o resto do corpo de frutificação, capaz de se tornar, em forma de saco, a metade da altura do pé (Figura 1.7 (a)) (Moreno-Rojas

et al. 2004; Moreno *et al.* 2008). Possui sabor agradável e muito dificilmente é parasitada por larvas (Moreno-Rojas *et al.* 2004). Os basidia são tetrasspóricos com basidiósporos cilíndricos, cilíndrico-elipsoides ou amiloides (11–13 x 6–7 μm). Os esporos são agregados ou dispersos, brancos quando frescos, cremes quando secos (Moreno-Rojas *et al.* 2004).

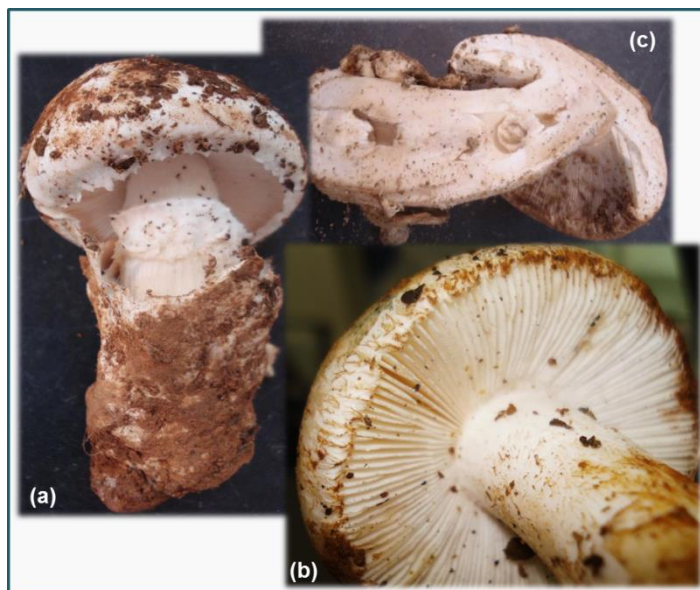


Figura 1.7. Aspectos macroscópicos de cogumelos *A. ponderosa*: adulto jovem onde se observam a volva, o anel em torno do pé e margem do chapéu curvada para dentro com o restante do véu universal (a), pormenor do himénio lamelado (b) e detalhe da constituição interior do corpo de frutificação (c).

Os cogumelos da espécie *A. ponderosa* mostram uma tendência semi-hipogénea, uma vez que cresce totalmente subterrado nas primeiras fases de desenvolvimento, emergindo parcialmente ou completamente após a expansão do píleo (chapéu) (Figura 1.8) (Moreno *et al.* 2008).

Estes cogumelos comestíveis apresentam um elevado valor nutricional, contendo uma percentagem elevada de minerais essenciais e vitaminas, baixo teor em gordura e são uma boa fonte de proteínas (Moreno-Rojas *et al.* 2004).

Esta espécie tem como *habitat* florestas mediterrânicas, em áreas de montado de *Quercus ilex* (azinho), *Q. suber* (sobreiro) e com arbustos como *Cistus ladanifer* (esteva) (Figura 1.8 (a)), *C. laurifolius* (Ciste com folhas de loureiro) e *Lavandula stoechas* (rosmaninho) em solos ácidos (Moreno-Rojas *et al.* 2004; Moreno *et al.* 2008), formando associações ectomicorrízicas com estas plantas.



Figura 1.8. Processo de recolha de cogumelos *A. ponderosa*: corpo de frutificação no seu *habitat* natural em associação com *C. ladanifer* (a), corpo de frutificação parcialmente emergido do solo (b) e totalmente extraído do solo (c).

A recolha comercial de cogumelos silvestres comestíveis representa um importante negócio em muitas áreas rurais. A espécie *A. ponderosa* é submetida a uma forte exploração comercial em algumas áreas, sendo tão intensamente procurada por apanhadores que é muitas vezes é recolhida na fase primordial do desenvolvimento, antes de emergir à superfície, por ser um fungo verdadeiramente hipógeo (Daza *et al.* 2003; Moreno *et al.* 2008).

Embora haja muita pesquisa sobre cogumelos, há falta de informação sobre *A. ponderosa*. O pequeno número de relatos encontrados na literatura reporta ao conteúdo mineral e análise filogenética (Caldeira *et al.* 2009; Moreno-Rojas *et al.* 2004; Moreno *et al.* 2008; Salvador *et al.* 2013b).

Nos últimos anos o interesse em cogumelos comestíveis tem intensificado a sua produção industrial, assim como uma maior procura de algumas espécies silvestres, tornando-se cada vez necessário o estudo dos cogumelos silvestres de forma a poder haver certificação de espécies silvestres de cogumelos comestíveis.

O género *Amanita* é bastante heterogéneo, uma vez que contém uma grande variedade de espécies, sendo muitos delas tóxicas, enquanto outras são comestíveis e produzem compostos biotecnologicamente importantes. Torna-se assim importante efetuar estudos, de modo a prevenir eventuais intoxicações, assim como a descoberta de compostos de interesse farmacológico.

1.4 Cogumelos silvestres comestíveis

Os cogumelos silvestres comestíveis constituem um alimento bastante apreciado em virtude do seu sabor refinado e elevado valor nutritivo, devido ao elevado conteúdo proteico, fibras, vitaminas, minerais e baixo teor de gordura (Barros *et al.* 2008a; Mattila *et al.* 2000).

Para além das propriedades gastronómicas e valor nutritivo, várias estirpes de cogumelos comestíveis têm sido extensamente utilizadas na medicina tradicional. Algumas espécies de cogumelos, nomeadamente, *Coriolus versicolor*, *Agaricus blazei*, *Lentinula edodes*, são descritas na literatura por apresentarem inúmeras propriedades terapêuticas, nomeadamente antioxidantes, antivirais imunoestimuladoras, e antitumorais, que estão associadas à produção de compostos bioativos, principalmente

compostos fenólicos e polissacáridos (Firenzuoli *et al.* 2007; Smith *et al.* 2002; Wasser 2002).

1.4.1 Valorização económica

Recentemente, muitas são as espécies de cogumelos usados pelo homem que possuem alguma importância económica, englobando cogumelos comestíveis, tóxicos, alguns com propriedades medicinais, cogumelos que podem ser usados em silvicultura, indústria, biotecnologia, biorremediação, restauração, reflorestamento, entre outras (Garibay-Orijel *et al.* 2009). Estima-se que existam no planeta cerca de 140.000 espécies diferentes de cogumelos, no entanto, apenas cerca de 10% são conhecidas e metade deles apresentam propriedades nutritivas. Cerca de 2.000 espécies de cogumelos são seguras para consumo e aproximadamente 70 espécies são conhecidas por apresentar algumas propriedades farmacológicas (Hawksworth 2001).

Desde a antiguidade, muitas culturas têm utilizado os cogumelos silvestres como alimento e também para fins medicinais. Algumas espécies têm sido bastante apreciadas devido ao seu elevado valor gastronómico e nutricional (Chang 2008). Recentemente, alguns destes fungos têm sido considerados como alimentos funcionais por possuírem inúmeras propriedades terapêuticas, levando a uma tendência de separação pela indústria entre cogumelos comestíveis e medicinais (Guillamón *et al.* 2010). No entanto, não existe uma fácil distinção entre cogumelos comestíveis e medicinais, porque vários cogumelos medicinalmente catalogados são também usados como alimento.

Os cogumelos comestíveis incluem muitas espécies que são silvestres e algumas possíveis de cultivar. Atualmente, a colheita comercial de cogumelos comestíveis representa um negócio importante em muitas áreas rurais de alguns países. As espécies facilmente cultiváveis estão frequentemente disponíveis nos mercados,

embora apenas 100 espécies sejam regularmente cultivadas e 8 a 10 sejam cultivadas numa extensão significativa à escala industrial (Reis *et al.* 2012a), nomeadamente *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* (*shiitake*) e *Pleurotus ostreatus* (Aida *et al.* 2009; Mattila *et al.* 2000; Reis *et al.* 2012a). Existem outras espécies que são difíceis de cultivar ou ainda não foram cultivadas com sucesso, em particular as espécies micorrízicas. Estas são recolhidas no seu estado silvestre por coletores privados, podendo da mesma forma ser encontradas em mercados, em menor escala e a custos por vezes bastante elevados, como é o caso de *A. ponderosa*.

1.4.2 Valor nutricional

Os cogumelos comestíveis são amplamente consumidos em muitos países como alimento, devido ao seu atraente sabor, aroma e valores nutricionais, os cogumelos comestíveis têm sido considerados importantes componentes da dieta. O valor gastronómico e comercial é principalmente devido às suas propriedades organolépticas como textura e paladar, sendo possível distinguir espécies de cogumelos com base em seu característico odor ou aroma (De Pinho *et al.* 2008).

São ricos em proteínas, aminoácidos essenciais e apresentam, geralmente, um conteúdo elevado de minerais (Ca, K, Mg, Na, P, Cu, Fe, Mn e Se) e vitaminas E, B, C e D (Agrahar-Murugkar & Subbulakshmi 2005; Chudzynski & Falandysz 2008; Gençlelep *et al.* 2009; Ouzouni *et al.* 2007; Tüzen *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2012b). Contêm ainda fibras dietéticas e baixos níveis de glúcidos e lípidos (Firenzuoli *et al.* 2007; Leal *et al.* 2013).

Os cogumelos comestíveis contêm uma percentagem elevada de humidade (81,8 – 94,8%) cuja variabilidade no conteúdo depende da espécie de cogumelo e outros parâmetros relacionados com a colheita e estágio crescimento (Guillamón *et al.* 2010). O crude proteico encontrado nos cogumelos aparece em níveis bastante elevados, podendo variar entre valores como 15,2 a 80 g/100 g de massa seca (ms) de acordo

com a espécie (Barros *et al.* 2008a). As proteínas presentes nos cogumelos contêm todos os nove aminoácidos essenciais para a dieta humana, variando amplamente também os níveis entre as espécies (Guillamón *et al.* 2010). De acordo com a FAO/WHO (2002) os cogumelos são considerados ricos em ácido glutâmico, ácido aspártico e arginina, apresentando no entanto, poucas quantidades de metionina e cisteína. Curiosamente foram detetados dois aminoácidos pouco comuns: ácido γ -amino butírico (GABA) e ornitina, que têm mostrado importantes atividades fisiológicas (Guillamón *et al.* 2010). A composição de aminoácidos presente nas proteínas dos cogumelos é comparável à da proteína animal, o que mostra particular importância no sentido de contrabalançar um crescente consumo de proteína de fontes alimentares de origem animal. Desta forma a importância dietética de cogumelos deverá crescer nos próximos anos, com o interesse de reduzir os riscos relacionados ao consumo de proteínas de origem animal (Guillamón *et al.* 2010).

A gama de concentrações de glúcidos mencionadas na literatura varia entre 35 e 70% da massa seca (ms), mostrando alguma heterogeneidade entre espécies, sendo o manitol e trealose os principais glúcidos na maioria das espécies analisadas, apesar dos diferentes perfis encontrados. Para espécies como *Lactarius deliciosus*, *Chantarellus cibarius*, *A. bisporus* e *Volvariella volvacea*, o manitol é o glúcido mais abundante, enquanto a trealose predomina em espécies como *Pleurotus ostreatus*, *Boletus edulis*, *Lepista nuda* e *Calocybe gambosa* (Barros *et al.* 2007a; Barros *et al.* 2008a).

Alguns autores têm considerado os cogumelos como uma boa fonte de vitaminas baseados nos elevados níveis encontrados de riboflavina (vitamina B2), niacina (vitamina B3) e ácido fólico (vitamina B8) e alguns vestígios de ácido ascórbico (vitamina C), tiamina (vitamina B1), ergosterol (precursor da vitamina D), β -caroteno (precursor da vitamina A), tocoferol (vitamina E) e cianocobalamina (vitamina B12) (Guillamón *et al.* 2010; Heleno *et al.* 2010; Reis *et al.* 2012a). Os cogumelos aparecem

como a única fonte não-animal que contém vitamina D, sendo portanto, a fonte natural de vitamina D para os vegetarianos. O conteúdo em ergocalciferol (vitamina D₂) é considerável em muitas espécies silvestres, mas infelizmente, quase ausente em espécies cultivadas (Mattila *et al.* 2000; Reis *et al.* 2012a).

Fornecem ainda quantidades baixas de lípidos, cerca de 2,9% da massa seca, sendo predominantes os ácidos gordos insaturados em especial o ácido palmítico (C16:0), o ácido oleico (C18:1) e ácido linoleico (C18:2) (Barros *et al.* 2007a; Gençcelep *et al.* 2009).

Em comparação com os legumes, os cogumelos provaram que oferecem ainda um conteúdo razoável de muitos elementos minerais (6 – 10,5% ms) (Guillamón *et al.* 2010). Os principais constituintes nas cinzas são potássio (K) e, dependendo das espécies, o fósforo (P) ou magnésio (Mg), além de cálcio (Ca), cobre (Cu), ferro (Fe) e zinco (Zn) (Soriano *et al.* 2007; Vetter 2005). Deve ser dada especial atenção à acumulação de metais pesados, particularmente elementos tóxicos como cádmio, chumbo e mercúrio, comumente presentes nos substratos. A literatura descreve algumas espécies (*L. edodes*) como acumuladoras de metais pesados com o cádmio, enquanto outras espécies podem ser acumuladoras de oligoelementos essenciais como o selênio (*A. bisporus*, *P. ostreatus*, e algumas espécies do género *Boletus*) (Chudzynski & Falandysz 2008; Cocchi *et al.* 2006; Kalac 2010).

Um estudo efetuado com estirpes de cogumelos *A. ponderosa* recolhidas em Espanha mostrou que esta espécie contém elevados níveis de K e conteúdo bastante considerável em Na, Ca, Mg e Fe (Moreno-Rojas *et al.* 2004).

Desta forma os cogumelos comestíveis podem representar um dos maiores recursos alimentares mundiais de nutrição e gastronomia do futuro.

Além de todas as propriedades nutricionais descritas, os cogumelos comestíveis são caracterizados por conterem bastantes compostos bioativos naturais diferentes, como compostos fenólicos e polissacáridos, podendo desta forma, ser encarados como

atrativos alimentos funcionais (Barros *et al.* 2008a; Barros *et al.* 2007c; Leal *et al.* 2013).

1.4.3 Propriedades medicinais

A ação farmacológica e interesse terapêutico dos cogumelos medicinais são conhecidos desde há centenas de anos, sendo parte integrante das práticas de medicina tradicional oriental. Inúmeros estudos têm revelado que diferentes espécies de cogumelos comestíveis apresentam elevado valor na prevenção e no tratamento de várias doenças humanas, levando a considerá-las como potenciais alimentos funcionais (Guillamón *et al.* 2010; Reis *et al.* 2012a).

A definição de alimento funcional, foi estabelecida pelo Instituto Internacional de Ciências da vida (*International Life Sciences Institute* (ILSI), Europa), afirma que "um alimento pode ser considerado como "funcional", se é satisfatoriamente demonstrado afetar benéficamente uma ou mais funções no organismo, além de efeitos nutricionais adequados, de forma que seja relevante para um melhor estado de saúde e bem-estar e/ou redução do risco de doença" (Guillamón *et al.* 2010). É um alimento que faz parte do padrão de alimentos. Não é um comprimido, nem uma cápsula, nem nenhuma forma de suplemento alimentar (European Commission (2003)). Deste modo, de acordo com a definição de alimento funcional, alguns cogumelos estão atualmente ganhando reconhecimento mundial como alimentos funcionais, pela constatação de induzirem relativa melhoria, prevenção ou tratamento de algumas doenças (Guillamón *et al.* 2010; Mattila *et al.* 2000).

As múltiplas atividades biológicas presentes em algumas espécies de cogumelos comestíveis devem-se à enorme variedade de metabolitos secundários que estes podem produzir (Ferreira *et al.* 2007; Ribeiro *et al.* 2007).

Diferentes compostos bioativos de cogumelos comestíveis são responsáveis pelas suas propriedades antioxidantes (Barros *et al.* 2007a; Barros *et al.* 2008a; Barros *et al.*

2007c), antitumorais (Aida *et al.* 2009; Cheng *et al.* 2008; Cheung *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2012a; Zhang *et al.* 2007), antimicrobianas, antivirais (Barros *et al.* 2007b; Hearst *et al.* 2009; Rao *et al.* 2009), imunomoduladoras e imunoestimuladoras (Cui & Chisti 2003; Ishii *et al.* 2011; Jesenak *et al.* 2013; Pereira *et al.* 2012), hepatoprotetoras (Jayakumar *et al.* 2006; Lu *et al.* 2007; Pereira *et al.* 2012), anti-inflamatórios (Guillamón *et al.* 2010), hipoglicémicas, hipocolesterolémicas, anti-hipertensoras e antiaterogênicas (Giavasis 2014; Li *et al.* 2007; Pereira *et al.* 2012).

Têm sido descritos na bibliografia inúmeras espécies de cogumelos ricos em compostos bioativos, com propriedades medicinais ricas em compostos bioativos, pertencentes aos gêneros *Aleurodiscus*, *Agaricus*, *Coprinus*, *Clitocybe*, *Coriolus*, *Daedalea*, *Lentinula*, *Grifola*, *Ganoderma*, *Marasmius*, *Merulius*, *Pleurotus*, *Polyporus*, *Poria*, *Psathyrella*, e *Tricholoma* spp. (Guillamón *et al.* 2010).

Estudos efetuados com cogumelos da espécie *Coriolus versicolor* mostraram que este cogumelo produz enzimas, e metabolitos secundários, como o PSK e PSP, que desempenham um papel importante na prevenção da carcinogênese, funcionam como agente desintoxicante por absorver os radicais livres acumulados no organismo e fator de apoio ao sistema imunitário (Cui & Chisti 2003).

Outra espécie de cogumelo muito estudada devido às suas propriedades é *L. edodes*, vulgarmente conhecido por *shiitake*. As propriedades medicinais do *shiitake* são conhecidas há muito tempo, sendo usado na medicina oriental no combate a inúmeras doenças. Alguns estudos têm comprovado que esta espécie é um importante regulador da taxa de colesterol no sangue, inibidor do desenvolvimento de células cancerígenas, combate inúmeras doenças causadas por vírus, bactérias ou outros fungos (Giavasis 2014; Hearst *et al.* 2009; Rao *et al.* 2009).

Aos cogumelos da espécie *Agaricus blazei*, também chamados popularmente de "Cogumelo do Sol", são também atribuídas propriedades medicinais, nomeadamente

como fortalecedor do sistema imunológico e ação antitumoral (Firenzuoli *et al.* 2007; Ishii *et al.* 2011).

Outro exemplo é o cogumelo da espécie *Grifola frondosa* conhecido por *Maitake* que para além de ter um sabor agradável, tem propriedades terapêuticas, com aplicação na área oncológica e em situações de imunossupressão. Estimula o sistema imunológico no combate a doenças antes e depois de instaladas, em casos de hipertensão, diabetes, hipercolesterolemia e tumores cancerígenos, sendo bastante utilizado na área alimentar, não só como alimento funcional mas também como suplemento alimentar (Mao *et al.* 2007).

O conteúdo em compostos biologicamente ativos pode variar consideravelmente em cogumelos comestíveis, de acordo com a espécie ou, dentro da mesma espécie, pelo facto de a concentração destas substâncias ser afetada por diferenças tais como: condições de tensão, substrato, cultivo e/ou frutificação, grau de desenvolvimento, idade dos cogumelos frescos, condições de armazenamento, processamento e práticas culinárias (Barros *et al.* 2007c).

Os efeitos preventivos e/ou curativos de diversas estirpes de cogumelos em determinadas patologias constituem um forte incentivo à investigação e produção de metabolitos biologicamente ativos a partir destes fungos superiores, tais como os *Basidiomycetes*. Existem atualmente vários tipos de produtos, obtidos de corpos de frutificação e micélios, comercializados como suplementos dietéticos por apresentarem potenciais efeitos terapêuticos, e/ou consumidos na forma de cápsulas, comprimidos ou extratos (Guillamón *et al.* 2010; Wong *et al.* 2012). Com efeito, o uso medicinal de extratos de cogumelos comestíveis pode ser mais natural e menos dispendioso do que as tradicionais terapias farmacológicas e poderia reduzir a ocorrência de efeitos adversos (Arteiro *et al.* 2012).

As múltiplas atividades biológicas descritas são devidas à enorme variedade de metabolitos secundários presentes nos cogumelos, incluindo compostos fenólicos e

complexos proteína-polissacárido. Estes metabolitos apresentam baixa toxicidade e menos efeitos colaterais que muitos fármacos de síntese química, representando um valioso recurso potencial para a produção de compostos naturais, podendo, ser encarados como atrativos alimentos funcionais (Ferreira *et al.* 2007; Liu *et al.* 2012; Ribeiro *et al.* 2007).

1.5 Compostos biologicamente ativos

São conhecidos alguns constituintes de cogumelos que possuem propriedades medicinais tais como: polissacáridos (β -glucanos, proteoglicanos, glicopeptidos, lentinan[®], pleuran); compostos fenólicos (flavonoides, xantonas), saponinas, cumarinas, triterpenoides terpenos, esteroides, lectina, fibras dietéticas, alcaloides, purinas e pirimidinas entre outros.

Aos compostos fenólicos são atribuídas excelentes propriedades como antioxidantes, anti-inflamatórias ou antitumorais, entre outras. Os compostos fenólicos são compostos aromáticos hidroxilados, que possuem um ou mais anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxilo. Eles incluem um grande número de subclasses, tais como flavonóides, ácidos fenólicos, incluindo ácidos hidroxibenzóico e ácidos hidroxicinâmicos, estilbenos, lignanas, taninos e polifenóis oxidados, exibindo uma grande diversidade de estruturas (Palacios *et al.* 2011). A composição fenólica dos cogumelos parece ser caracterizada pela presença de ácidos fenólicos, sendo o ácido p-hidroxibenzóico o composto principal na maioria das espécies já estudadas (*Suillus bellini*, *Tricholomopsis rutilans*, *Hygrophorus agathosmus*, *Amanita rubescens*, *Russula cyanoxantha*, *Boletus edulis*, *Tricholoma equestre*, *Suillus luteus*, *Suillus granulatus*) (Barros *et al.* 2009; Vaz *et al.* 2011a).

Os polissacáridos, incluindo complexos proteína-polissacáridos, são dos principais constituintes bioativos de cogumelos comestíveis e medicinais sendo-lhe atribuídas

uma série de potentes atividades biológicas e farmacológicas incluindo antitumoral, imunomoduladores, atividades anti-inflamatória, cardiovascular, hipocolesterolêmica, antiviral, antibacteriana, antiparasitária, antifúngica, antidiabética, e efeito hepatoprotetor (Guillamón *et al.* 2010; Vinogradova & Wasser 2005). Durante as últimas décadas, várias frações de polissacáridos têm sido isoladas a partir dos corpos de frutificação de cogumelos ou na sua forma de micélios (Cheung *et al.* 2012).

As principais classes de compostos ativos são: proteínas, polissacarídeos (β -D-glucanos associados ou não a cadeias de xilose, manose, galactose ou ácido urónico), lipopolissacáridos, e glucoproteínas (complexos β -D-glucanos-proteínas).

Os tipos de monossacáridos presentes em polissacáridos com atividade antitumoral são glucose, galactose, manose, xilose, arabinose, fucose, ribose e ácido glucurónico. Para além dos conhecidos β -(1,3)-glucanos existe uma ampla gama de outros glucanos biologicamente ativos com diferentes estruturas. Estes glucanos tem estruturas lineares ou ramificadas, compostas de unidades de glucose ligadas em posição α ou β , e alguns deles contêm cadeias laterais, ligadas em diferentes posições. As cadeias laterais de heteroglucanos contêm ácido glucurónico, xilose, galactose, manose, arabinose ou ribose e podem ter diferentes combinações.

Um outro grande grupo de polissacáridos bioativos são os glicanos que contêm outras unidades além da glucose na sua cadeia principal. Eles são classificados como galactanos, fucanos, xilanos e mananos de acordo com o componente glucídico presente na cadeia principal. As cadeias laterais dos heteroglicanos podem conter arabinose, manose, fucose, galactose, xilose, ácido glucurónico e glucose como componentes principais, ou em diversas combinações (Wasser 2002; Zhang *et al.* 2007).

Os β -(1,3)-glucanos e os α -(1,4)-glucanos apresentam uma conformação helicoidal e flexível; os α e β -(1,2)-glucanos possuem uma conformação rígida e pregueada e os α e β -(1,6)-glucanos podem apresentar várias conformações possíveis, pela razão da

conexão (1,6) ser constituída por três ligações em vez de apenas duas, tornando-a mais flexível e com maior liberdade de rotação do que os outros tipos de conexões (Zhang *et al.* 2007).

A atividade dos polissacáridos é determinada pela sua conformação, composição química, propriedades físicas e tamanho. A parede celular das espécies fúngicas é principal fonte de polissacáridos com atividade antitumoral (Wasser 2002).

Têm sido investigados uma ampla gama de polissacáridos de *Basidiomycetes* superiores, com atividades antitumorais ou imunostimuladores com diferentes estruturas químicas. Os glucanos ativos, com forte atividade antitumoral, que são encontrados em *Basidiomycetes* contêm tanto configurações α como β , estendendo-se desde homopolímeros a heteropolímeros altamente complexos (Kozarski *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2007).

Os polissacáridos de cogumelo com maior bioatividade são β -(1,3)(1,6)-glucanos (Figura 1.9), e alguns heteroglicanos. Características estruturais dos glucanos, tais como conexões β -(1,3) na cadeia principal e pontos de ramificação adicionais com conexões β -(1,6), assim como a presença de conformação helicoidal, foram encontradas em polissacáridos com atividade antitumoral isolados de cogumelos, parecendo ser necessárias para a ação antitumoral. Os β -glucanos que contêm principalmente conexões (1,6) possuem menor atividade antitumoral (Wasser 2002; Zhang *et al.* 2007).

Em algumas espécies de cogumelos, os polissacáridos produzidos encontram-se ligados a proteínas ou péptidos formando complexos proteína-polissacárido ou péptido-polissacárido, os quais apresentam maior atividade antitumoral (Cui & Chisti 2003).

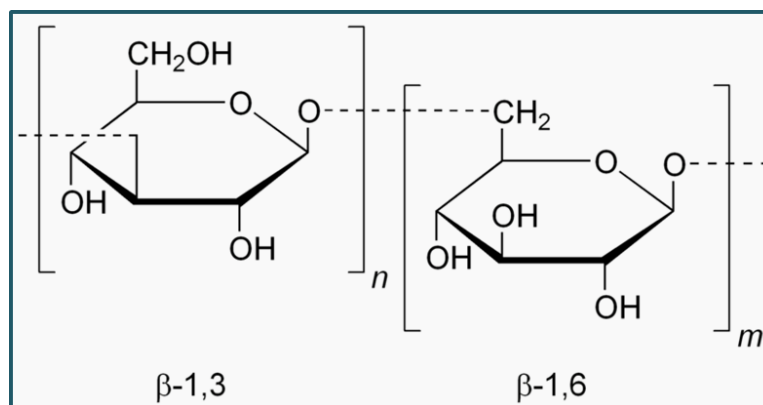


Figura 1.9. Representação exemplificativa das conexões β -(1,3) e (1,6) de D-glucanos (Adaptada de 8).

Um dos mais conhecidos e referenciados polissacáridos é o *lentinan*, um glucano obtido de *L. edodes*, composto por uma cadeia principal com resíduos de β -(1,3)-D-glucose e grupos laterais β -(1,6)-D-glucose e um peso molecular de 500 kDa. Um polissacárido semelhante, o *schizophyllan* (ou *sizofiran*), é produzido pelo cogumelo *Schizophyllum commune*, apresenta massa molecular entre 100–200 kDa e adquire uma conformação em tripla hélice (Hearst *et al.* 2009; Rao *et al.* 2009).

Os cogumelos *P. ostreatus*, *G. frondosa*, *Ganoderma lucidum* e *C. versicolor* sintetizam β -glucanos bioativos, nomeadamente *pleuran* (um insolúvel β -(1,3) (1,6)-glucano), *grifolan* e *ganoderan* (β -(1,3)-D-glucanos com ligações glicosídicas β -(1,6) a cada terceiro ou sexto resíduo glucopiranozil, respetivamente) e *krestin* (um proteoglucano com cadeia constituída por β -(1,3)-D-glucano), respetivamente (Cui & Chisti 2003; Giavasis 2014; Jesenak *et al.* 2013; Mao *et al.* 2007; Shi *et al.* 2008).

O *pullulan* obtido de *Pullularia pullulans* é um homopolissacárido solúvel, que consiste em unidades de malto-trioses com ligações alternadas α -(1,4) e α -(1,6), e com uma massa molecular entre 360 – 480 kDa (Giavasis 2014).

Os cogumelos *A. blazei*, são uma fonte de vários polissacáridos com atividade antitumoral, incluindo β -(1,6)(1,3) glucanos, β -(1,6), α -(1,3) glucanos, e β -(1,6), α -(1,4) glucanos. Em contraste com a maioria dos glucanos produzidos em cogumelos, estes glucanos tem uma cadeia principal com β -(1,6) glucopiranosidos. Estes cogumelos

produzem ainda proteoglicanos solúveis, com cadeias principais de α -(1,4)-glucanos e ramificações β -(1,6) glucopiranosídicas, com 380 kDa, e heteroglicanos que contêm resíduos de glucose, galactose e manose. Em cultura pode ainda sintetizar proteoglicanos extracelulares com resíduos de manose, galactose, glucose ou ribose e peso molecular entre 1000–10000 kDa (Giavasis 2014; Ishii *et al.* 2011).

Existem um número significativo de polissacáridos que foram comercializados graças as suas propriedades biológicas. Destacam-se alguns tipos de polissacáridos extraídos de cogumelos que têm sido utilizados no tratamento de alguns tipos de tumores, com a característica comum de apresentarem conformação helicoidal tripla em solução. Entre eles encontram-se β -glucanos como por exemplo os polissacaropéptidos PSP e PSK ou Krestin[®] extraídos de micélio de *C. versicolor*, o Lentinan[®] um polissacárido antitumoral solúvel em água extraído a partir de corpos de frutificação de *L. edodes*, Imunoglukan[®] constituído por o β -glucano *pleuran* obtido de *P. ostreatus* e o Schizophyllan[®] ou SPG extraído de *S. commune* (Cui & Chisti 2003; Giavasis 2014; Jesenak *et al.* 2013; Vinogradova & Wasser 2005).

O β -(1,3)-D-glucano, isolado de *Auricularia auricula*, solúvel em água, tem estrutura linear e apesar de apresentar em solução uma cadeia em hélice simples, possui também atividade antitumoral bastante forte (Zhang *et al.* 2007).

Todos estes compostos apresentam elevado peso molecular e não podem ser sintetizados, pelo que a sua extração do fungo em questão torna-os extremamente caros (Smith *et al.* 2002; Wasser 2011).

Estes metabolitos produzidos apresentam menor toxicidade e menos efeitos colaterais que muitos fármacos de síntese química, representando desta forma, os cogumelos comestíveis um valioso recurso potencial para a produção de compostos naturais.

1.6 Atividades biológicas

1.6.1 Propriedades antioxidantes

Os cogumelos comestíveis para além de conterem grandes quantidades de proteínas, hidratos de carbono e fibras alimentares, são também fonte de muitos componentes antioxidantes, como carotenóides, flavonóides, compostos fenólicos, polissacáridos e enzimas antioxidantes (Cheng *et al.* 2012).

As espécies reativas de oxigénio (ROS - *reactive oxygen species*), como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o radical superóxido e o radical hidroxilo têm um papel importante nas reações bioquímicas/fisiológicas do corpo humano uma vez que são produtos normais do metabolismo e da respiração celular e, em baixas concentrações, são necessários para algumas funções celulares. Os antioxidantes desempenham uma função importante no sistema de defesa do corpo contra uma produção excessiva de espécies reativas de oxigénio durante os processos patofisiológicos, fatores endógenos, ou devido a fatores ambientais adversos, fatores exógenos, tais como, *stress* ambiental como a poluição, a seca, temperatura, excesso de intensidade de luz e limitação nutricional. Se não existirem antioxidantes naturais disponíveis *in vivo*, podem ocorrer danos profundos nos tecidos e no DNA (Vaz *et al.* 2011b), ou doenças, tais como doenças cardiovasculares (aterosclerose), doenças neurodegenerativas (Alzheimer e Parkinson), doenças autoimunes (lúpus e artrite reumatoide), carcinogénese, cataratas e um envelhecimento acelerado (Duarte-Almeida *et al.* 2006; Noipa *et al.* 2011; Silva *et al.* 2006).

Os antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, através de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexação de metais. Eles podem ser sintéticos ou naturais e, para serem utilizados em alimentos, devem ser seguros para a saúde. Alguns dos antioxidantes sintéticos mais importantes

são hidroxianisol de butilo (BHA) e o hidroxitolueno de butilo (BHT) e entre os naturais destacam-se ácido ascórbico, vitamina E e β -caroteno (Duarte-Almeida *et al.* 2006).

Existem dois mecanismos principais de defesa antioxidante: a defesa antioxidante devida à ação de enzimas tais como superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e glutatono peroxidase (GPx) (Figura 1.10), e a defesa antioxidante devida a componentes não-enzimáticos, tais como, polifenóis, ácido ascórbico, carotenoides e outros compostos naturais (Yoo *et al.* 2008).

A SOD pertence a um grupo de quatro tipos de enzimas, nos quais o metal acoplado a cada um deles é específico, podendo ser Cu, Zn, Fe e Mn. Estas enzimas catalisam a dismutação de superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e são encontrados nos lisossomas, peroxissomas, núcleo, espaço intermembranar da mitocôndria. São observados em maior concentração nos eritrócitos, músculo-esquelético, coração, cérebro, células pulmonares e vasos sanguíneos.

A CAT é uma hemoproteína com NADH na sua estrutura, e catalisa a degradação de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) em oxigénio molecular e água. Este enzima é efetivo em situações de *stress* oxidativo, com altas concentrações de H_2O_2 . Localiza-se principalmente nos peroxissomas e possui alta atividade no fígado, nos eritrócitos, rins e tecido adiposo.

A GPx catalisa a decomposição de H_2O_2 e de alguns hidroperóxidos orgânicos convertendo o glutatono reduzida (GSH) a glutatono oxidado (GSSG), e controla melhor pequenos aumentos de H_2O_2 .

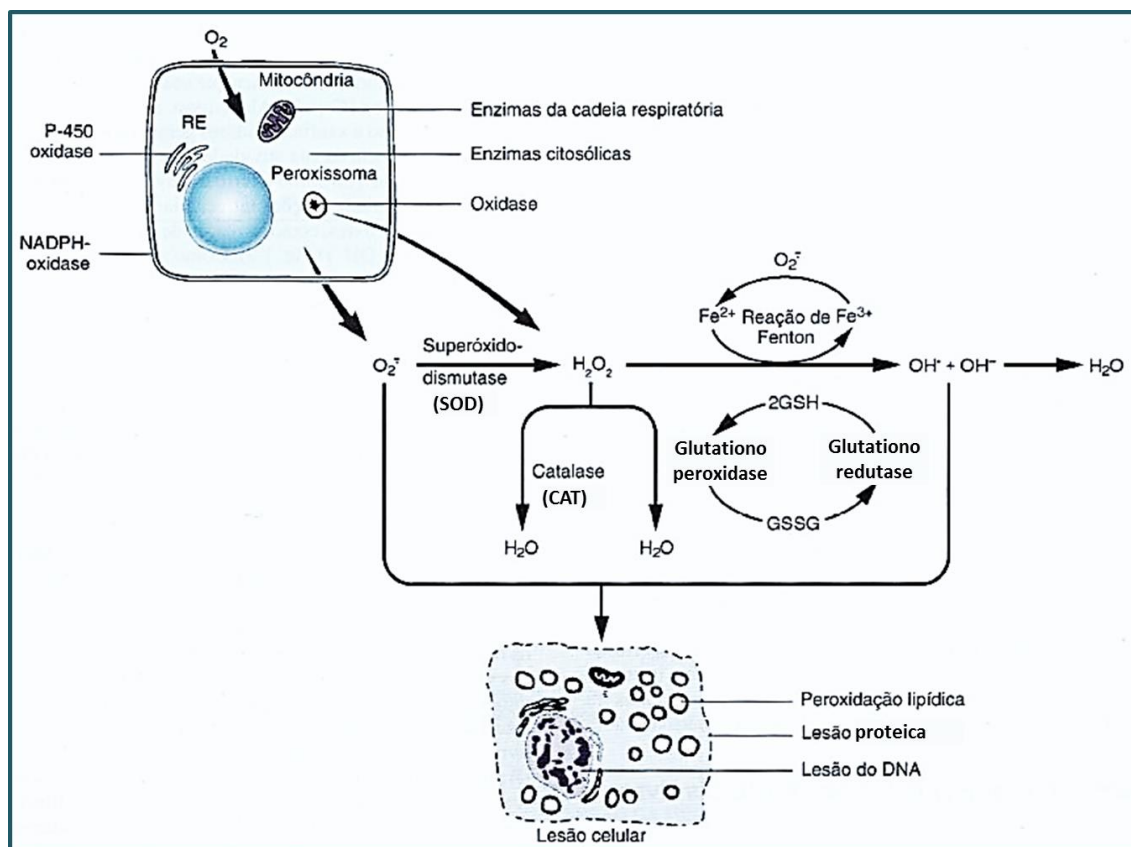


Figura 1.10. Esquema exemplificativo da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e mecanismos antioxidantes nos sistemas biológicos (Adaptada de Grob *et al.* 2013).

O mecanismo de defesa antioxidante devida à ação de enzimas ocorre quando a formação de radicais livres superóxido ($O_2^{\cdot-}$) durante o funcionamento normal das células, devido à ação de enzimas oxidativas no retículo endoplasmático (RE), mitocôndrias, membrana plasmática, peroxissomas e citosol. Estes radicais são convertidos em H_2O_2 por dismutação por ação do enzima SOD e, posteriormente, em OH^{\cdot} pela reação de Fenton, reação de redução do Fe^{3+} em Fe^{2+} . O H_2O_2 também é derivado diretamente de oxidases nos peroxissomas. O enzima CAT também neutraliza a ação do H_2O_2 , degradando-o em água e oxigênio molecular (Figura 1.10) (Grob *et al.* 2013).

Os antioxidantes naturais estão a ser extensivamente estudados quanto à sua capacidade para proteger os organismos e células de danos provocados por *stress* oxidativo, sendo este último considerado uma causa de doenças degenerativas e envelhecimento precoce (Elmastas *et al.* 2007).

Nos últimos anos, a suspeita de toxicidade de alguns compostos sintéticos utilizados em alimentos tem despertado interesse. Algumas indústrias, como as relacionadas com a produção de aditivos alimentares, cosméticos e produtos farmacêuticos, têm aumentado os seus esforços na preparação de compostos bioativos de produtos naturais por extração e purificação (Cheung *et al.* 2012).

Surge assim a necessidade de identificar fontes alternativas naturais e seguras de alimentos antioxidantes, e a busca de antioxidantes naturais, especialmente de origem vegetal, aumentou notavelmente nos últimos anos (Barros *et al.* 2007c). Vários alimentos de origem vegetal, como frutas, legumes, ervas, cereais, rebentos e sementes têm sido investigados quanto à atividade antioxidante durante a última década (Elmastas *et al.* 2007). Estes são ricas fontes de antioxidantes, como vitamina A, vitamina C, vitamina E, carotenóides, flavonóides e outros compostos fenólicos, que impedem danos dos radicais livres, reduzindo o risco de doenças crónicas (Barros *et al.* 2007a; Vaz *et al.* 2011b).

Os cogumelos têm-se tornado um alimento muito procurado devido à sua composição química e propriedades nutracêuticas. Alguns dos seus constituintes têm sido utilizados no tratamento de várias patologias, incluindo tratamentos antitumorais e imunomodulação, proteção do fígado, tratamento de diabetes *mellitus* e cicatrização de feridas (Cheng *et al.* 2012).

1.6.2 Efeito hepatoprotetor

Recentemente, diversos produtos naturais, nomeadamente provenientes de cogumelos, estão a ser alvo de grande interesse pelo seu potencial na prevenção e/ou tratamento de doenças hepáticas (Saleem *et al.* 2010; Shi *et al.* 2008; Wong *et al.* 2012).

O fígado é um dos órgãos que funciona como o principal centro metabólico do organismo. É responsável pelo controlo da secreção da bÍlis para a digestão e intervém no metabolismo de vários nutrientes incluindo glúcidos, proteínas e lípidos, bem como na sua distribuição e excreção dos metabolitos residuais. Adicionalmente apresenta funções de desintoxicação e eliminação de drogas e outros xenobióticos do organismo, proporcionando proteção contra substâncias estranhas (Nitha *et al.* 2011; Saleem *et al.* 2010; Wong *et al.* 2012).

As doenças hepáticas são um grave problema de saúde em todo o mundo. A lesão hepática crónica tem consequências sérias, sendo a doença crónica comum a fibrose hepática, que pode levar a estÁgios finais de cirrose e tumor hepático (Saleem *et al.* 2010; Wong *et al.* 2012). O consumo excessivo de álcool e infeções virais são os fatores de risco mais comuns para doenças do fígado em países desenvolvidos, enquanto que nos países em desenvolvimento a poluição ambiental e infeções parasitárias são também fatores importantes na causa de danos hepáticos (Wong *et al.* 2012; Wu & Cederbaum 2009). O dano celular hepático pode também ser causado por certos agentes quimioterapêuticos, o tetracloreto de carbono, a tioacetamida, entre outros. O aumento da peroxidação lipídica durante o metabolismo do etanol pode resultar no desenvolvimento cirrose hepática (Saleem *et al.* 2010).

Na toxicidade induzida pelo etanol, os radicais livres desempenham um papel importante nas lesões celulares. A exposição aguda ou crónica ao etanol aumenta a produção de ROS, reduz os níveis de antioxidantes celulares e aumenta o *stress* oxidativo em diversos tecidos, principalmente no fígado. Esta induz uma acumulação

de cisteína, provavelmente devido à indução da gama-glutamyltransferase (GGT) (Fernández-Checa *et al.* 1997; Wu & Cederbaum 2009). O acetaldeído produzido no citoplasma do hepatócito pela oxidação do etanol é capaz de inibir a reparação das nucleoproteínas alquiladas, diminuir a atividade catalítica de vários enzimas, e provocar danos mitocondriais. O acetaldeído também promove a morte celular por depleção da concentração de glutathione reduzido através da peroxidação lipídica e potenciação dos efeitos tóxicos dos radicais livres (Ha *et al.* 2010).

Na Figura 1.11 estão representadas as principais vias metabólicas dos compostos de azoto na célula hepática.

A presença de danos hepatocelulares no organismo pode ser detetada por alteração de alguns parâmetros enzimáticos (Figuras 1.12), nomeadamente no aumento da concentração sérica dos enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (ASP), fosfatase alcalina (ALP) e gama-glutamyltransferase (GGT). Estes enzimas são libertados no sangue em grandes quantidades quando ocorrem danos na membrana do hepatócito resultando no aumento da permeabilidade, pelo que têm grande significado no diagnóstico das doenças hepáticas, apesar de não serem específicos destas patologias (McPherson & Pincus 2011).

O enzima aspartato aminotransferase (EC 2.6.1.1), também conhecido como aspartato transaminase ou transaminase glutâmico-oxaloacética é um enzima citoplasmático e mitocondrial encontrado principalmente no tecido hepático dos mamíferos. Quando este órgão sofre danos celulares há um aumento da concentração deste enzima na circulação sanguínea, pelo que a quantificação dos níveis de aspartato aminotransferase no soro sanguíneo constitui um método de diagnóstico importante em diferentes tipos de doenças. As reações enzimáticas que envolvem a transferência intramolecular de grupos amina são muito importantes em diversos processos metabólicos, por exemplo a aspartato aminotransferase controla o fluxo de ácido L-

aspártico no metabolismo dos ácidos nucleicos desempenhando um papel fundamental no crescimento celular (Burtis *et al.* 2008; McPherson & Pincus 2011).

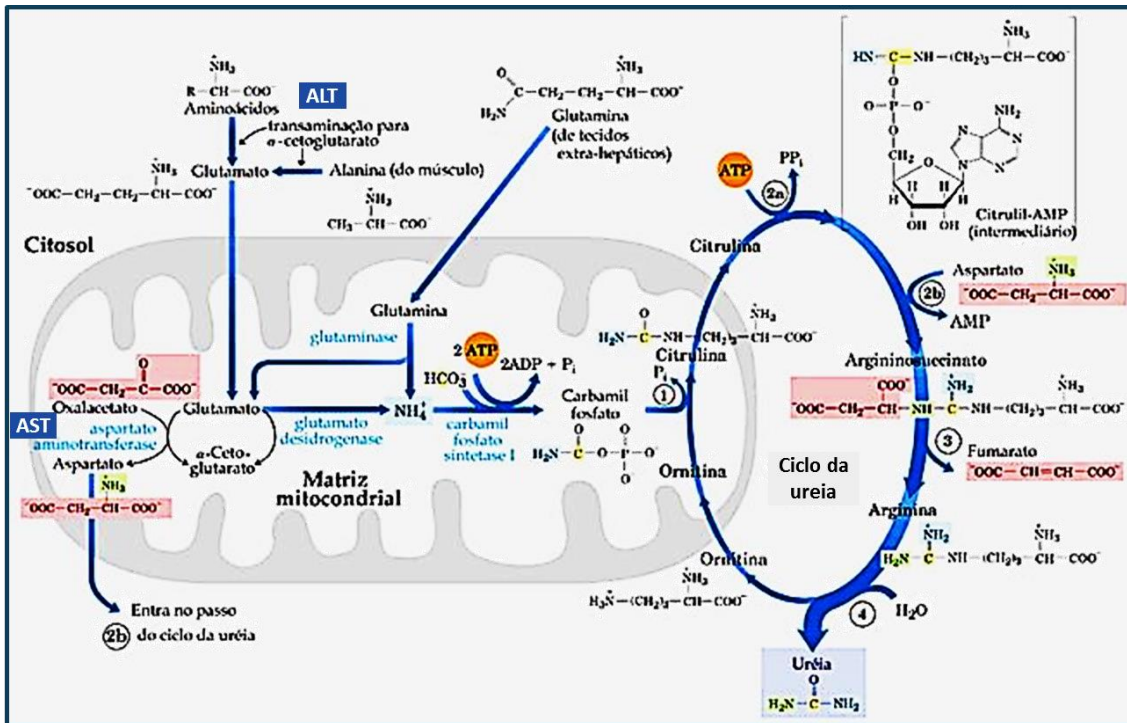


Figura 1.11. Principais vias metabólicas da utilização dos compostos de azoto na célula hepática (Adaptada de Smith *et al.* 2007).

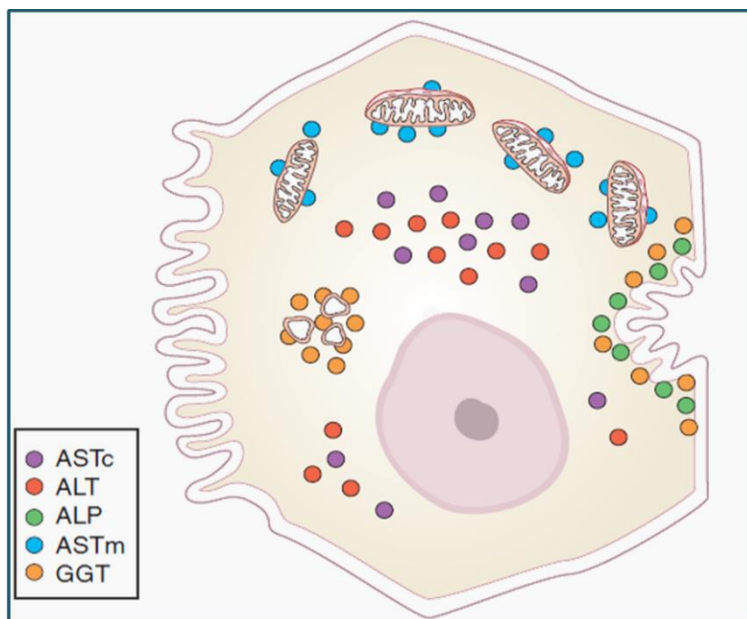


Figura 1.12. Localização dos enzimas hepatocelulares (Adaptada de McPherson & Pincus 2011).

O enzima alanina aminotransferase (EC 2.6.1.2), também conhecido como alanina transaminase ou transaminase glutâmico pirúvica, à semelhança da aspartato aminotransferase é um enzima específico do fígado, pertencente à família das transaminases e catalisa reações de transaminação em diversos processos metabólicos (McPherson & Pincus 2011; Smith *et al.* 2007).

A fosfatase alcalina (EC 3.1.3.1) é um enzima da família das hidrolases, mais especificamente uma fosfohidrolase, isto é, é capaz de remover grupos fosfato de um grande número de moléculas diferentes, incluindo nucleótidos, proteínas e alcalóides. Como o próprio nome sugere a fosfatase alcalina apresenta atividade ótima, *in vitro*, a pH alcalino e está envolvida em diversos processos bioquímicos fundamentais tais como na sinalização celular (regula a fosforilação/desfosforilação), modula sistemas de transporte em diversos tecidos, é indispensável à mineralização óssea, favorece o desenvolvimento gastrointestinal, reduz a atividade secretora biliar, para além de participar em atividades reguladoras do funcionamento de diversos órgãos. No Homem, a fosfatase alcalina é uma glicoproteína tetramérica codificada por 4 genes diferentes, que codificam quatro isoenzimas. Um destes isoenzimas, a fosfatase alcalina tecidual não específica (TNS-ALP), sofre uma modificação conformacional diferente de acordo com o tecido em que é sintetizada, ou seja diferentes padrões de glicosilação dão origem a diferentes isoformas, das quais as mais abundantes são a óssea, a renal e a hepática. No fígado, a TNS-ALP localiza-se sobretudo na membrana plasmática dos hepatócitos pelo que a sua determinação no soro sanguíneo é muito utilizada no diagnóstico de patologias hepatobiliares (Burtis *et al.* 2008; McPherson & Pincus 2011).

A gama-glutamiltransferase ou gama-glutamil transpetidase (EC 2.3.2.2) pertence a um grupo de enzimas que catalisam a transferência de aminoácidos de um péptido para um recetor molecular. Especificamente este enzima catalisa a reação de transferência de grupos funcionais gama-glutamil para outro aminoácido ou péptido.

Podemos encontrar concentrações elevadas de GGT na membrana celular de muitos tecidos, tais como o renal, prostático, pancreático e hepático, constituindo um biomarcador importante na detecção de doenças do foro hepatobiliar e do consumo/abuso de xenobióticos, por exemplo o etanol. Vários efeitos fisiológicos estão associados à ação deste enzima, tais como no transporte de aminoácidos e no metabolismo do glutationo. De facto evidências experimentais sugerem que a GGT desempenha um papel importante no catabolismo extracelular do glutationo, o principal tiol antioxidante nos humanos. Para além disso a GGT aumenta a disponibilidade intracelular de cisteína de modo a promover a manutenção da homeostase celular e o combate ao *stress* oxidativo (McPherson & Pincus 2011).

Existe, uma necessidade urgente de criar alternativas nas terapêuticas de patologia hepática e muitos produtos naturais, nomeadamente provenientes de cogumelos, estão a ser alvo de investigação para este fim (Saleem *et al.* 2010; Shi *et al.* 2008; Wong *et al.* 2012)

Num ensaio realizado em pacientes com hepatite B crónica, a administração de 600 mg de Ganopoly® (extrato polissacárido de *G. Lucidum*) três vezes por dia, durante 12 semanas, revelou que 33% dos pacientes atingiram os valores normais de aminotransferases e 13% do antigénio de superfície do vírus deixou de ser detetável no soro (Lindequist *et al.* 2005). Em 2008, Shi e colaboradores, realizaram um estudo de avaliação dos efeitos hepatoprotetores dos péptidos do *G. lucidum* contra danos hepáticos provocados por D-galactosamina (D-Gal) em murganhos. A administração de D-Gal levou a um aumento significativo da AST e ALT no soro, no grupo sem administração de extrato de *G. lucidum*, enquanto o grupo ao qual foi administrado o extrato não sofreu os danos hepáticos previstos. (Shi *et al.* 2008).

Mais recentemente, num estudo, em que se utilizaram polissacáridos obtidos de culturas de *P. ostreatus*, para a avaliação de efeito protetor na prevenção de hepatotoxicidade induzida pelo tetracloreto de carbono (CCl₄), observou-se que a

administração oral dos compostos durante 15 dias em ratos conduziu a uma diminuição significativa da atividade dos enzimas séricos AST e ALT, da peroxidação lipídica, e consequente inibição da depleção da concentração de glutathione reduzido (Nada *et al.* 2010).

Um outro estudo, também com a finalidade de investigar as atividades hepatopreventivas e terapêuticas de polissacaropéptidos (PSP) de culturas de *P. ostreatus*, foram efetuados ensaios de pré-tratamento (prevenção) e pós-tratamento (terapêutica) com PSP na intoxicação com tioacetamida, em murganhos Swiss. Os resultados mostraram que os compostos PSP induziram uma normalização nas funções hepatocitárias, com reajuste dos níveis de bilirrubina, e atividades ALT, AST e ALP, com melhores resultados nos ensaios de utilização de compostos PSP como terapêutica (Refaie *et al.* 2010).

Também os complexos proteína-polissacárido obtidos a partir de culturas de *P. ostreatus* apresentam efeito protetor na prevenção de hepatotoxicidade induzida por uma dose aguda de etanol, mantendo estáveis os valores das atividades AST, ALT, ALP e GGT (Salvador *et al.* 2012).

1.6.3 Atividade antitumoral

A procura de substâncias ou métodos que potenciem o sistema imunológico humano de forma a induzir uma resistência sem causar efeitos colaterais tem sido uma das buscas da ciência na cura contra doenças tumorais.

Os cogumelos têm sido bastante valorizados como fontes comestíveis e medicinais e os seus compostos antitumorais têm sido identificados em imensas espécies (Zhang *et al.* 2007). Alguns estudos sobre o desenvolvimento de agentes antitumorais têm sido levados a cabo utilizando polissacarídeos extraídos de cogumelos. Um dos primeiros estudos sobre a aplicação médica dos cogumelos data de 1959 quando um possível agente antitumoral descrito como *calvacina* foi isolado do cogumelo *Calvatia gigantea*.

Além deste, em estudos realizados no Japão revelaram que o *L. edodes* possuía também uma forte atividade antitumoral, pela presença de um complexo glucano-proteico o *lentinan* (Cui & Chisti 2003; Giavasis 2014). Muitos outros polissacáridos isolados de diferentes fungos têm demonstrado atividade antitumoral, tais como o PSK e o PSP de *C. versicolor*, o *schizophyllan* de *S. commune* e o *ganoderan* de *G. lucidum* e têm sido intensamente investigados. Estes polissacáridos têm demonstrado efeitos inibitórios em muitos tipos de tumores, incluindo, Sarcoma 180, carcinoma de Ehrlich, Sarcoma 37 e carcinomas dos pulmões (Wasser 2002).

Devido à sua atividade antitumoral os polissacáridos isolados de fungos com propriedades medicinais tornaram-se muito atrativos, uma vez que apresentam uma baixa toxicidade para as células normais e uma aparente ausência de danos colaterais nos pacientes. Para além disso, estes polissacáridos têm reduzido em cerca de 50% o tamanho dos tumores e têm prolongado o tempo de sobrevivência dos pacientes, estando atualmente a ser utilizados como adjuvantes da terapia em alguns países (Cao & Lin 2004; Wasser 2002).

Os polissacarídeos cuja atividade é especialmente benéfica quando usados em conjunto com a quimioterapia previnem a oncogénese, demonstram atividade antitumoral e prevenção da metastização. Estes atuam por ativação de macrófagos citotóxicos, monócitos, neutrófilos, células natural *killer* (NK), células dendríticas e mediadores químicos, as citocinas, levando a respostas agudas e complementares. Resumindo, atuam como indutores de citocinas quer ao nível da expressão genética destas quer ao nível dos recetores, tendo por isso ação tanto ao nível das defesas inatas como das adquiridas (Smith *et al.* 2002; Wasser 2002, 2011). Em algumas espécies estes compostos apresentam um efeito citotóxico em células cancerígenas. A capacidade destes compostos alterarem a resposta do sistema imunitário pode depender de diversos fatores como a dose, a via de administração e a frequência de administração.

Muitos investigadores têm sugerido que os polissacáridos extraídos de cogumelos produzem os seus efeitos antitumorais por ativação de diversas respostas imunológicas no hospedeiro, estimulando os seus mecanismos de defesa. Este facto foi verificado experimentalmente uma vez que o efeito antitumoral do *lentinan* e de outros polissacáridos é inibido quando é utilizado um pré-tratamento com agentes antimacrófago ou quando se utilizam ratos timoectomizados (que não possuem um sistema imune timo-dependente) e diminui substancialmente por administração de um soro antilinfócito. Assim, pensa-se que o efeito dos polissacáridos é devido à potenciação de células T, de macrófagos e de células NK, depois de um reconhecimento específico das células tumorais, já que os macrófagos e os linfócitos podem libertar citocinas tais como o TNF- α , o interferão γ (IFN- γ) e a IL-1 provocando um efeito antiproliferativo nas células tumorais e induzindo a sua apoptose (Cao & Lin 2004; Lindequist *et al.* 2005).

Existem ainda algumas citocinas, como IFN- γ , IL-12 e IP-10 (interferão indutível 10), que podem inibir a angiogénese *in vivo* e *in vitro*. Esta capacidade é importante porque o crescimento tumoral e as metástases são angiogénico-dependentes. Para estimular a angiogénese, os tumores sub-regulam a produção de variados fatores angiogénicos, incluindo os fatores de crescimento fibroblásticos (α -FGF e β -FGF) e o fator de crescimento celular endotelial vascular/ fator de permeabilidade vascular. Desta forma, a antiangiogénese pode representar um importante mecanismo subjacente à atividade antitumoral (Cao & Lin 2004; Wasser 2002).

Sumariamente, a atividade antitumoral de polissacáridos extraídos de cogumelos é devida à potenciação da resposta imunológica e envolve a ativação de linfócitos. O mecanismo de ação dos β -D-glucanos como modificadores da resposta biológica proposto (Wasser 2002) está representado na Figura 1.13.

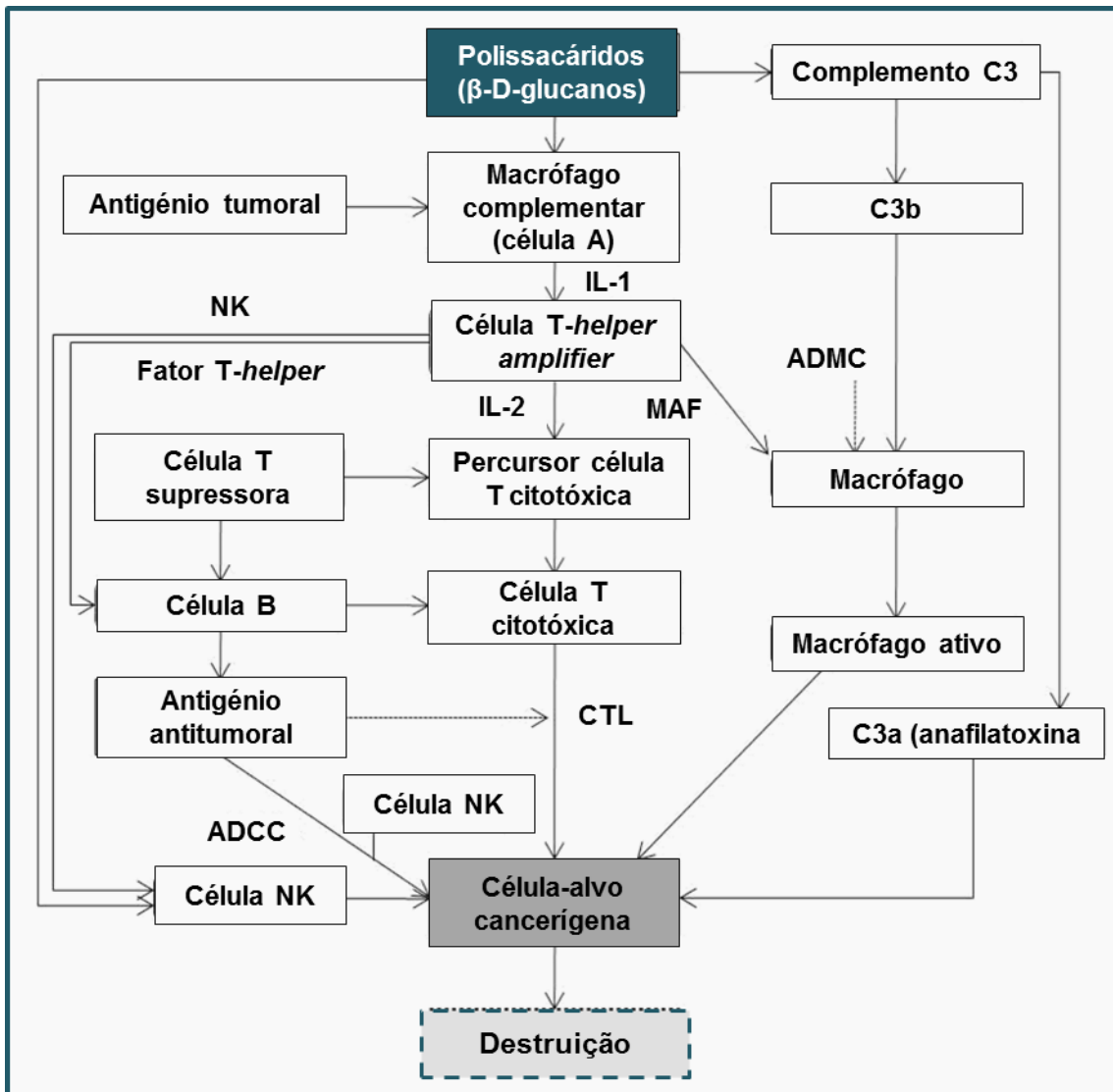


Figura 1.13. Mecanismo possível de ação dos β-D-glucanos como modificadores da resposta biológica (Adaptada de Wasser 2002).

Uma das vias pela qual os β-D-glucanos podem induzir a resposta imunológica é ligando-se à membrana das células efectoras (células fagocitárias e células NK) através do recetor do complemento C3, estimulando a fagocitose e/ou a desgranulação citotóxica. Isto deve-se ao facto de o complemento C3 ser clivado nos complementos C3a e C3b. O complemento C3a é uma anafilatoxina que pode ativar basófilos e mastócitos induzindo a sua desgranulação, aumentando a permeabilidade vascular e agindo como mediador do processo inflamatório local, podendo levar à anafiloxia. O complemento C3b é uma opsonina e como tal promove a fagocitose por ação de

macrófagos que são ativados. Os macrófagos podem também ser ativados devido à ação de anticorpos, ocorrendo citotoxicidade mediada por macrófagos, dependente de anticorpos (ADMC) (Wasser 2002).

Os polissacáridos, nomeadamente os β -D-glucanos podem ainda estimular diretamente as células NK, que destruirão a célula cancerígena. Por outro lado, os β -D-glucanos estimulam os macrófagos a produzir IL-1 que por sua vez vai estimular os linfócitos T-*helper* a aumentar o seu metabolismo interno e a produzir citocinas (interleucinas e interferões) (Zhang *et al.* 2007).

Os linfócitos T-*helper* em grande número irão produzir, entre outros, o IFN- γ que irá promover a fagocitose das células cancerígenas, tornando os macrófagos citotóxicos para o tumor, uma vez que o IFN- γ é um Fator Ativador de Macrófagos (MAF). Irá, também, estimular o crescimento e a proliferação das células B, ativar os linfócitos T citotóxicos e inibir as células T supressoras, levando a um aumento da taxa de células T e de células T citotóxicas (CTL) ativas. As células T-*helper* produzem ainda IL-2, que também ativa macrófagos e células NK, nomeadamente células LAK, células NK com um potencial citotóxico pouco ativo ou inerte, que são induzidas a transformar-se em células citotóxicas pela IL-2. A interleucina-2 pode igualmente induzir a proliferação de células B e a produção de anticorpos e ativar o precursor da célula T citotóxica, levando ao aumento do número de células T citotóxicas ativas (Wasser 2002).

As células T citotóxicas por sua vez produzem perforinas e granzimas que têm a capacidade de induzir a lise da célula tumoral. As células B irão provocar uma citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC), um mecanismo de imunidade celular que é parte da resposta imune adaptativa, devido à sua dependência de uma resposta de anticorpos inicial, pelo qual uma célula efetora do sistema imunitário provoca a lise de uma célula-alvo que se encontra ligada a anticorpos específicos. É um dos mecanismos através dos quais os anticorpos, como parte da resposta imune humoral, podem agir para limitar e conter a infeção. O

mecanismo clássico é mediado por células NK, podendo também ser mediado por monócitos e eosinófilos. A ADCC mediada por células NK requer o reconhecimento dos anticorpos ligados à superfície da célula-alvo por um recetor da célula NK, levando à libertação de citocinas como IFN- γ e de grânulos citotóxicos contendo perforinas e granzimas que entram na célula-alvo e promovem a morte celular, desencadeando a apoptose. Este mecanismo é semelhante ao desencadeado pelas células T citotóxicas que também induzem a morte celular por meio de perforinas e granzimas, no entanto são mecanismos independentes (Cao & Lin 2004; Wasser 2002).

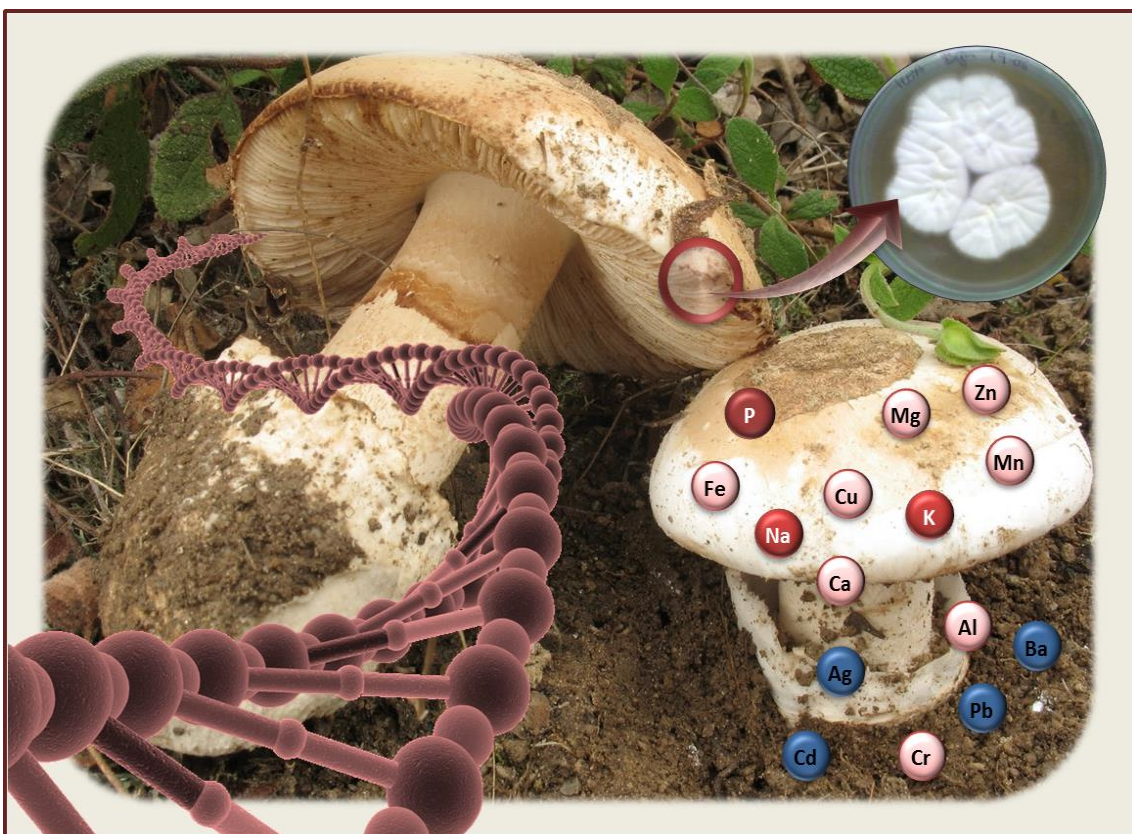
Estudos já realizados demonstraram que os polissacárido-péptidos de *G. lucidum* inibiram o crescimento de Sarcoma 180 em murganhos. O tratamento de murganhos saudáveis e murganhos com Sarcoma-180 com o polissacárido mostrou que houve um aumento, em ambos os casos, das citocinas TNF- α e IFN- γ (e respetivos níveis de mRNA e proteína). Além disso, aumentou significativamente a citotoxicidade dos linfócitos T e a atividade das células NK. No mesmo estudo observou-se ainda citotoxicidade em células tumorais humanas, com efeito apoptótico marcado, em concentrações de polissacárido superior a 10 mg mL⁻¹. Verificou-se que estes complexos têm atividade antitumoral e antiangiogénica e que a sua antiangiogénese poderá ser mais um mecanismo subjacente aos seus efeitos antitumorais (Wasser 2002; Zhang *et al.* 2007). Resumindo, estes polissacárido-péptidos estimulam as funções imunológicas do hospedeiro, aumentam a produção de citocinas tais como o IFN- γ e o IL-12 e estimulam a apoptose das células endoteliais (Wasser 2002).

Os polissacáridos de *Antrodia camphorata*, *Basidiomycetes* da família *Polyporaceae*, suprimiram o crescimento tumoral (do Sarcoma 180) em murganhos, quando administrados pelas vias intraperitoneal e oral. Para além disso, aumentaram a proliferação de células do baço e a sua atividade citotóxica, com aumento significativo dos níveis de IL-12 (Zhang *et al.* 2012a).

Noutros estudos, em que se avaliaram os efeitos antitumorais de glicanos, o *lentinan*, de *L. edodes*, aumenta a formação de linfócitos T nas células do baço e de macrófagos, ambos para a produção de citocinas, enquanto que o *schizophylan*, ativa os macrófagos, seguindo-se uma potenciação das células NK, por mediação de citocinas. A fração de polissacáridos de *A. blazei* apresentou atividade imunomoduladora quando injetada em murganhos e aumentou a concentração de linfócitos, de células T, NK e citocinas. O mesmo acontece com o PSK, de *C. versicolor*, que aumenta a ativação de células NK (Wasser 2002).

O mecanismo de proposto pelo qual os polissacáridos exercem o seu efeito antitumoral inclui: 1) prevenção dos oncogenes por administração oral dos polissacáridos isolados dos cogumelos medicinais (atividade preventiva), devido à atividade de imunopotenciação dos polissacáridos; 2) ativação e reforço da resposta imunitária contra os tumores (atividade de imuno-reforço); 3) atividade antitumoral direta por indução da apoptose das células tumorais (atividade de inibição tumoral) (Wasser 2002; Zhang *et al.* 2007).

Caracterização inorgânica, isolamento e análise molecular de estirpes de *A. ponderosa*



2.1 Introdução

A procura de cogumelos silvestres comestíveis para comercialização tem-se revelado um negócio amplamente em expansão e de crescente importância económica em muitas áreas rurais de alguns países. Nos últimos anos, o consumo de cogumelos comestíveis vem aumentando e ganhando destaque em virtude das suas potencialidades gastronómicas, quer pelas suas propriedades organolépticas, (textura e agradável aroma) (Agrahar-Murugkar & Subbulakshmi 2005; De Pinho *et al.* 2008; Guillamón *et al.* 2010; Zawirska-wojtasiak *et al.* 2009), quer pela sua composição química, conteúdo mineral e valor nutricional (Beluhan & Ranogajec 2011; Guillamón *et al.* 2010; Ouzouni *et al.* 2007; Reis *et al.* 2012a; Vetter 2005).

Os cogumelos contêm níveis elevados de proteínas, fibras dietéticas que auxiliam na digestão, baixos níveis de açúcar e gorduras, contêm as vitaminas E, B, C e D, assim como elevado conteúdo em elementos minerais, macro ou oligoelementos essenciais, como o cálcio, fósforo, ferro, potássio, selénio, cádmio, entre outros. Estes elementos minerais são na maioria elementos essenciais ao bom funcionamento do organismo, embora alguns possam apresentar toxicidade quando ingeridos em doses elevadas (Borovicka & Randa 2007; Borovicka *et al.* 2007; Chudzynski & Falandysz 2008; Ouzouni *et al.* 2007; Vetter 2005). No entanto, devido à relação de simbiose que muitos destes cogumelos estabelecem com as plantas nos *habitats* em que se encontram, podem acumular concentrações elevadas de alguns elementos, podendo ser metais pesados não essenciais, nomeadamente chumbo, cádmio e alumínio, sendo por isso importante conhecer a sua composição (Kalac 2010; Vetter 2005). Por esta razão, as variações da composição mineral e orgânica dos cogumelos comestíveis está dependente da espécie e das características dos ecossistemas em que estes se encontram inseridos (Chudzynski & Falandysz 2008; Genççelep *et al.* 2009). Por outro lado, a semelhança entre algumas espécies e o desconhecimento de outras pode levar a problemas de intoxicações com a colheita de espécies silvestres,

levando em alguns casos à morte, designadamente nos cogumelos do género *Amanita*. Desta forma, pela existência de algumas espécies altamente tóxicas e de outras que podem acumular elevado conteúdo de metais pesados, o seu consumo accidental pode ser bastante perigoso para a saúde humana, tornando-se de extrema importância a caracterização química e molecular de espécies de cogumelos silvestres comestíveis para fins de certificação (Salvador *et al.* 2013c).

Por outro lado, devido à grande diversidade de espécies, torna-se essencial poder caracterizar e diferenciar o máximo de espécies possíveis, de um modo rápido e fiável, pelo que, nos últimos anos, têm sido descritas algumas técnicas moleculares para a avaliação de perfis genéticos de alguns cogumelos (Caldeira *et al.* 2009; Moreno *et al.* 2008; Ro *et al.* 2007). O perfil genético e análise de sequências polimórficas constituem importantes ferramentas para uma caracterização efetiva e rápida, nomeadamente no processo de certificação de cogumelos silvestres. Várias ferramentas moleculares têm sido introduzidas para classificação de espécies fúngicas, tais como a sequenciação de genes de rRNA e/ou flanqueamento das regiões ITS (*internal transcribed spacer*) (Flórez *et al.* 2007), e as análises de polimorfismo, RAPD (*random amplified polymorphic DNA*), AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) e RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) (Kure *et al.* 2002). A literatura refere várias abordagens moleculares baseadas em técnicas de RAPD e análise do ITS com vista à caracterização e identificação de cogumelos comestíveis (Firenzuoli *et al.* 2007; González *et al.* 2002; Ro *et al.* 2007). Embora a maioria dos estudos moleculares sejam atualmente efetuados pela análise de sequências de rDNA, a técnica de ITS-ARDRA (*amplified ribosomal DNA restriction analysis of internal transcribed spacers*) tem sido muitas vezes aplicada ao estudo das relações fenotípicas em vários géneros de fungos (Alves *et al.* 2007; González *et al.* 2002), embora pareça não resultar relativamente à discriminação de variações entre estirpes da mesma espécie (González *et al.* 2002).

As técnicas de *fingerprinting* baseadas na amplificação do DNA por PCR (*polymerase chain reaction*), tais como RAPD e AFLP, são bastante informativas e económicas e permitem avaliar a diversidade genética de uma ampla gama de organismos sem requerer de qualquer conhecimento prévio dos genomas das espécies (Badfar-Chaleshtori *et al.* 2012). Recentemente as análises do perfil genético de estirpes fúngicas mostraram que técnicas de *fingerprinting* apresentam maior capacidade discriminatória do que os métodos baseados na sequenciação de genes do rRNA, permitindo distinguir estirpes da mesma espécie (Ro *et al.* 2007). A técnica de RAPD é uma das mais frequentemente aplicadas e suporta a deteção de polimorfismo em muitos *loci* no genoma total, sendo que as principais vantagens do RAPD incluem o uso de pequenas quantidades de DNA e simplicidade de execução (Przyborowski & Sulima 2010). Vários estudos de análise RAPD referem esta técnica como sendo uma ferramenta fácil, rápida e confiável para a caracterização de cogumelos comestíveis (Badfar-Chaleshtori *et al.* 2012; Ro *et al.* 2007). No entanto, esta técnica pode ser pouco vantajosa, uma vez que, apresenta a necessidade de se estudar vários *primers*, é muito sensível a variáveis experimentais devido às baixas condições de restringência e ao facto do *primer* se poder ligar a vários locais, pelo que, nem sempre se observa reprodutibilidade nos resultados obtidos (Griffiths *et al.* 2000). A técnica *fingerprinting* utilizando minissatélites específicos é baseado na amplificação do DNA por PCR recorrendo a apenas um *primer*, como é o caso da sequência nucleotídica do fago M13 (Kure *et al.* 2002). A sequência do fago M13 tem sido utilizada como *primer* e como sonda de hibridação de forma a permitir a distinção entre estirpes da mesma espécie fúngica (Alves *et al.* 2007; Caldeira *et al.* 2009; Kure *et al.* 2002). Desta forma, neste estudo recorreu-se à técnica de M13-PCR (*microsatellite-primed PCR*), pois esta apresenta a vantagem de uma elevada reprodutibilidade relativamente ao RAPD, que resulta da elevada restringência a que decorre a reação de PCR porque o *primer* é dirigido para sequências específicas.

O género *Amanita* é um dos mais conhecidos e característicos da Ordem *Agaricales* e compreende cogumelos comestíveis e venenosos que estão distribuídos por todo o mundo, ocupando principalmente um *habitat* micorrízico e desempenham um papel significativo nos ecossistemas florestais (González *et al.* 2002; Moreno *et al.* 2008). Este género inclui importantes espécies de cogumelos comestíveis, como é o caso da espécie *A. ponderosa* (Caldeira *et al.* 2008; Caldeira *et al.* 2009; Martins *et al.* 2010; Moreno *et al.* 2008; Salvador *et al.* 2013b; Salvador *et al.* 2013c). O sul de Portugal, pelas suas características mediterrânicas e diversidade de flora é uma das regiões da Europa com uma maior predominância de cogumelos silvestres comestíveis da espécie *A. ponderosa*. Gastronomicamente, esta espécie é muito relevante, devido não só ao tradicional consumo nas populações rurais, como ao seu valor comercial nos mercados *gourmet*. Existem poucos estudos acerca desta espécie, uma vez que estes fungos micorrízicos apresentam elevadas dificuldades no seu processo de isolamento, o que poderá também ser influenciado pelo seu crescimento lento e pela presença de diferentes estirpes de fungos contaminantes que apresentam cinética de crescimento mais elevada.

Assim, neste estudo, para além da caracterização mineral das várias amostras recolhidas em diferentes locais, efetuou-se uma caracterização do perfil genético e das estirpes fúngicas que vivem em associação no seu *habitat* natural, isoladas durante a obtenção de culturas puras de *A. ponderosa*. Esta abordagem de M13-PCR pretende permitir o desenvolvimento de metodologias metagenómicas que podem ser aplicadas a processos de certificação.

2.2 Metodologia

2.2.1 Amostras

Os corpos de frutificação de *A. ponderosa* foram recolhidos durante a primavera (fevereiro - abril) de 2010 em diferentes locais no sudoeste da Península Ibérica, nomeadamente nas regiões do Alentejo (Portugal) e de Andaluzia e Extremadura (Espanha). Estes cogumelos cresceram em solos ácidos em áreas florestais de montado de *Quercus suber* (Figura 2.1 (a)), *Q. ilex* ssp. *ballota*, *Cistus ladanifer* (Figura 2.1 (b)) e *C. laurifolius*. Todas as amostras foram preparadas com cogumelos da mesma fase de crescimento à data da colheita (Figura 2.1 (c)). Na (Tabela 2.1) estão descritos os 24 locais onde foi efetuada a colheita dos corpos de frutificação e amostras de solo envolvente.

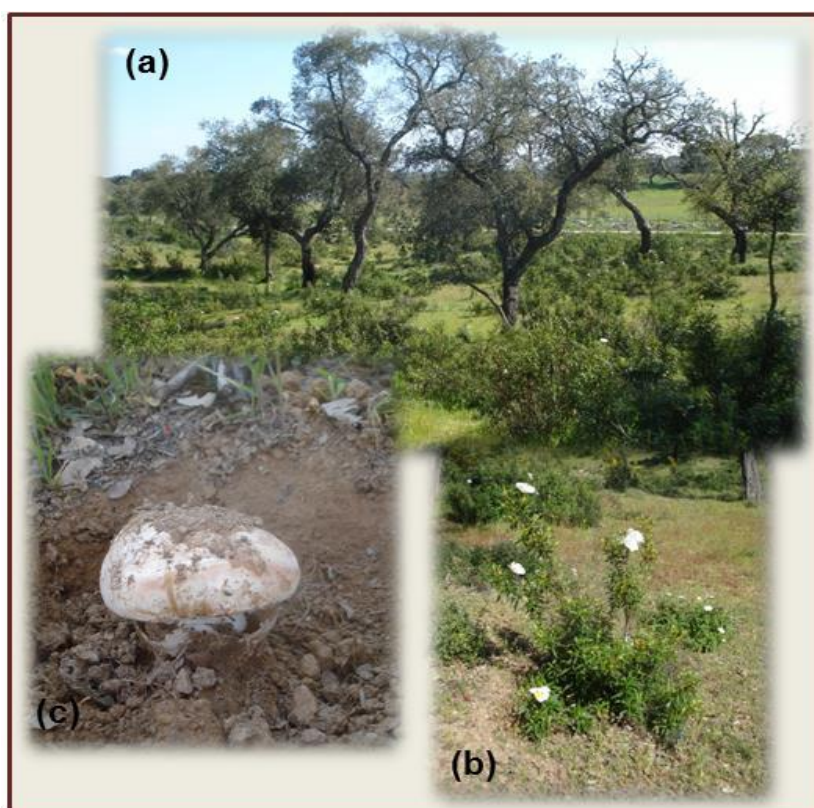


Figura 2.1. Local de colheita da amostra de *A. ponderosa* da área florestal de montado da região de Évora, com exibição da vegetação envolvente de *Quercus suber* (a), *Cistus ladanifer* (b) e amostra de corpo de frutificação recolhido neste local (c).

Tabela 2.1. Descrição dos locais de colheita das amostras de *A. ponderosa* e solos.

| Locais de colheita | Coordenadas geográficas | Concelho/ Distrito | Região/ País |
|---------------------------------------|-------------------------|--------------------|--------------------------|
| Almendres | 38°33'57"N 8°02'40"O | Évora, Évora | Alto Alentejo, Portugal |
| Azaruja | 38°42'10"N 7°45'58"O | Évora, Évora | Alto Alentejo, Portugal |
| Baleizão | 38°01'34"N 7°42'38"O | Beja, Beja | Baixo Alentejo, Portugal |
| Beja | 38°02'44"N 7°50'56"O | Beja, Beja | Baixo Alentejo, Portugal |
| Cabeça Gorda | 37°55'19"N 7°48'47"O | Beja, Beja | Baixo Alentejo, Portugal |
| Cabezas Rubias | 37°43'50"N 7°05'11"O | Huelva, Huelva | Andaluzia, Espanha |
| Évora | 38°35'01"N 7°51'46"O | Évora, Évora | Alto Alentejo, Portugal |
| Evoramonte | 38°46'22"N 7°42'45"O | Estremoz, Évora | Alto Alentejo, Portugal |
| Her ^{de} da Mitra | 38°31'35"N 8°00'51"O | Évora, Évora | Alto Alentejo, Portugal |
| Mértola | 37°37'44"N 7°39'30"O | Mértola, Beja | Baixo Alentejo, Portugal |
| Mina S. Domingos | 37°41'02"N 7°28'49"O | Mértola, Beja | Baixo Alentejo, Portugal |
| M ^{te} da Borralha | 37°58'31"N 7°37'22"O | Serpa, Beja | Baixo Alentejo, Portugal |
| M ^{te} Novo | 38°30'39"N 7°43'06"O | Évora, Évora | Alto Alentejo, Portugal |
| Montejuntos | 38°32'24"N 7°19'49"O | Alandroal, Évora | Alto Alentejo, Portugal |
| N. S ^{ra} Guadalupe | 38°33'47"N 8°01'23"O | Évora, Évora | Alto Alentejo, Portugal |
| N. S ^{ra} Machede | 38°35'21"N 7°48'19"O | Évora, Évora | Alto Alentejo, Portugal |
| Rosal de la Frontera | 37°57'21"N 7°13'12"O | Huelva, Huelva | Andaluzia, Espanha |
| S ^{to} Aleixo da Restauração | 38°04'01"N 7°09'46"O | Moura, Beja | Baixo Alentejo, Portugal |
| S. Miguel de Machede | 38°37'34"N 7°42'33"O | Évora, Évora | Alto Alentejo, Portugal |
| Serpa | 37°55'59"N 7°35'05"O | Serpa, Beja | Baixo Alentejo, Portugal |
| V ^e Rocins | 37°52'15"N 7°44'41"O | Salvada, Beja | Baixo Alentejo, Portugal |
| Valverde | 38°32'24"N 8°01'18"O | Évora, Évora | Alto Alentejo, Portugal |
| V. N. S. Bento | 37°56'27"N 7°23'51"O | Serpa, Beja | Baixo Alentejo, Portugal |
| Villanueva del Fresno | 38°22'49"N 7°11'35"O | Badajoz | Extremadura, Espanha |

Os corpos de frutificação foram pesados, lavados e preparadas amostras representativas de cada local que foram catalogadas, armazenadas em sacos estéreis, e preservadas a 4°C e -20°C, para utilização no processo de isolamento das estirpes e posterior análise. As amostras de corpos de frutificação foram depositadas no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Química da Universidade de Évora.

Para o estudo molecular, as amostras de *A. ponderosa*, recolhidas em: Azaruja, Beja, Évora, Evoramonte, Guadalupe, Mértola, S^{to} Aleixo da Restauração (Alentejo,

Portugal) e Cabezas Rubias (Andaluzia, Espanha), foram comparadas com estirpes fúngicas isoladas que vivem em associação com esta espécie de cogumelo no seu *habitat* natural. As amostras de *A. ponderosa* foram também comparadas com quatro espécies de *Basidiomycetes* cultivados, *Coriolus versicolor*, *Lactarius deliciosus*, *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes*, e o *Ascomycete* *Terfezia arenaria* (trufa), que crescem no mesmo ambiente florestal.

As culturas puras de *A. ponderosa* isoladas dos corpos de frutificação foram catalogados consoante o local de colheita, e juntamente com os restantes isolados fúngicos identificados, foram mantidas a 4°C, em meio PDA (Anexo A, Tabela A.3) e depositadas no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Química da Universidade de Évora, sendo reinoculadas periodicamente.

2.2.2 Determinação da composição mineral

A composição mineral foi determinada nas amostras de *A. ponderosa* recolhidas nos 24 locais diferentes descritos e nas respetivas amostras de solo, sendo necessário recorrer a diferentes técnicas analíticas: como a espectrometria de absorção molecular UV-Vis, a espectrometria de absorção atómica de chama (FAAS – *flame atomic absorption spectrometry*) e a fotometria de chama de emissão (FEP – *flame emission photometry*).

2.2.2.1 Tratamento das amostras de corpos de frutificação

A análise da composição mineral foi efetuada pelo método de mineralização seca (Moreno-Rojas *et al.* 2004). As amostras de corpos de frutificação frescos (25 g) foram sujeita a um processo de secagem, em estufa a 100°C, até peso constante (48 h) (Figura 2.2 (a)). Após arrefecimento as amostras secas foram homogeneizadas com o auxílio de um almofariz e transferidas para cadinhos de porcelana, os quais foram colocados numa mufla (*Termolab*) a 460°C durante 14 h (Figura 2.2 (b)), para

carbonização total das amostras (Figura 2.2 (c)). Procedeu-se ao branqueamento das cinzas, após o seu arrefecimento, adicionando-se ácido nítrico (HNO_3) 2 M e promovendo a secagem das amostras na mufla a 460°C durante 1 h (Figura 2.2 (d)). As cinzas branqueadas foram então recuperadas com ácido nítrico 0,1 M e armazenadas a 4°C até à sua quantificação.

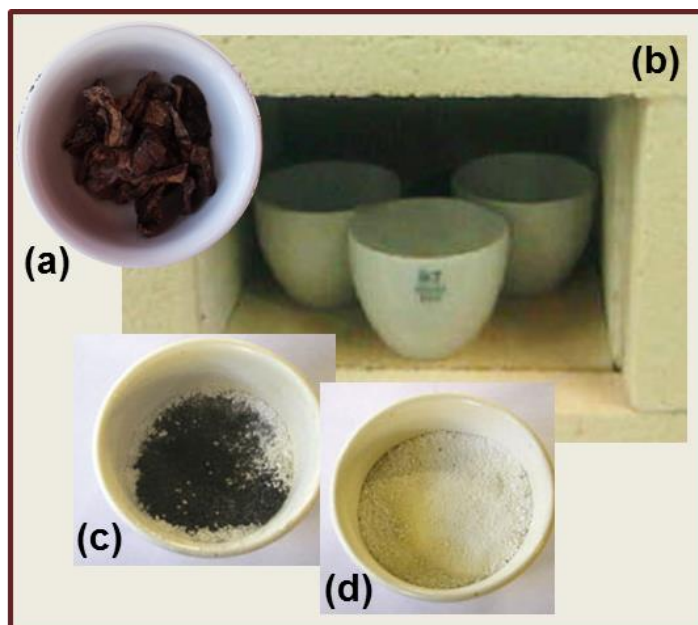


Figura 2.2. Amostras de corpos de frutificação de *A. ponderosa* após secagem em estufa a 100°C (a), carbonização das amostras secas em mufla (b), cinzas obtidas após a carbonização das amostras (c) e cinzas após branqueamento com ácido nítrico 2 M (d).

2.2.2.2 Tratamento das amostras de solo

As amostras de solo, recolhidas nos locais de colheita dos corpos de frutificação, após remoção de pequenas pedras ou folhas secas, foram deixadas a secar à temperatura ambiente 1–2 semanas (Figura 2.3 (a)) e, posteriormente, crivadas com o auxílio de crivos de 2 mm de poro (Figura 2.3 (b)).

Para análise do conteúdo mineral, as amostras de solo (5 g) foram tratadas com uma solução extratante de ácido nítrico (HNO_3) a 25% (40 mL) (Figura 2.3 (c)), e colocadas sob agitação durante 24 h à temperatura ambiente. Os extratos obtidos foram filtrados com papel *Whatman* nº42 (Figura 2.3 (d)) e armazenados a 4°C até à sua quantificação (Chudzynski & Falandysz 2008).

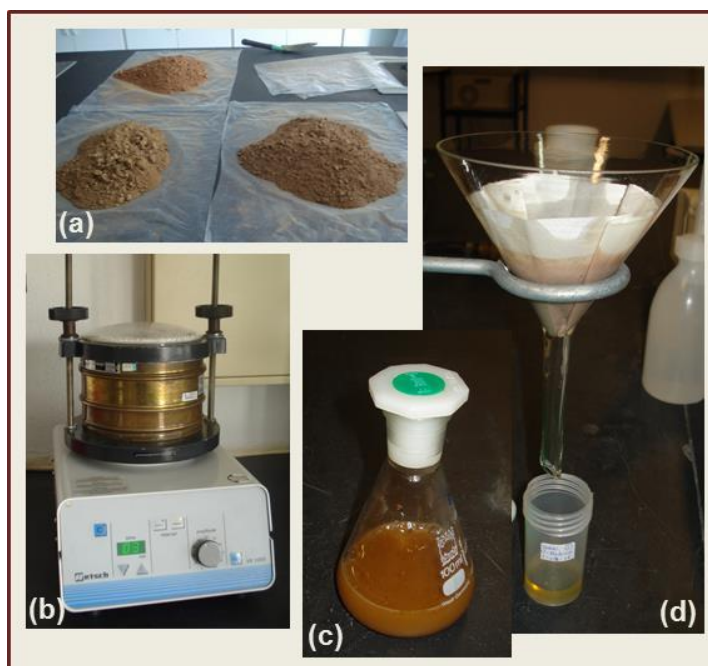


Figura 2.3. Processo de tratamento das amostras de solo: secagem (a), crivagem (b), extração (c) e filtração do extrato final (d).

2.2.2.3 Determinação do conteúdo mineral das amostras de corpos de frutificação e solo

Para avaliação do conteúdo mineral das amostras de cogumelos e de solo, procedeu-se à quantificação dos minerais alumínio (Al), bário (Ba), cálcio (Ca), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), crómio (Cr), Ferro (Fe), magnésio (Mg), manganês (Mn), prata (Ag) e zinco (Zn) por espectrometria de absorção atômica de chama (*Perkin-Elmer model 3100*) com atomização em chama ar-acetileno, lâmpadas de cátodo oco de elemento único e correção de *background* com lâmpada de deutério para o elemento Mn. Os elementos potássio (K) e sódio (Na) foram quantificados por fotometria de chama de emissão (*Jenway model PFP7 flame emission photometer*). O fósforo (P) foi quantificado pelo método colorimétrico do ácido vanadomolibdo fosfórico (*Standart Methods*, (AOAC 1991)) utilizando um espectrofotómetro UV-Vis (*Hitachi, U-3010 model*) (Fernandes *et al.* 1997; Okumura *et al.* 2004).

2.2.3 Isolamento, identificação e cultura de culturas puras

As culturas primárias foram efetuadas através das amostras de corpos de frutificação jovens, pela remoção de pequenos fragmentos da parte interior do chapéu dos cogumelos (Figura 2.4 (a)). Os fragmentos de tecido (1–2 mm), recolhidos sob condições assépticas, foram colocados em placas de *Petri* (diâmetro 5,5 cm), contendo meio de *Melin-Norkans* modificado (MMN – *modified Melin-Norkans medium*) (Anexo A, Tabela A.1) ou meio de *Hagen* modificado (Anexo A, tabela A.2) (Ragonezi *et al.* 2013). As culturas foram incubadas no escuro a 25°C durante 40 dias. Durante este período, as culturas foram seguidas, tendo-se observado o crescimento e o aspeto morfológico das diferentes colónias (Figura 2.4 (b)). Isolaram-se colónias puras de *A. ponderosa* (Figura 2.4 (c)), bem como também as do microbiota predominante associada a estes fungos micorrízicos (Figura 2.4 (d)). Os isolados foram transferidos para placas de *Petri* contendo meio *potato dextrose agar* (PDA) (Anexo A, Tabela A.3) e incubados a 25°C até ao desenvolvimento das colónias.

Após isolamento, os micélios foram cultivados em tubos contendo PDA e preservados, após crescimento, a 4°C (Cheng *et al.* 2008).

A identificação das estirpes fúngicas foi realizada por métodos clássicos, com cultura dos isolados puros em placa de *Petri* contendo PDA e *malte extract agar* (MEA) (Anexo A, Tabela A.4), e observação das características macro e micromorfológicas, tais como o diâmetro da colónia, textura, cor, dimensões e morfologia das hifas e estruturas reprodutoras (Domsch *et al.* 1980).

As características microscópicas das culturas foram observadas por microscopia óptica (*model DM2500P; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany*) acoplada a uma câmara de resolução (*model DFC290HD; Leica Microsystems*). As preparações microscópicas foram coradas com azul de lactofenol de forma a permitir a observação dos micélios dos isolados. A análise morfológica dos isolados teve como objetivo proceder à sua identificação ao nível do género (Zhang *et al.* 2005). As culturas em

que não se observou a formação de estruturas reprodutoras e de esporos, após o período de incubação, foram designadas de micélios estéreis.

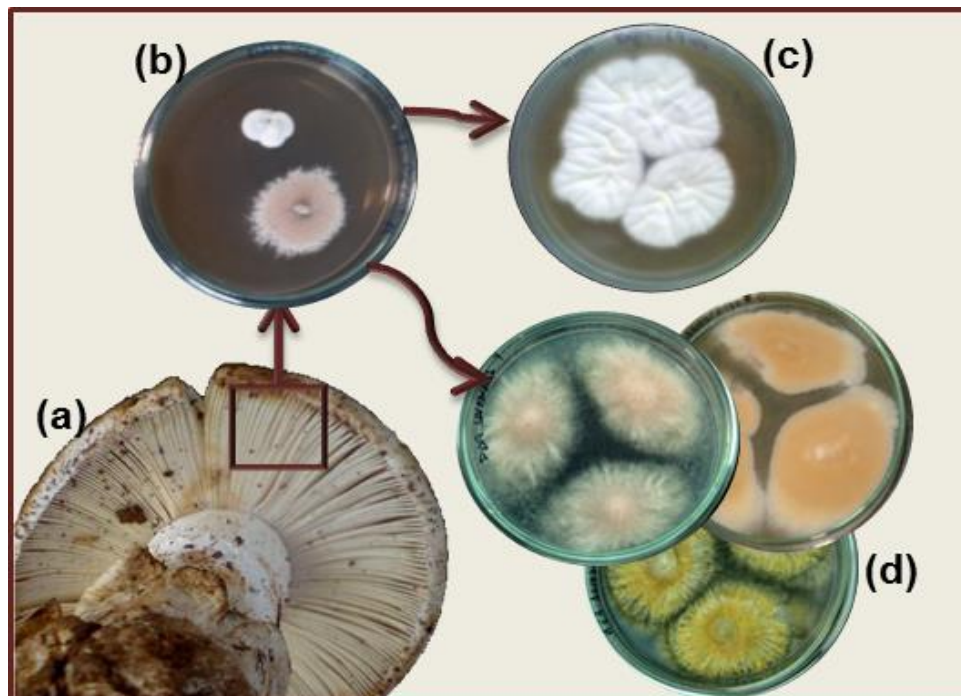


Figura 2.4. Isolamento das estirpes da *A. ponderosa* em meio de cultura sólido: corpo de frutificação de *A. ponderosa* (a), inoculação das amostras de *A. ponderosa* (b) culturas puras de *A. ponderosa* (c) e culturas puras de estirpes fúngicas que vivem em associação com *A. ponderosa* (d).

2.2.4 Análise molecular das estirpes isoladas

Para os estudos de caracterização molecular selecionaram-se 12 amostras de cogumelos do grupo dos *Basidiomycetes*: 10 amostras de *A. ponderosa*, *C. versicolor*, *L. deliciosus*, *L. edodes* e *P. ostreatus*, 1 do grupo dos *Ascomycetes*, *T. arenaria* e ainda as estirpes fúngicas isoladas que vivem no mesmo *habitat* de *A. ponderosa*.

Procedeu-se à amplificação do DNA extraído através do método M13-PCR, técnica de *fingerprinting* muito utilizada para a caracterização de estirpes fúngicas.

2.2.4.1 Extração do DNA – Método das microesferas adaptado

O DNA genómico foi extraído de pequenos fragmentos dos corpos de frutificação de *A. ponderosa* e de micélios das estirpes isoladas, sendo utilizado o método das microesferas adaptado (Caldeira *et al.* 2009; Martins 2004; Sambrook *et al.* 1989)

Efetuar-se-iam culturas das estirpes de *A. ponderosa* e das estirpes fúngicas isoladas em meio de PDA, durante 5 dias a 25°C. De modo a promover a lise celular ressuspendeu-se o micélio em solução tampão de lise (Tris-HCl – 50 mM, NaCl – 250 mM, EDTA – 50 mM, SDS – 0,3%, pH 8) com a adição de microesferas (425 – 600 diâmetro). Após agitação (em ciclos de 30 s gelo/vórtex) a suspensão foi colocada a incubar a 65°C durante 90 min. O sobrenadante da suspensão foi obtido por centrifugação a 14.000 rpm durante 10 min a 4°C. Foi adicionado ao sobrenadante a solução tampão de extração TE (Tris – 10 mM, EDTA – 1 mM, pH 8) com RNase (100 µg mL⁻¹ e colocado a incubar a 37°C, durante 30 min, de modo a promover a solubilização dos ácidos nucleicos. Após este período de incubação foi adicionado à mistura uma solução de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), promovendo a mistura de fases por inversão. Efetuou-se uma centrifugação a 10.000 rpm durante 10 min e adicionou-se tampão acetato de sódio 3 M (pH 5,2) frio, na proporção de 1/10 do volume de sobrenadante. De forma a promover a precipitação do DNA adicionou-se de seguida 2,5 volumes de etanol absoluto frio (-20 °C) (Figura 2.5).

O sedimento de DNA foi obtido por centrifugação a 13.000 rpm durante 15 min e foi, posteriormente, lavado com etanol a 70% (v/v), tendo sido adicionado lentamente junto à parede do microtubo de forma a não danificar a amostra de DNA. Realizou-se uma centrifugação a 10.000 rpm (10 min), desprezou-se o sobrenadante e o sedimento de DNA obtido foi então colocado na estufa a secar à temperatura de 37°C, durante 5 a 10 min, para a evaporação de vestígios de etanol. Posteriormente, procedeu-se à solubilização dos ácidos nucleicos com solução tampão TE e armazenamento das amostras a 4°C.



Figura 2.5. Obtenção do DNA fúngico extraído após precipitação com etanol.

2.2.4.2 Quantificação do DNA

As amostras de DNA obtidas foram quantificadas por espectrofotometria UV–Vis utilizando um espectrofotômetro *NanoDrop 2000c* (*NanoDrop Technologies*, Wilmington, DE). A concentração de DNA e o grau de pureza foram determinados pela quantificação da densidade óptica (OD – *optical density*) a 260 nm e pelo cálculo da razão de OD 260 nm/280 nm, respetivamente.

2.2.4.3 Amplificação do DNA por M13-PCR

A técnica de PCR (*polymerase chain reaction*) consiste na utilização de Taq polimerase, um enzima termoestável isolada a partir de uma bactéria termofílica *Thermus aquaticus*, e de pequenos segmentos de DNA, oligonucleótidos chamados *primers*, para iniciar a síntese direta de um segmento alvo específico do DNA. A síntese é repetida várias vezes, chamados ciclos, permitindo que os produtos de uma síntese prévia sirvam como base para o próximo ciclo, resultando numa ampliação exponencial da região alvo do DNA.

A amplificação das amostras de DNA foi efetuada por M13-PCR tendo sido utilizado como oligonucleótido iniciador (*primer*) uma sequência do fago M13 com 15 pares de bases, que apresenta a seguinte sequência nucleotídica: 5'- GAG GGT GGC GGT TCT - 3' (Martins 2004).

Na reação amplificação, 1 μL de DNA (25 ng) extraído de cada uma das estirpes fúngicas foi incubado com uma mistura reacional constituída por: 2,5 μL tampão da Taq polimerase (concentrado 10X), 2,5 μL de MgCl_2 25 mM, 2,5 μL da mistura de dNTPs 2 mM, 1 μL do *primer* M13 2 μM (*Invitrogen*, Carlsbad, CA) e 1 Unidade de Taq DNA polimerase (*Fermentas*, *Thermo Fisher*, Vilnius, Lituânia), e água ultrapura esterilizada para um volume total de 25 μL .

As reações foram efetuadas num termociclador *Mastercycler* (*Eppendorf*, Hamburgo, Alemanha). As condições de amplificação do M13-PCR consistiram num período de desnaturação inicial de 5 min a 94°C, passando de seguida à amplificação efetuando 40 ciclos com a seguinte estrutura:

desnaturaçã – 1 min a 94°C
emparelhamento – 1 min a 50°C
extensão – 2 min a 72°C

e finalizando-se com um período de extensão a 72°C durante 5 min, seguido de arrefecimento e preservação a 4°C.

Os produtos de PCR foram separados eletroforéticamente em gel de agarose a 1,5% (p/v) em tampão TBE (tris borato–EDTA) 0,5X concentrado (Anexo B, B.3), contendo 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de brometo de etídio, para posterior visualização do DNA amplificado.

Foram aplicados, no gel de agarose, 8 μL do produto de PCR juntamente com 2 μL de corante concentrado 6X (Anexo B, B.4). Em cada execução foi incluído um controlo negativo (sem amostra de DNA) e como marcador de massas moleculares utilizou-se o padrão de DNA 100 bp Plus (*Fermentas*) com a concentração de 0,5 mg DNA mL^{-1} , o qual foi aplicado 1 μL do marcador diluído com 9 μL de corante concentrado 1X (Anexo B, B.5) em cada poço das extremidades do gel. O gel foi submetido a uma voltagem de 90 V durante 2 h e após este período foi visualizado a 366 nm, utilizando um transiluminador UV (*Bio-Rad*) acoplado ao *software* *Quantity One 1-D Analysis* (*Bio-Rad*), para a obtenção e tratamento de imagem.

2.2.4.4 Amplificação de sequenciação da região ITS

A região contendo porções parciais da subunidade pequena (18S), foi amplificada ambas as unidade repetidas ITS e o 5.8S do rDNA, utilizando os *primers* oligonucleotídeos ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Gardes & Bruns 1993). As reações de PCR foram realizadas num termociclador *Mastercycler* (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e as condições de amplificação consistiram num ciclo de desnaturação inicial de 3 min a 95°C, passando de seguida à amplificação efetuando 30 ciclos de 30 s a 92°C, 30 s a 55°C e 1 min a 72 °C, com uma extensão final durante 10 min a 72 °C. Os produtos PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose, (1%) purificados com o kit de *NucleoSpin Extract II kit* (Macherey–Nagel, Dueren, Germany) e sequenciados por eletroforese capilar usando o sequenciador *ABI PRISM 3730 XL* (Applied Biosystems, Foster City, CA) com o kit BDT v1.1v (Applied Biosystems). Esta abordagem foi realizada para cogumelos da espécie *A. ponderosa* e as sequências foram alinhadas com as de espécies fúngicas relacionadas depositadas no *GenBank* [National Center for Biotechnology Information (NCBI) databases].

2.2.5 Análise estatística

A análise inorgânica os conteúdos em água, matéria orgânica e minerais, assim como o conteúdo de cada mineral presente nas amostras de corpos de frutificação e solos dos diferentes locais, foram avaliados estatisticamente utilizando o *software SPSS® 21.0 para Windows Copyright®* (Microsoft Corporation), recorrendo a parâmetros de análise descritiva, como valores médios \pm desvio padrão (SD), e análise de variância (ANOVA *One-way*). A homogeneidade das variâncias foi confirmada pelo teste de *Levene*. E a comparação múltipla de médias foram avaliadas pelo teste de *Tukey*. O nível de significância foi estabelecido a $p < 0,05$ (nível de confiança estatístico de 95%).

As sequências de nucleótidos da região ITS foram alinhadas com espécies de fungos relacionados obtidos na base de dados *GenBank* (NCBI) para a análise de homologia, usando o programa BLASTN 2.2.25+.

Para as análises de M13-PCR, os dendogramas foram gerados pelo método de agrupamento não ponderado de pares com média aritmética (UPGMA-*unweighted pair group method with arithmetic average*) através da aplicação do coeficiente de similaridade de Dice, utilizando o software *Quantity One 1-D Analysis* (Bio-Rad), baseado nos perfis de *fingerprinting* de estirpes de *A. ponderosa* e outras espécies de *Basidiomycetes*, *Ascomycetes* e *Zygomycetes*.

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Análise da composição mineral presente nos corpos de frutificação

Foi estudada inicialmente a composição mineral das amostras de cogumelos *A. ponderosa*, recolhidos em 24 locais das regiões do Alentejo (Portugal), de Andaluzia e da Extremadura (Espanha).

Na Tabela 2.2 são apresentados os conteúdos em água, matéria orgânica e minerais presentes nas amostras de *A. ponderosa* recolhidas nos diferentes locais. A percentagem de água das amostras variou entre $89,5 \pm 0,0$ e $93,8 \pm 0,5\%$, (Tabela 2.2) distinguindo-se entre as amostras estudadas as recolhidas nos Almendres e em Serpa que apresentaram valores significativamente superiores de percentagem de água comparativamente às restantes amostras, enquanto a amostra da Mina de S. Domingos apresentou um conteúdo de água significativamente mais baixo do que as restantes amostras.

Os valores de massa seca foram muito semelhantes para as várias amostras, variando entre $6,2 \pm 0,5$ e $10,5 \pm 0,1\%$, com percentagens de matéria orgânica entre $5,8 \pm 0,3$ a $9,8 \pm 0,1\%$ e de minerais entre $0,5 \pm 0,0$ a $1,4 \pm 0,1\%$ (Tabela 2.2). Pela análise de variância (ANOVA-*One way*) (Anexo J.I, Tabelas J.I.1 e J.I.2), observou-se que as amostras recolhidas nos Almendres e Serpa apresentaram valores de matéria orgânica significativamente inferiores, tendo a amostra recolhida na Mina de S. Domingos apresentado um conteúdo em matéria orgânica significativamente superior às restantes. O conteúdo mineral dos corpos de frutificação colhidos em Cabezas Rubias foi de $1,4 \pm 0,1\%$, valor significativamente superior ao observado para as restantes amostras, tendo, no entanto, as amostras de Serpa e Villanueva del Fresno apresentado os valores mais baixos ($0,5 \pm 0,0$ e $0,5 \pm 0,1\%$, respetivamente) significativamente diferentes dos restantes.

Tabela 2.2. Conteúdos em água, matéria orgânica, e minerais presentes nos corpos de frutificação das amostras de *A. ponderosa* recolhidos nos diferentes locais.

| Corpos de frutificação Locais de colheita | Composição | | |
|--|---------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| | Água (%) | Matéria orgânica (%) | Minerais (%) |
| Almendres | 93,6 ± 0,3 ^a | 5,8 ± 0,3 ^a | 0,6 ± 0,1 ^{a,b,c} |
| Azaruja | 92,4 ± 0,5 ^{a,b,c,d} | 6,7 ± 0,5 ^{a,b,c} | 0,9 ± 0,0 ^{b,c} |
| Baleizão | 90,7 ± 0,3 ^{b,c,d,e} | 8,6 ± 0,4 ^{b,c,d} | 0,7 ± 0,1 ^{a,b,c} |
| Beja | 91,0 ± 0,0 ^{a,b,c,d,e} | 8,4 ± 0,1 ^{a,b,c,d} | 0,6 ± 0,0 ^{a,b,c} |
| Cabeça Gorda | 91,6 ± 0,7 ^{a,b,c,d,e} | 7,8 ± 0,7 ^{a,b,c,d} | 0,5 ± 0,0 ^{a,b} |
| Cabezas Rubias | 91,8 ± 0,4 ^{a,b,c,d,e} | 6,8 ± 0,1 ^{a,b,c} | 1,4 ± 0,1 ^d |
| Évora | 90,2 ± 1,6 ^{c,d,e} | 9,2 ± 1,4 ^{c,d} | 0,7 ± 0,2 ^{a,b,c} |
| Evoramonte | 90,4 ± 0,4 ^{b,c,d,e} | 8,8 ± 0,7 ^{b,c,d} | 0,8 ± 0,3 ^{a,b,c} |
| Her ^{de} da Mitra | 90,5 ± 0,3 ^{b,c,d,e} | 8,9 ± 0,3 ^{c,d} | 0,6 ± 0,1 ^{a,b,c} |
| Mértola | 93,2 ± 0,3 ^{a,b} | 6,0 ± 0,3 ^{a,b} | 0,8 ± 0,1 ^{a,b,c} |
| Mina S. Domingos | 89,5 ± 0,0 ^e | 9,8 ± 0,1 ^d | 0,8 ± 0,1 ^{a,b,c} |
| M ^{te} da Borralha | 91,5 ± 1,5 ^{a,b,c,d,e} | 7,8 ± 1,5 ^{a,b,c,d} | 0,7 ± 0,1 ^{a,b,c} |
| M ^{te} Novo | 91,7 ± 1,2 ^{a,b,c,d,e} | 7,6 ± 1,1 ^{a,b,c,d} | 0,7 ± 0,1 ^{a,b,c} |
| Montejuntos | 92,7 ± 0,4 ^{a,b,c,d} | 6,7 ± 0,4 ^{a,b,c} | 0,5 ± 0,1 ^{a,b} |
| N. S ^{ra} Guadalupe | 91,4 ± 1,1 ^{a,b,c,d,e} | 7,9 ± 1,3 ^{a,b,c,d} | 0,7 ± 0,2 ^{a,b,c} |
| N. S ^{ra} Machede | 91,4 ± 1,5 ^{a,b,c,d,e} | 8,0 ± 1,4 ^{a,b,c,d} | 0,7 ± 0,2 ^{a,b,c} |
| Rosal de la Frontera | 90,4 ± 1,7 ^{b,c,d,e} | 8,8 ± 1,6 ^{b,c,d} | 0,8 ± 0,1 ^{a,b,c} |
| S ^{to} Aleixo da Restauração | 91,1 ± 1,1 ^{a,b,c,d,e} | 8,1 ± 1,1 ^{a,b,c,d} | 0,8 ± 0,1 ^{a,b,c} |
| S. Miguel de Machede | 92,7 ± 0,4 ^{a,b,c,d} | 6,5 ± 0,3 ^{a,b,c} | 0,7 ± 0,1 ^{a,b,c} |
| Serpa | 93,8 ± 0,5 ^a | 5,8 ± 0,5 ^a | 0,5 ± 0,0 ^a |
| V ^e Rocins | 93,0 ± 0,7 ^{a,b,c} | 6,4 ± 0,7 ^{a,b,c} | 0,6 ± 0,1 ^{a,b,c} |
| Valverde | 92,0 ± 1,6 ^{a,b,c,d,e} | 7,1 ± 1,6 ^{a,b,c,d} | 0,9 ± 0,0 ^c |
| V. N. S. Bento | 90,0 ± 0,2 ^{d,e} | 6,1 ± 5,3 ^{c,d} | 0,8 ± 0,0 ^{a,b,c} |
| Villanueva del Fresno | 93,1 ± 0,6 ^{a,b} | 6,4 ± 0,5 ^{a,b,c} | 0,5 ± 0,1 ^a |

Valores médios (n = 3) ± DP. Letras diferentes para cada elemento indicam diferenças significativas com nível de confiança de $p < 0,05$ (ANOVA, teste de Tukey).

A Figura 2.6 mostra os conteúdos médios de água, massa seca, matéria orgânica e minerais presentes nas 24 amostras de *A. ponderosa* analisadas. Os corpos de frutificação apresentaram na sua constituição um elevado conteúdo em água, correspondendo entre 90,3 a 93,1% do seu peso, comparativamente com o conteúdo de matéria orgânica, que variou entre 6,2 a 9% e conteúdo mineral entre 0,5 e 0,9%. Assim, 100 g de cogumelos de matéria edível de *A. ponderosa* corresponderão a um máximo de 9 g de macronutrientes, como lípidos, glúcidos e proteínas, e a um valor inferior a 1 g de conteúdo mineral. Estes valores foram semelhantes aos observados

no estudo realizado por Moreno-Rojas *et al.*, (2004), com cogumelos colhidos em algumas regiões de Andaluzia (Espanha), no qual o conteúdo médio em água foi de 87,8%, o conteúdo de matéria orgânica de 11,8%, com valores de 6,6% de glúcidos, 3,2% de proteínas, 0,5% de lípidos e 1,5% de fibras e conteúdo mineral de 0,4%. Este estudo refere ainda que estes corpos de frutificação apresentam um conteúdo calórico de 42 kcal/100 g de cogumelo, o que os caracteriza, tal como a outras espécies de cogumelos comestíveis, como alimentos de baixas calorias (Kalac & Svoboda 2000; Moreno-Rojas *et al.* 2004).

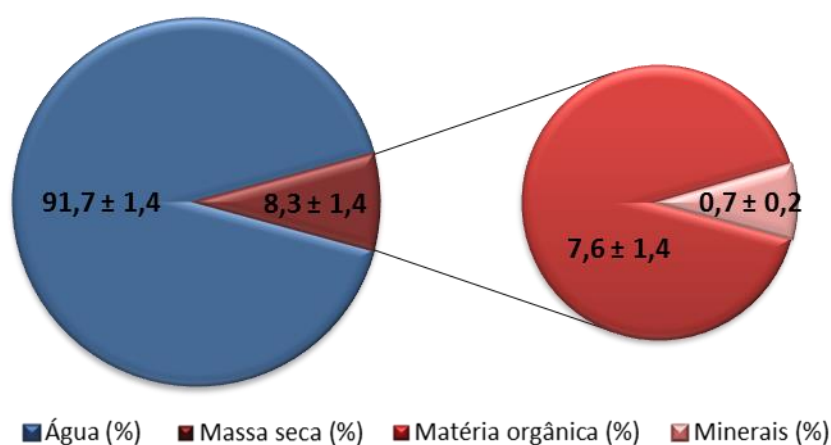


Figura 2.6. Conteúdo médio em água, massa seca, matéria orgânica e minerais presente nas amostras de *A. ponderosa*

Nas Tabelas 2.3 a 2.6 são apresentados os valores de concentração dos elementos minerais analisados para as vinte e quatro amostras de corpos de frutificação de *A. ponderosa* dos diferentes locais, assim como para as respetivas amostras de solo. Na Figura 2.7 estão representados graficamente os valores de variação da concentração para cada elemento quantificado presente nas amostras de corpos de frutificação e solos dos respetivos locais.

As amostras estudadas de *A. ponderosa* apresentaram conteúdo mineral mais elevado em alumínio, cálcio, ferro, fósforo, magnésio, manganês, potássio e sódio, (mg/g ms) (Tabelas 2.3 e 2.4), e menores conteúdos em bário, cádmio, chumbo, cobre, crómio,

prata e zinco ($\mu\text{g/g ms}$) (Tabelas 2.5 e 2.6). O potássio foi o elemento presente em concentrações mais elevadas em todas as amostras de *A. ponderosa* analisadas, tendo sido mais elevado na amostra de Evoramonte, com valor de $69,565 \pm 0,362$ mg/g ms.

Os cogumelos possuem um mecanismo especializado para acumular nutrientes e minerais nos seus corpos de frutificação. De acordo com estudos anteriores, as concentrações dos oligoelementos em corpos de frutificação são geralmente espécie dependentes (Kalac & Svoboda 2000). Extensas pesquisas têm sido realizadas desde a década de 1970 acerca do conteúdo de elementos minerais em cogumelos comestíveis, no entanto para a espécie de cogumelos *A. ponderosa* apenas um estudo foi referido na literatura, para amostras provenientes da região de Andaluzia, Espanha (Moreno-Rojas *et al.*, 2004).

O conteúdo em macromelementos, sendo estes: cálcio, fósforo, magnésio, potássio e sódio, nas amostras de *A. ponderosa* estudadas, foi semelhante aos indicados na literatura para amostras de *A. ponderosa* recolhidas em outros locais (Moreno-Rojas *et al.* 2004) e outras espécies de cogumelos comestíveis (Kalac & Svoboda 2000; Rudawska & Leski 2005; Sesli *et al.* 2008; Vetter 2005).

O cálcio é um dos minerais mais abundantes no organismo, sendo um componente estrutural dos ossos e dentes, que atua também em diversos processos biológicos como: vasoconstrição e vasodilatação e como cofator de enzimas. O fósforo encontra-se maioritariamente sob a forma de fosfato (PO_4), e está presente em todas as células do organismo (fosfolípidos das membranas celulares e ácidos nucleicos), apesar de 80-85% ser encontrado em conjunto com o cálcio. Os conteúdos médios em cálcio e fósforo, para as diferentes amostras estudadas foram 655 ± 625 e 294 ± 174 mg/kg ms respetivamente, sendo estes valores semelhantes aos indicados no estudo de Andaluzia (Moreno-Rojas *et al.* 2004). Uma vez que os resultados estão expressos em quilograma de massa seca, e sendo estes corpos de frutificação constituídos por cerca de 90% de água, 1 kg de massa seca será o equivalente a 10 kg de cogumelos

frescos. Assim há que ter em consideração, para análise dos resultados de conteúdo mineral em comparação com os valores de dose diária recomendada (DDR), que os valores seriam cerca de 10 vezes menores para um máximo de ingestão diária de 1 kg de cogumelos frescos. Desta forma, pode-se observar que os valores destes dois elementos se encontram abaixo dos valores máximos de DDR de 1000 mg/dia (European Commission (2003)).

O potássio e o sódio são minerais responsáveis pela manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico e desempenham ainda o papel de cofatores enzimáticos. Estes elementos apresentaram valores médios de 29648 ± 16405 e 1092 ± 639 mg/kg ms respetivamente, semelhantes aos relatados na bibliografia (Moreno-Rojas *et al.* 2004). O potássio é o mineral que ostenta a maior DDR de 4700 mg/dia e o sódio de 2000 mg/dia, sendo estes valores bastante superiores aos encontrados nos corpos de frutificação (European Commission (2003)).

O magnésio desempenha também inúmeras funções biológicas importantes, nomeadamente ligadas ao metabolismo energético, sendo essencial para o correto funcionamento de certas enzimas como cofator, e funções estruturais, encontrando-se na estrutura cristalina do osso associado a iões hidroxilo. Encontra-se maioritariamente nos ossos (cerca de 70%), podendo também ser armazenado no músculo e nas células. O conteúdo médio em magnésio nas amostras foi de 737 ± 314 mg/kg ms, próxima da descrita na literatura (Moreno-Rojas *et al.* 2004). A ingestão de magnésio recomendada para adultos (19–65 anos) é de 220–260 mg/dia (FAO/WHO 2002).

Os oligoelementos cobre, crómio, ferro, manganês e zinco são elementos essenciais pois desempenham um papel importante nos sistemas biológicos, no entanto, os metais também podem produzir efeitos tóxicos quando a sua ingestão é excessivamente elevada (Afzali *et al.* 2007; Sesli *et al.* 2008; Soriano *et al.* 2007). O cobre é o terceiro oligoelemento mais abundante no organismo, sendo um componente de diversas enzimas, é também um dos intervenientes no metabolismo

do ferro. O ferro é um componente da hemoglobina e mioglobina, proteínas responsáveis pelo transporte de oxigênio para os tecidos. Participa também no metabolismo proteico, produção de energia nas células e em várias reações enzimáticas. O teor médio em cobre foi de 185 ± 152 mg/kg ms, e o valor mais elevado foi encontrado na amostra de *A. ponderosa* recolhida em Rosal de la Frontera ($583,565 \pm 51,195$ mg/kg ms). O conteúdo médio em ferro nos cogumelos *A. ponderosa* foi de 91 ± 86 mg/kg ms. Os níveis de cobre foram semelhantes e os de ferro um pouco inferiores aos descritos para espécies de *Amanita* spp. (Moreno-Rojas *et al.* 2004; Vetter 2005). Os cogumelos apresentaram valores de ambos os minerais menores dos que encontrados em outras espécies de cogumelos comestíveis mencionadas na literatura (Borovicka & Randa 2007; Chudzynski & Falandysz 2008; Ouzouni *et al.* 2007; Sesli & Tüzen 1999; Sesli *et al.* 2008). As concentrações de cobre e ferro presentes em cogumelos comestíveis não são consideradas um risco para a saúde (Gençcelep *et al.* 2009). A DDR para adultos é de 2 mg Cu/dia e 18 mg Fe/dia (European Commission (2003) ; Gençcelep *et al.* 2009). Embora os cogumelos em estudo apresentem valores de cobre superiores à DDR não é preocupante uma vez que só para doses acima de 10 mg/dia este mineral possa ter efeitos tóxicos.

O manganês e o zinco são oligoelementos muito importantes para o organismo no qual apresentam funções tanto estruturais quanto enzimáticas. Participam no metabolismo dos macronutrientes e de ácidos nucleicos, e também promovem os processos de atividade de inúmeros enzimas (Borovicka & Randa 2007; Gerber *et al.* 2002; Mendil *et al.* 2004). Estes elementos podem ser acumulados por cogumelos, sendo no entanto a suas dose diárias recomendadas de 2 e 15 mg/dia (European Commission (2003) ; Gençcelep *et al.* 2009). O valor médio de conteúdo em manganês nas amostras estudadas foi de 55 ± 28 mg/kg ms, e em zinco foi de 67 ± 28 mg/kg ms. Os conteúdos de Mn e Zn foram próximos aos descritos no estudo de Moreno-Rojas *et al.* (2004) para amostras de *A. ponderosa*: Os resultados são também semelhantes aos descritos para outras espécies de *Amanita* (Vetter 2005) e

outras espécies de cogumelos silvestres comestíveis (Chudzynski & Falandysz 2008; Kalac & Svoboda 2000; Ouzouni *et al.* 2007; Tüzen *et al.* 2007).

O crómio é considerado também um oligoelemento, e, ainda que não se conheça com exatidão suas funções biológicas, parece participar no metabolismo dos lípidos e glúcidos, assim como na potenciação da ação da insulina. A dose diária recomendada para este metal é de 120 µg/dia, sendo improvável exceder esta dose com o consumo de cogumelos das amostras analisadas, pois o conteúdo médio obtido foi de $1,189 \pm 0,759$ mg/kg ms. Os valores obtidos são inferiores aos referidos na bibliografia para outras espécies de amanita (Vetter 2005) e semelhante em algumas espécies de cogumelos comestíveis descritas (Chudzynski & Falandysz 2008; Kalac & Svoboda 2000).

O alumínio é um dos poucos elementos abundantes na natureza que parecem não apresentar nenhuma função biológica significativa. Este não é considerado tão tóxico como outros metais pesados, ainda que existam evidências de certa toxicidade quando ingerido em grandes quantidades. A maioria dos solos ácidos é saturada em alumínio ao invés de iões de hidrogénio, sendo esta acidez resultado de hidrólise de compostos de alumínio (Ma *et al.* 2001). Os conteúdos em alumínio variam bastante de espécie para espécie, apontando para a existência de espécies acumuladoras deste metal, no entanto comparando os valores médios obtidos neste estudo, de 361 ± 212 mg/Kg ms, estes são semelhante aos obtidos para outras espécies de amanita e ligeiramente superiores aos encontrados em espécies dos géneros *Trametes* e *Agaricus* (Vetter 2005).

Relativamente aos elementos cádmio e chumbo, estes são os que possuem maior significância toxicológica dos que estão difundidos no ambiente humano. O cádmio tem sido, provavelmente, o metal mais prejudicial encontrado em cogumelos, existindo estudos que apontam para a existência de espécies acumuladoras deste metal, que em zonas poluídas, chegando a acumular alguma centenas de mg/Kg ms deste metal. Os valores médios obtidos de cádmio e chumbo foram de $1,003 \pm 0,744$ mg/kg ms e

2,405 ± 1,369 mg/kg ms respetivamente, mostrando que as amostras de *A. ponderosa* estudadas não apresentam sinais de toxicidade devido à presença destes dois elementos (Chudzynski & Falandysz 2008; Vetter 2005).

Os conteúdos nos metais pesados bário e prata nos cogumelos em estudo foram de 1,004 ± 0,631 mg/kg ms e 2,003 ± 1,671 mg/kg ms, respetivamente. Estes valores semelhantes aos descritos na bibliografia para outras espécies de cogumelos comestíveis (Chudzynski & Falandysz 2008) e inferiores aos descritos para as espécies do género *Amanita* (Borovicka *et al.* 2007; Vetter 2005).

O conteúdo mineral dos corpos de frutificação e das respetivas amostras de solo (Figura 2.7) variou de forma muito semelhante para quase todos os elementos analisados, podendo desta forma indicar a influência das características dos substratos na composição das amostras recolhidas nos diferentes locais.

De modo a proceder ao estudo do possível efeito do local geográfico de colheita na composição mineral, foram efetuadas análises de variância (ANOVA *One-way*) (Anexo J.1, Tabelas J.1.3 e J.1.4). A homogeneidade de variâncias foi confirmada pelo teste de Levene. Os conteúdos dos diferentes minerais presentes nas amostras de *A. ponderosa* e respetivas amostras de solo apresentaram diferenças significativas ($p < 0.05$) para todos os elementos estudados. O teste de Tukey permitiu correlacionar as amostras recolhidas em diferentes locais e colocar em evidência grupos homogéneos, para cada conteúdo mineral ($p > 0.05$). Entre as amostras que apresentaram diferenças significativas das restantes, destaca-se a amostra de Cabezas Rubias, que apresentou um conteúdo nos elementos alumínio e cálcio significativamente superior ($p < 0.05$) aos encontrados nas restantes amostras. No caso do conteúdo em cadmio destacam-se as amostras recolhidas em N. S. Machede e Almendres, que apresentaram conteúdos significativamente diferentes entre si ($p < 0.05$) e superiores de todas as amostras analisadas ($p < 0.05$).

Na análise do conteúdo em crómio destacaram-se as amostras de Évora, Cabezas Rubias e Villanueva del Fresno que apresentaram valores de Cr semelhantes entre si ($p>0.05$) e significativamente mais elevados que as restantes analisadas ($p<0.05$).

Nos resultados obtidos para a análise do conteúdo mineral presente nas amostras de solo (Anexo J.I, Tabelas J.I.5 e J.I.6)., observaram-se algumas diferenças significativas entre amostras ($p<0.05$). A amostra recolhida em N. S^{ra} de Machede apresentou conteúdos significativamente diferentes ($p<0.05$) dos apresentados pelas restantes amostras para os elementos prata, alumínio e magnésio. A amostra de Montejuntos apresentou conteúdos em alumínio, ferro, fósforo e magnésio significativamente diferentes ($p<0.05$) das restantes. A amostra proveniente de Villanueva del Fresno apresentou diferenças significativas ($p<0.05$) nos conteúdos dos elementos bário e manganês, a amostra da Her^{de} da Mitra apresentou diferenças no conteúdo em cobre ($p<0.05$), a amostra de Mértola em zinco e a amostra de Baleizão em potássio. Relativamente à amostra recolhida em Serpa, esta apresentou diferenças significativas ($p<0.05$) nos elementos cálcio, crómio, ferro, magnésio, sódio e zinco. Existem ainda outros pequenos grupos de amostras que mostraram conteúdos semelhantes entre si de alguns elementos mas diferentes das restantes amostras analisadas. As amostras de Almendres, Évora, M^{te} Novo e Valverde não apresentaram diferenças significativas ($p>0.05$) entre si para o conteúdo em ferro, mas diferem das restantes. No caso do chumbo encontramos as amostras de Cabezas Rubias, Serpa e Rosal de la Frontera que não apresentam diferenças no seu conteúdo ($p>0.05$). Para o caso do conteúdo em fosforo destacam-se mais dois grupos sem diferenças significativas ($p>0.05$), as amostras de Baleizão e Rosal de la Frontera e as amostras de S^{to} Aleixo R., S. Miguel de Machede e Villanueva del Fresno. As amostras de Baleizão e Valverde também não apresentam diferenças significativas ($p>0.05$) entre si para o conteúdo em sódio, de V. Nova de S. Bento e S. Miguel de Machede para o elemento magnésio e de Azaruja e S. Miguel de Machede no conteúdo em potássio, apresentado estas diferenças significativas das restantes estudadas ($p<0.05$).

Tabela 2.3. Conteúdo mineral dos elementos Al, Ca, Fe e K, presente nos corpos de frutificação de *A. ponderosa* colhidos nos diferentes locais e nas amostras de solo respetivas.

| Local de colheita | Amostra | Elementos (mg /g massa seca) | | | |
|---------------------------------------|---------|------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| | | Al | Ca | Fe | K |
| Almendres | CF | 0,349 ± 0,124 ^{b,c,d,e,f} | 0,757 ± 0,156 ^a | 0,066 ± 0,014 ^{a,b,c} | 26,677 ± 9,148 ^{a,b,c,d,e} |
| | S | 0,277 ± 0,008 ^{a,b} | 0,106 ± 0,010 ^{a,b} | 1,547 ± 0,092 ^a | 0,363 ± 0,009 ^{a,b} |
| Azaruja | CF | 0,058 ± 0,008 ^a | 0,139 ± 0,012 ^b | 0,018 ± 0,004 ^a | 4,589 ± 1,039 ^a |
| | S | 0,243 ± 0,030 ^a | 0,102 ± 0,012 ^{a,b} | 2,240 ± 0,160 ^b | 0,981 ± 0,037 ^g |
| Baleizão | CF | 0,209 ± 0,073 ^{b,c,d,e,f} | 0,408 ± 0,011 ^a | 0,109 ± 0,027 ^a | 34,814 ± 7,163 ^{a,b,c,d,e} |
| | S | 0,397 ± 0,004 ^{c,d,e} | 0,161 ± 0,011 ^{c,d} | 3,093 ± 0,092 ^{d,e,f} | 1,099 ± 0,024 ^h |
| Beja | CF | 0,065 ± 0,012 ^{d,e,f,g} | 0,366 ± 0,001 ^a | 0,051 ± 0,000 ^{f,g} | 18,586 ± 0,106 ^{a,b} |
| | S | 0,254 ± 0,015 ^a | 0,189 ± 0,014 ^{d,e} | 4,107 ± 0,092 ^{i,j} | 0,619 ± 0,018 ^{d,e} |
| Cabeça Gorda | CF | 0,373 ± 0,026 ^{a,b} | 0,579 ± 0,111 ^a | 0,035 ± 0,010 ^{a,b,c} | 31,852 ± 5,364 ^{c,d,e} |
| | S | 0,195 ± 0,004 ^k | 0,108 ± 0,006 ^{a,b} | 5,067 ± 0,244 ^k | 0,384 ± 0,016 ^{a,b,c} |
| Cabezas Rubias | CF | 0,453 ± 0,066 ^h | 0,698 ± 0,148 ^c | 0,043 ± 0,010 ^{e,f} | 47,715 ± 5,220 ^f |
| | S | 0,375 ± 0,008 ^{c,d} | 0,118 ± 0,016 ^{a,b,c} | 3,520 ± 0,160 ^{e,f,g,h} | 0,443 ± 0,009 ^c |
| Évora | CF | 0,181 ± 0,124 ^{a,b,c,d} | 0,448 ± 0,269 ^a | 0,036 ± 0,024 ^{g,h} | 21,788 ± 2,037 ^{c,d,e} |
| | S | 0,368 ± 0,018 ^c | 0,091 ± 0,023 ^a | 1,653 ± 0,092 ^a | 0,651 ± 0,009 ^e |
| Évoramonte | CF | 0,932 ± 0,077 ^{c,d,e,f,g} | 3,523 ± 0,001 ^a | 0,193 ± 0,000 ^{a,b,c} | 69,565 ± 0,362 ^{a,b,c,d,e} |
| | S | 0,311 ± 0,006 ^b | 0,102 ± 0,008 ^{a,b} | 2,400 ± 0,160 ^{b,c} | 0,576 ± 0,016 ^d |
| Her ^{de} da Mitra | CF | 0,449 ± 0,013 ^{b,c,d,e,f} | 0,614 ± 0,001 ^a | 0,227 ± 0,001 ^{a,b} | 6,090 ± 0,034 ^{a,b,c,d,e} |
| | S | 0,160 ± 0,008 ^l | 0,112 ± 0,008 ^{a,b,c} | 4,853 ± 0,244 ^k | 0,731 ± 0,018 ^f |
| Mértola | CF | 0,423 ± 0,049 ^{b,c,d,e} | 0,733 ± 0,155 ^{a,b} | 0,062 ± 0,007 ^a | 25,148 ± 4,556 ^{a,b,c} |
| | S | 0,417 ± 0,006 ^{e,f} | 0,143 ± 0,025 ^{b,c,d} | 3,573 ± 0,092 ^{f,g,h} | 0,256 ± 0,016 ^{i,j} |
| Mina S. Domingos | CF | 0,183 ± 0,054 ^{a,b,c,d,e} | 0,521 ± 0,146 ^a | 0,057 ± 0,021 ^{a,b,c} | 27,256 ± 2,880 ^{b,c,d,e} |
| | S | 0,159 ± 0,006 ^l | 0,070 ± 0,014 ^a | 3,840 ± 0,160 ^{h,i} | 0,155 ± 0,009 ^l |
| M ^{te} da Borralha | CF | 0,151 ± 0,025 ^{a,b,c,d} | 0,554 ± 0,021 ^{a,b} | 0,051 ± 0,012 ^{a,b} | 38,652 ± 1,607 ^{a,b,c,d,e} |
| | S | 0,157 ± 0,006 ^l | 0,159 ± 0,008 ^{c,d} | 4,747 ± 0,092 ^k | 0,229 ± 0,009 ^{j,k} |
| M ^{te} Novo | CF | 0,333 ± 0,036 ^{c,d,e,f,g} | 0,370 ± 0,057 ^{a,b} | 0,022 ± 0,003 ^a | 18,021 ± 1,060 ^{a,b,c,d,e} |
| | S | 0,300 ± 0,015 ^b | 0,148 ± 0,019 ^{b,c,d} | 1,653 ± 0,244 ^a | 0,603 ± 0,056 ^{d,e} |
| Montejuntos | CF | 0,299 ± 0,014 ^{e,f,g} | 0,582 ± 0,001 ^{a,b} | 0,062 ± 0,000 ^{a,b,c} | 33,607 ± 0,173 ^{c,d,e} |
| | S | 0,813 ± 0,011 ^j | 0,224 ± 0,016 ^{e,f} | 8,099 ± 0,251 ^l | 0,256 ± 0,016 ^{i,j} |
| N. S ^{ra} de Guadalupe | CF | 0,357 ± 0,029 ^{a,b,c,d} | 0,606 ± 0,061 ^{a,b} | 0,027 ± 0,008 ^{b,c,d} | 25,758 ± 4,728 ^{c,d,e} |
| | S | 0,200 ± 0,006 ^k | 0,148 ± 0,008 ^{b,c,d} | 4,960 ± 0,160 ^k | 0,656 ± 0,016 ^e |
| N. S ^{ra} de Machede | CF | 0,423 ± 0,059 ^{a,b,c,d,e} | 0,436 ± 0,072 ^a | 0,029 ± 0,001 ^{a,b,c} | 25,763 ± 6,072 ^{a,b,c,d,e} |
| | S | 0,632 ± 0,019 ⁱ | 0,143 ± 0,003 ^{b,c,d} | 3,738 ± 0,258 ^{g,h,i} | 0,912 ± 0,048 ^g |
| Rosal de la Frontera | CF | 0,545 ± 0,099 ^g | 0,412 ± 0,050 ^a | 0,062 ± 0,010 ^{c,d,e} | 41,285 ± 0,982 ^{e,f} |
| | S | 0,381 ± 0,004 ^{c,d} | 0,083 ± 0,009 ^a | 3,360 ± 0,160 ^{e,f,g,h} | 0,160 ± 0,016 ^{k,l} |
| S ^{to} Aleixo da Restauração | CF | 0,303 ± 0,007 ^a | 0,599 ± 0,001 ^{a,b} | 0,181 ± 0,000 ^{a,b,c} | 6,228 ± 0,030 ^{a,b,c} |
| | S | 0,378 ± 0,004 ^{c,d} | 0,119 ± 0,016 ^{a,b,c} | 3,253 ± 0,092 ^{d,e,f,g} | 0,171 ± 0,009 ^{k,l} |
| S. Miguel de Machede | CF | 0,313 ± 0,047 ^{f,g} | 0,632 ± 0,110 ^a | 0,048 ± 0,013 ^h | 24,717 ± 1,881 ^{c,d,e,f} |
| | S | 0,449 ± 0,016 ^{f,g} | 0,079 ± 0,008 ^a | 2,827 ± 0,092 ^{c,d} | 0,773 ± 0,024 ^f |
| Serpa | CF | 0,209 ± 0,042 ^{d,e,f,g} | 0,448 ± 0,321 ^a | 0,041 ± 0,038 ^{a,b,c} | 26,099 ± 6,188 ^{d,e,f} |
| | S | 0,497 ± 0,006 ^h | 0,338 ± 0,035 ^g | 9,040 ± 0,139 ^m | 0,315 ± 0,009 ^{a,i} |
| V ^e Rocins | CF | 0,659 ± 0,236 ^{a,b,c} | 0,584 ± 0,255 ^{a,b} | 0,119 ± 0,097 ^{a,b} | 51,996 ± 2,660 ^{a,b,c,d} |
| | S | 0,391 ± 0,009 ^{c,d,e} | 0,113 ± 0,008 ^{a,b,c} | 3,040 ± 0,160 ^{d,e} | 0,320 ± 0,016 ^{a,i} |
| Valverde | CF | 0,208 ± 0,011 ^{a,b,c} | 0,605 ± 0,001 ^{a,b} | 0,292 ± 0,001 ^{a,b,c} | 34,630 ± 0,186 ^{a,b,c,d,e} |
| | S | 0,453 ± 0,006 ^g | 0,093 ± 0,023 ^a | 1,440 ± 0,160 ^a | 0,405 ± 0,024 ^{b,c} |
| V. N. S. Bento | CF | 0,602 ± 0,066 ^{a,b,c,d,e} | 0,459 ± 0,013 ^a | 0,052 ± 0,017 ^{d,e,f} | 25,712 ± 5,847 ^{a,b} |
| | S | 0,409 ± 0,006 ^{d,e} | 0,233 ± 0,011 ^{e,f} | 4,587 ± 0,244 ^{j,k} | 0,192 ± 0,016 ^{j,k,l} |
| Villanueva del Fresno | CF | 0,610 ± 0,183 ^{f,g} | 0,649 ± 0,074 ^{a,b} | 0,311 ± 0,018 ^{a,b,c} | 45,011 ± 1,528 ^{a,b,c,d,e} |
| | S | 0,494 ± 0,004 ^h | 0,240 ± 0,025 ^f | 2,347 ± 0,092 ^{b,c} | 0,368 ± 0,016 ^{a,b} |

CF – Corpo de frutificação, S – solo. Valores médios (n = 3) ± DP. Letras diferentes para cada elemento indicam diferenças significativas com nível de confiança de p<0,05 (ANOVA, teste de Tukey).

Tabela 2.4. Conteúdo mineral dos elementos Mg, Mn, Na e P, presente nos corpos de frutificação de *A. ponderosa* colhidos nos diferentes locais e nas amostras de solo respetivas.

| Local de colheita | Amostra | Elementos (mg /g massa seca) | | | |
|---------------------------------------|---------|------------------------------------|--|--------------------------------------|--------------------------------------|
| | | Mg | Mn | Na | P |
| Almendres | CF | 0,774 ± 0,130 ^{a,b,c} | 0,028 ± 0,006 ^{a,b,c,d} | 1,408 ± 0,146 ^a | 0,319 ± 0,037 ^{a,b,c,d,e} |
| | S | 0,286 ± 0,015 ^{a,b,c,d} | 0,022 ± 0,001 ^a | 0,070 ± 0,001 ^{a,b,c,d} | 0,072 ± 0,002 ^{a,b} |
| Azaruja | CF | 0,194 ± 0,010 ^a | 0,005 ± 0,001 ^a | 0,216 ± 0,135 ^f | 0,044 ± 0,018 ^{h,i} |
| | S | 0,324 ± 0,029 ^{a,b} | 0,131 ± 0,009 ^{a,b} | 0,075 ± 0,004 ^{a,b,h,i} | 0,074 ± 0,004 ^{a,b} |
| Baleizão | CF | 0,930 ± 0,158 ^{a,b,c,d} | 0,038 ± 0,005 ^{g,h} | 0,551 ± 0,052 ^{g,h} | 0,344 ± 0,074 ^{j,k} |
| | S | 0,312 ± 0,038 ^{a,b} | 0,893 ± 0,017 ^{f,g} | 0,109 ± 0,004 ^k | 0,156 ± 0,004 ^g |
| Beja | CF | 0,481 ± 0,000 ^{a,b,c} | 0,047 ± 0,000 ^{f,g,h} | 1,098 ± 0,011 ^{a,g} | 0,034 ± 0,001 ^{d,e,f,g} |
| | S | 0,277 ± 0,033 ^{a,b,c,d,e} | 0,507 ± 0,045 ^c | 0,069 ± 0,002 ^{a,b,c,d,e} | 0,133 ± 0,008 ^f |
| Cabeça Gorda | CF | 0,685 ± 0,189 ^{a,b,c} | 0,047 ± 0,009 ^{c,d,e,f,g,h} | 0,929 ± 0,058 ^{a,b,c,d,e,f} | 0,277 ± 0,090 ^{a,j} |
| | S | 0,186 ± 0,008 ^{e,f,g} | 0,695 ± 0,062 ^{d,e} | 0,069 ± 0,005 ^{a,b,c,d,e} | 0,130 ± 0,003 ^{e,f} |
| Cabezas Rubias | CF | 0,736 ± 0,086 ^{c,d} | 0,069 ± 0,019 ^{e,f,g,h} | 1,078 ± 0,174 ^h | 0,460 ± 0,016 ^{g,h,i} |
| | S | 0,277 ± 0,019 ^{a,b,c,d,e} | 0,735 ± 0,030 ^{d,e,f} | 0,062 ± 0,002 ^{c,d,e,f} | 0,093 ± 0,004 ^c |
| Évora | CF | 0,418 ± 0,203 ^{a,b,c} | 0,015 ± 0,010 ^{b,c,d,e,f,g,h} | 0,419 ± 0,212 ^{a,b} | 0,165 ± 0,084 ^{d,e,f,g,h} |
| | S | 0,171 ± 0,025 ^{f,g} | 0,175 ± 0,003 ^{a,b} | 0,052 ± 0,003 ^{f,g} | 0,082 ± 0,005 ^{b,c} |
| Évoramonte | CF | 1,265 ± 0,001 ^{a,b,c} | 0,081 ± 0,000 ^{e,f,g,h} | 2,645 ± 0,018 ^{b,c,d,e,f} | 0,073 ± 0,001 ^{a,j} |
| | S | 0,156 ± 0,011 ^g | 0,212 ± 0,012 ^b | 0,051 ± 0,002 ^g | 0,094 ± 0,001 ^c |
| Her ^{de} da Mitra | CF | 0,734 ± 0,000 ^{a,b,c} | 0,084 ± 0,000 ^{a,b,c,d,e,f,g} | 1,540 ± 0,017 ^{a,b,c,d,e,f} | 0,212 ± 0,000 ^{b,c,d,e,f} |
| | S | 0,193 ± 0,018 ^{d,e,f,g} | 0,725 ± 0,017 ^{d,e} | 0,082 ± 0,002 ^{h,i,j} | 0,119 ± 0,002 ^{d,e,f} |
| Mértola | CF | 0,760 ± 0,101 ^{a,b,c} | 0,079 ± 0,011 ^{a,b,c,d} | 0,614 ± 0,131 ^{c,d,e,f} | 0,468 ± 0,083 ^{g,h,i} |
| | S | 0,365 ± 0,043 ^a | 0,290 ± 0,006 ^b | 0,059 ± 0,005 ^{e,f,g} | 0,074 ± 0,002 ^{a,b} |
| Mina S. Domingos | CF | 0,586 ± 0,354 ^{a,b,c} | 0,026 ± 0,007 ^h | 0,895 ± 0,658 ^{a,b,c,d} | 0,152 ± 0,034 ^{f,g,h,i} |
| | S | 0,172 ± 0,023 ^{f,g} | 0,198 ± 0,009 ^b | 0,067 ± 0,005 ^{b,c,d,e} | 0,075 ± 0,005 ^{a,b} |
| M ^{te} da Borralha | CF | 0,848 ± 0,159 ^{a,b,c} | 0,066 ± 0,006 ^{a,b,c,d,e,f} | 0,889 ± 0,038 ^{e,f} | 0,447 ± 0,002 ^{a,b,c,j} |
| | S | 0,298 ± 0,029 ^{a,b,c} | 0,725 ± 0,017 ^{d,e} | 0,051 ± 0,003 ^g | 0,115 ± 0,003 ^{d,e} |
| M ^{te} Novo | CF | 0,658 ± 0,338 ^{a,b} | 0,029 ± 0,006 ^{a,b,c,d} | 0,484 ± 0,171 ^{e,f} | 0,061 ± 0,021 ^{a,b,c,d,e,f} |
| | S | 0,217 ± 0,034 ^{c,d,e,f,g} | 0,139 ± 0,003 ^{a,b} | 0,053 ± 0,004 ^{f,g} | 0,084 ± 0,004 ^{b,c} |
| Montejuntos | CF | 0,737 ± 0,001 ^{a,b,c} | 0,104 ± 0,000 ^{a,b,c,d,e,f,g} | 1,097 ± 0,014 ^{a,b,c} | 0,149 ± 0,001 ^{a,b,j} |
| | S | 0,910 ± 0,025 ^j | 0,649 ± 0,027 ^{c,d,e} | 0,085 ± 0,002 ^{i,j} | 0,294 ± 0,011 ⁱ |
| N. S ^{ra} de Guadalupe | CF | 0,856 ± 0,107 ^{b,c,d} | 0,091 ± 0,014 ^{a,b,c,d,e} | 2,249 ± 0,231 ^{b,c,d,e,f} | 0,525 ± 0,062 ^{a,b,c,d} |
| | S | 0,255 ± 0,014 ^{b,c,d,e,f} | 0,695 ± 0,062 ^{e,f} | 0,073 ± 0,001 ^{a,b,h} | 0,131 ± 0,005 ^{e,f} |
| N. S ^{ra} de Machede | CF | 0,562 ± 0,114 ^{a,b,c} | 0,034 ± 0,004 ^{a,b,c,d,e,f,g} | 0,379 ± 0,251 ^{g,h} | 0,316 ± 0,076 ^{j,k} |
| | S | 0,804 ± 0,048 ⁱ | 0,123 ± 0,004 ^{a,b} | 0,079 ± 0,002 ^{a,h,i,j} | 0,078 ± 0,001 ^{a,b,c} |
| Rosal de la Frontera | CF | 0,742 ± 0,053 ^d | 0,049 ± 0,009 ^{g,h} | 1,146 ± 0,304 ^{a,b,c,d,e} | 0,442 ± 0,002 ^k |
| | S | 0,365 ± 0,011 ^a | 0,725 ± 0,017 ^{d,e} | 0,079 ± 0,001 ^{a,h,i,j} | 0,154 ± 0,004 ^g |
| S ^{to} Aleixo da Restauração | CF | 0,657 ± 0,000 ^{a,b} | 0,072 ± 0,000 ^{a,b,c,d,e,f,g} | 1,467 ± 0,015 ^{a,b,c,d,e} | 0,197 ± 0,001 ⁱ |
| | S | 0,272 ± 0,015 ^{a,b,c,d,e} | 1,002 ± 0,030 ^g | 0,060 ± 0,005 ^{c,d,e,f,g} | 0,179 ± 0,007 ^h |
| S. Miguel de Machede | CF | 0,843 ± 0,120 ^{a,b} | 0,050 ± 0,013 ^{g,h} | 2,185 ± 0,438 ^{a,b,c,d,e,f} | 0,542 ± 0,048 ^{c,d,e,f} |
| | S | 0,477 ± 0,014 ^h | 0,193 ± 0,007 ^b | 0,070 ± 0,002 ^{a,b,c} | 0,185 ± 0,001 ^h |
| Serpa | CF | 0,696 ± 0,299 ^{a,b,c} | 0,039 ± 0,016 ^{c,d,e,f,g,h} | 0,368 ± 0,070 ^{a,b,c,d} | 0,417 ± 0,065 ^{a,j} |
| | S | 1,466 ± 0,068 ^k | 0,576 ± 0,017 ^{c,d} | 0,158 ± 0,005 ^l | 0,111 ± 0,002 ^d |
| V ^e Rocins | CF | 1,540 ± 0,774 ^{a,b} | 0,090 ± 0,056 ^{a,b} | 0,964 ± 0,453 ^{d,e,f} | 0,641 ± 0,098 ^{e,f,g,h,i} |
| | S | 0,284 ± 0,014 ^{a,b,c,d} | 0,893 ± 0,017 ^{f,g} | 0,086 ± 0,002 ^j | 0,074 ± 0,005 ^{a,b} |
| Valverde | CF | 0,713 ± 0,001 ^{a,b,c} | 0,059 ± 0,000 ^{a,b,c} | 1,241 ± 0,016 ^{a,b,c,d,e,f} | 0,201 ± 0,001 ^{f,g,h,i} |
| | S | 0,265 ± 0,041 ^{b,c,d,e,f} | 0,021 ± 0,001 ^a | 0,111 ± 0,003 ^k | 0,065 ± 0,002 ^a |
| V. N. S. Bento | CF | 0,738 ± 0,049 ^{a,b,c} | 0,039 ± 0,006 ^{d,e,f,g,h} | 1,451 ± 0,147 ^a | 0,310 ± 0,083 ^{d,e,f,g,h,i} |
| | S | 0,536 ± 0,037 ^h | 0,744 ± 0,045 ^{e,f} | 0,060 ± 0,002 ^{d,e,f,g} | 0,116 ± 0,005 ^{d,e} |
| Villanueva del Fresno | CF | 0,549 ± 0,140 ^{a,b,c} | 0,091 ± 0,015 ^{a,b,c,d,e,f} | 0,897 ± 0,103 ^a | 0,270 ± 0,060 ^{a,b,c,d,e,f} |
| | S | 0,267 ± 0,027 ^{b,c,d,e} | 1,518 ± 0,045 ^h | 0,078 ± 0,004 ^{a,h,i,j} | 0,179 ± 0,012 ^h |

CF – Corpo de frutificação, S – solo. Valores médios (n = 3) ± DP. Letras diferentes para cada elemento indicam diferenças significativas com nível de confiança de $p < 0,05$ (ANOVA, teste de Tukey).

Tabela 2.5. Conteúdo mineral dos elementos Ag, Ba, Cd e Cr, presente nos corpos de frutificação de *A. ponderosa* recolhidos nos diferentes locais e nas amostras de solo respetivas.

| Local de colheita | Amostra | Elementos ($\mu\text{g} / \text{g}$ massa seca) | | | |
|---------------------------------------|---------|--|--|--------------------------------------|--|
| | | Ag | Ba | Cd | Cr |
| Almendres | CF | 2,590 \pm 0,489 ^{a,b,c,d,e} | 2,873 \pm 1,100 ^a | 2,204 \pm 0,812 ^a | 1,335 \pm 0,597 ^{a,b,c} |
| | S | 0,070 \pm 0,017 ^a | 1,991 \pm 0,324 ^{a,b} | 0,286 \pm 0,022 ^{a,b} | 1,003 \pm 0,167 ^a |
| Azaruja | CF | 6,602 \pm 2,181 ^f | 0,899 \pm 0,183 ^{d,e,f,g} | 0,329 \pm 0,040 ^b | 0,632 \pm 0,072 ^{c,d,e} |
| | S | 0,088 \pm 0,015 ^{a,b,c,d} | 1,578 \pm 0,201 ^a | 0,337 \pm 0,122 ^a | 0,932 \pm 0,139 ^a |
| Baleizão | CF | 5,047 \pm 1,762 ^{a,b,c,d} | 0,626 \pm 0,296 ^{d,e,f,g} | 1,067 \pm 0,255 ^{b,c,d,e} | 1,022 \pm 0,234 ^{d,e} |
| | S | 0,088 \pm 0,015 ^{a,b,c,d} | 5,247 \pm 0,861 ⁱ | 0,153 \pm 0,028 ^e | 2,425 \pm 0,115 ^{b,c,d} |
| Beja | CF | 1,140 \pm 0,239 ^{a,b} | 0,837 \pm 0,015 ^{b,c,d,e,f,g} | 0,441 \pm 0,044 ^{b,c,d,e} | 0,835 \pm 0,042 ^a |
| | S | 0,139 \pm 0,043 ^{a,b,c,d,e,f} | 2,635 \pm 0,653 ^{a,b,c,d} | 0,034 \pm 0,000 ^f | 4,391 \pm 0,152 ^{i,j} |
| Cabeça Gorda | CF | 2,089 \pm 0,655 ^{a,b,c} | 0,324 \pm 0,039 ^{d,e,f,g} | 0,684 \pm 0,057 ^{c,d,e} | 0,750 \pm 0,031 ^{b,c,d,e} |
| | S | 0,145 \pm 0,004 ^{b,c,d,e,f} | 2,344 \pm 0,056 ^{a,b,c,d} | 0,171 \pm 0,007 ^{c,d,e} | 4,230 \pm 0,030 ^{g,h,i,j} |
| Cabezas Rubias | CF | 1,467 \pm 0,207 ^{a,b,c} | 1,989 \pm 0,282 ^{d,e,f,g} | 0,816 \pm 0,105 ^{c,d,e} | 0,901 \pm 0,135 ^f |
| | S | 0,151 \pm 0,006 ^{c,d,e,f,g} | 2,587 \pm 0,406 ^{a,b,c,d} | 0,111 \pm 0,027 ^{e,f} | 3,050 \pm 0,446 ^{c,d,e,f,g,h} |
| Évora | CF | 0,512 \pm 0,298 ^{a,b,c,d} | 0,842 \pm 0,406 ^{f,g} | 0,425 \pm 0,289 ^{b,c,d,e} | 0,896 \pm 0,497 ^f |
| | S | 0,219 \pm 0,033 ^{g,h,i} | 4,288 \pm 1,103 ^{f,g,h,i} | 0,102 \pm 0,024 ^{e,f} | 2,818 \pm 0,470 ^{c,d,e,f} |
| Évoramonte | CF | 1,036 \pm 0,073 ^{d,e,f} | 0,896 \pm 0,069 ^{b,c,d,e} | 1,145 \pm 0,172 ^{b,c,d,e} | 2,919 \pm 0,070 ^{b,c,d,e} |
| | S | 0,141 \pm 0,006 ^{a,b,c,d,e,f} | 2,805 \pm 0,084 ^{a,b,c,d,e} | 0,128 \pm 0,008 ^{e,f} | 2,556 \pm 0,017 ^{c,d,e,f} |
| Her ^{de} da Mitra | CF | 0,665 \pm 0,124 ^{a,b,c,d} | 1,210 \pm 0,094 ^g | 0,981 \pm 0,025 ^{b,c,d,e} | 1,792 \pm 0,050 ^{b,c,d,e} |
| | S | 0,165 \pm 0,010 ^{e,f,g,h} | 2,259 \pm 0,076 ^{a,b,c} | 0,092 \pm 0,019 ^{e,f} | 3,766 \pm 0,087 ^{f,g,h,i,j} |
| Mértola | CF | 4,276 \pm 0,771 ^{a,b} | 1,500 \pm 0,191 ^{b,c,d,e,f} | 1,024 \pm 0,262 ^{b,c,d} | 0,936 \pm 0,261 ^{d,e} |
| | S | 0,073 \pm 0,010 ^{a,b} | 3,012 \pm 0,420 ^{b,c,d,e,f} | 0,133 \pm 0,017 ^{e,f} | 2,949 \pm 0,155 ^{c,d,e,f,g} |
| Mina S. Domingos | CF | 0,560 \pm 0,116 ^{a,b,c} | 0,571 \pm 0,040 ^{c,d,e,f,g} | 1,424 \pm 0,168 ^{d,e} | 0,684 \pm 0,071 ^{a,b,c,d,e} |
| | S | 0,266 \pm 0,042 ⁱ | 1,870 \pm 0,042 ^{a,b} | 0,112 \pm 0,022 ^{e,f} | 5,057 \pm 0,647 ^{j,k} |
| M ^{te} da Borralha | CF | 1,487 \pm 0,080 ^{a,b,c} | 0,916 \pm 0,105 ^{f,g} | 1,098 \pm 0,176 ^{b,c} | 0,886 \pm 0,065 ^{c,d,e} |
| | S | 0,161 \pm 0,008 ^{d,e,f,g} | 2,319 \pm 0,036 ^{a,b,c,d} | 0,085 \pm 0,012 ^{e,f} | 3,695 \pm 0,035 ^{d,e,f,g,h,i} |
| M ^{te} Novo | CF | 0,568 \pm 0,095 ^a | 1,313 \pm 0,240 ^{e,f,g} | 0,592 \pm 0,061 ^{b,c,d,e} | 0,515 \pm 0,094 ^e |
| | S | 0,086 \pm 0,009 ^{a,b,c} | 3,364 \pm 0,220 ^{c,d,e,f,g} | 0,182 \pm 0,026 ^{b,c,d,e} | 2,576 \pm 0,243 ^{c,d,e,f} |
| Montejuntos | CF | 1,486 \pm 0,157 ^{a,b,c} | 1,048 \pm 0,080 ^{b,c,d} | 1,306 \pm 0,083 ^{b,c,d,e} | 1,022 \pm 0,073 ^{a,b,c,d} |
| | S | 0,237 \pm 0,045 ^{h,i} | 3,607 \pm 0,314 ^{d,e,f,g,h} | 0,128 \pm 0,030 ^{e,f} | 5,728 \pm 0,194 ^k |
| N. S ^{ra} de Guadalupe | CF | 2,463 \pm 0,274 ^{e,f} | 0,741 \pm 0,197 ^{d,e,f,g} | 0,905 \pm 0,146 ^{b,c,d,e} | 0,509 \pm 0,052 ^{a,b,c,d,e} |
| | S | 0,147 \pm 0,009 ^{b,c,d,e,f,g} | 2,404 \pm 0,056 ^{a,b,c,d} | 0,175 \pm 0,011 ^{c,d,e} | 4,280 \pm 0,092 ^{h,i,j} |
| N. S ^{ra} de Machede | CF | 0,377 \pm 0,207 ^{a,b,c,d,e} | 0,554 \pm 0,102 ^{b,c,d,e,f,g} | 0,734 \pm 0,121 ^f | 0,363 \pm 0,050 ^{b,c,d,e} |
| | S | 0,373 \pm 0,003 ^j | 4,032 \pm 0,203 ^{e,f,g,h,i} | 0,089 \pm 0,015 ^{e,f} | 3,754 \pm 0,335 ^{e,f,g,h,i,j} |
| Rosal de la Frontera | CF | 1,588 \pm 0,337 ^{c,d,e} | 1,516 \pm 0,079 ^{b,c,d,e,f} | 1,020 \pm 0,058 ^{b,c} | 1,204 \pm 0,037 ^a |
| | S | 0,154 \pm 0,004 ^{c,d,e,f,g} | 2,344 \pm 0,076 ^{a,b,c,d} | 0,120 \pm 0,018 ^{e,f} | 2,878 \pm 0,195 ^{c,d,e,f} |
| S ^{to} Aleixo da Restauração | CF | 1,245 \pm 0,246 ^{a,b,c} | 1,109 \pm 0,070 ^{d,e,f,g} | 0,692 \pm 0,068 ^{b,c} | 0,925 \pm 0,044 ^{b,c,d,e} |
| | S | 0,167 \pm 0,036 ^{e,f,g,h} | 2,830 \pm 0,203 ^{a,b,c,d,e} | 0,271 \pm 0,032 ^{a,b,c,d} | 2,768 \pm 0,882 ^{c,d,e,f} |
| S. Miguel de Machede | CF | 2,600 \pm 0,288 ^{b,c,d,e} | 1,271 \pm 0,309 ^{b,c,d,e,f,g} | 3,845 \pm 0,493 ^{b,c,d,e} | 0,944 \pm 0,116 ^{a,b} |
| | S | 0,161 \pm 0,010 ^{e,f,g} | 3,364 \pm 0,111 ^{c,d,e,f,g} | 0,097 \pm 0,006 ^{e,f} | 2,314 \pm 0,152 ^{b,c} |
| Serpa | CF | 1,689 \pm 0,317 ^{a,b,c} | 0,420 \pm 0,087 ^{a,b,c} | 0,416 \pm 0,088 ^{b,c,d,e} | 0,572 \pm 0,084 ^{b,c,d,e} |
| | S | 0,183 \pm 0,042 ^{f,g,h} | 2,380 \pm 0,256 ^{a,b,c,d} | 0,034 \pm 0,000 ^f | 7,851 \pm 0,383 ^l |
| V ^e Rocins | CF | 3,308 \pm 2,197 ^a | 1,294 \pm 0,508 ^{d,e,f,g} | 0,515 \pm 0,182 ^{b,c} | 1,755 \pm 0,635 ^{b,c,d,e} |
| | S | 0,093 \pm 0,010 ^{a,b,c,d,e} | 4,761 \pm 0,182 ^{h,i} | 0,166 \pm 0,008 ^{d,e} | 2,455 \pm 0,063 ^{b,c,d,e} |
| Valverde | CF | 1,815 \pm 0,593 ^{a,b} | 0,523 \pm 0,016 ^{d,e,f,g} | 0,971 \pm 0,113 ^e | 2,848 \pm 0,075 ^{b,c,d,e} |
| | S | 0,154 \pm 0,030 ^{c,d,e,f,g} | 1,688 \pm 0,297 ^{a,b} | 0,176 \pm 0,017 ^{b,c,d,e} | 1,204 \pm 0,052 ^{a,b} |
| V. N. S. Bento | CF | 0,426 \pm 0,271 ^{a,b,c} | 2,093 \pm 0,209 ^{c,d,e,f,g} | 0,676 \pm 0,086 ^{b,c,d,e} | 2,839 \pm 0,410 ^{b,c,d,e} |
| | S | 0,112 \pm 0,020 ^{a,b,c,d,e,f} | 4,494 \pm 0,354 ^{g,h,i} | 0,279 \pm 0,070 ^{a,b,c} | 1,813 \pm 1,302 ^{a,b,c} |
| Villanueva del Fresno | CF | 3,043 \pm 0,330 ^a | 1,138 \pm 0,202 ^{a,b} | 0,773 \pm 0,297 ^{b,c,d,e} | 1,450 \pm 0,354 ^f |
| | S | 0,100 \pm 0,027 ^{a,b,c,d,e} | 11,285 \pm 0,948 ^j | 0,276 \pm 0,042 ^{a,b,c} | 4,855 \pm 0,545 ^{i,j,k} |

CF – Corpo de frutificação, S – solo. Valores médios (n = 3) \pm DP. Letras diferentes para cada elemento indicam diferenças significativas com nível de confiança de $p < 0,05$ (ANOVA, teste de Tukey).

Tabela 2.6. Conteúdo mineral dos elementos Cu, Pb e Zn, presente nos corpos de frutificação de *A. ponderosa* recolhidos nos diferentes locais e nas amostras de solo respetivas.

| Local de colheita | Amostra | Elementos ($\mu\text{g} / \text{g}$ massa seca) | | |
|---------------------------------------|---------|--|--------------------|---------------------|
| | | Cu | Pb | Zn |
| Almendres | CF | 80,162 \pm 1,035 | 0,649 \pm 0,468 | 58,864 \pm 1,345 |
| | S | 0,645 \pm 0,000 | 4,019 \pm 0,429 | 4,404 \pm 0,060 |
| Azaruja | CF | 30,091 \pm 1,916 | 0,416 \pm 0,069 | 16,269 \pm 1,897 |
| | S | 1,935 \pm 0,000 | 6,966 \pm 1,035 | 5,023 \pm 0,569 |
| Baleizão | CF | 355,846 \pm 37,285 | 1,731 \pm 0,520 | 96,914 \pm 1,606 |
| | S | 7,384 \pm 0,248 | 9,165 \pm 1,096 | 9,396 \pm 0,332 |
| Beja | CF | 372,766 \pm 0,224 | 2,827 \pm 0,134 | 104,077 \pm 0,122 |
| | S | 8,674 \pm 0,497 | 6,873 \pm 0,567 | 13,252 \pm 0,273 |
| Cabeça Gorda | CF | 161,083 \pm 10,391 | 1,852 \pm 0,182 | 80,809 \pm 1,141 |
| | S | 0,645 \pm 0,000 | 4,487 \pm 0,162 | 9,534 \pm 0,103 |
| Cabezas Rubias | CF | 140,428 \pm 0,237 | 5,071 \pm 0,780 | 131,637 \pm 0,129 |
| | S | 5,090 \pm 0,248 | 16,463 \pm 0,643 | 10,498 \pm 0,841 |
| Évora | CF | 198,147 \pm 0,203 | 1,884 \pm 0,909 | 75,166 \pm 0,111 |
| | S | 1,649 \pm 0,248 | 10,896 \pm 0,214 | 5,196 \pm 0,826 |
| Évoramonte | CF | 123,488 \pm 20,261 | 4,172 \pm 0,160 | 59,322 \pm 7,275 |
| | S | 2,366 \pm 0,430 | 7,387 \pm 0,292 | 5,953 \pm 0,158 |
| Her ^{de} da Mitra | CF | 193,333 \pm 19,058 | 1,399 \pm 0,216 | 61,401 \pm 1,666 |
| | S | 9,677 \pm 0,430 | 5,422 \pm 0,292 | 11,187 \pm 0,273 |
| Mértola | CF | 43,089 \pm 14,616 | 3,709 \pm 0,911 | 51,475 \pm 7,868 |
| | S | 4,659 \pm 0,248 | 7,949 \pm 0,692 | 15,146 \pm 0,703 |
| Mina S. Domingos | CF | 333,824 \pm 0,189 | 3,122 \pm 0,716 | 91,120 \pm 0,103 |
| | S | 2,939 \pm 0,248 | 10,335 \pm 0,429 | 3,715 \pm 0,510 |
| M ^{te} da Borralha | CF | 231,585 \pm 62,952 | 2,206 \pm 0,280 | 61,542 \pm 3,905 |
| | S | 1,935 \pm 0,000 | 5,422 \pm 0,292 | 10,326 \pm 0,703 |
| M ^{te} Novo | CF | 121,438 \pm 16,115 | 1,616 \pm 0,318 | 51,456 \pm 4,046 |
| | S | 2,509 \pm 0,248 | 8,229 \pm 0,706 | 4,955 \pm 0,298 |
| Montejuntos | CF | 170,174 \pm 20,713 | 3,004 \pm 0,101 | 59,574 \pm 2,982 |
| | S | 6,783 \pm 0,457 | 10,194 \pm 1,540 | 10,454 \pm 0,141 |
| N. S ^{ra} de Guadalupe | CF | 263,973 \pm 23,355 | 2,139 \pm 0,325 | 62,821 \pm 9,978 |
| | S | 8,387 \pm 0,430 | 4,487 \pm 0,162 | 12,323 \pm 0,310 |
| N. S ^{ra} de Machede | CF | 147,648 \pm 25,449 | 0,398 \pm 0,133 | 69,602 \pm 1,735 |
| | S | 3,752 \pm 0,000 | 8,370 \pm 0,081 | 9,473 \pm 0,454 |
| Rosal de la Frontera | CF | 583,565 \pm 51,195 | 3,038 \pm 0,133 | 95,002 \pm 6,223 |
| | S | 8,530 \pm 0,248 | 16,463 \pm 0,643 | 5,815 \pm 0,103 |
| S ^{to} Aleixo da Restauração | CF | 128,515 \pm 0,138 | 3,938 \pm 0,342 | 46,648 \pm 0,075 |
| | S | 5,520 \pm 0,248 | 6,405 \pm 0,935 | 10,532 \pm 0,260 |
| S. Miguel de Machede | CF | 207,210 \pm 39,035 | 1,367 \pm 0,091 | 58,188 \pm 8,173 |
| | S | 5,376 \pm 0,430 | 5,843 \pm 0,214 | 9,190 \pm 0,158 |
| Serpa | CF | 142,752 \pm 13,867 | 1,021 \pm 0,189 | 61,033 \pm 9,136 |
| | S | 4,659 \pm 0,248 | 19,504 \pm 3,720 | 29,521 \pm 0,716 |
| V ^e Rocins | CF | 84,146 \pm 7,137 | 2,320 \pm 0,823 | 30,446 \pm 1,549 |
| | S | 8,530 \pm 0,248 | 9,165 \pm 1,096 | 4,989 \pm 0,547 |
| Valverde | CF | 61,799 \pm 2,721 | 5,115 \pm 0,166 | 41,831 \pm 2,253 |
| | S | 0,789 \pm 0,248 | 4,440 \pm 0,353 | 4,541 \pm 0,158 |
| V. N. S. Bento | CF | 172,400 \pm 0,196 | 1,616 \pm 0,124 | 86,174 \pm 0,107 |
| | S | 6,093 \pm 0,248 | 8,370 \pm 3,024 | 26,495 \pm 0,516 |
| Villanueva del Fresno | CF | 100,440 \pm 8,788 | 3,113 \pm 0,621 | 67,779 \pm 3,820 |
| | S | 6,380 \pm 0,248 | 7,434 \pm 0,451 | 4,920 \pm 0,510 |

CF – Corpo de frutificação, S – solo. Valores médios (n = 3) \pm DP. Letras diferentes para cada elemento indicam diferenças significativas com nível de confiança de P<0,05 (ANOVA, teste de Tukey).

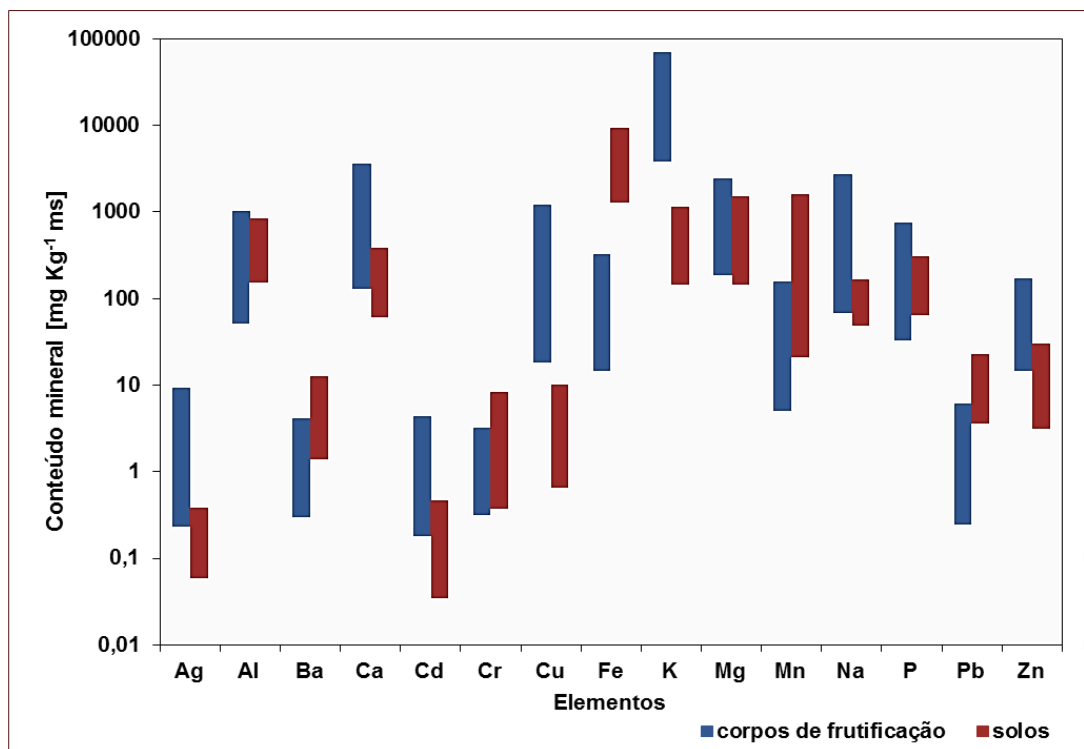


Figura 2.7. Variação da concentração dos elementos presentes nos corpos de frutificação de *A. ponderosa* e nas amostras de solo. Os valores de concentração estão apresentados em escala logarítmica uma vez que o conteúdo de cada mineral é bastante distinto.

Os resultados de conteúdo mineral obtidos, para foram semelhantes aos descritos por Moreno-Rojas *et al.* (2004) para amostras de *A. ponderosa* recolhidas em Andaluzia (Espanha), relativamente aos nove elementos apresentados nesse estudo. Outro estudo que apresenta a composição mineral de várias amostras de cogumelos de sete espécies pertencentes ao género *Amanita*, mas que não inclui a espécie *A. ponderosa*, permitiu também efetuar uma análise comparativa com os resultados obtidos neste estudo, mostrando conteúdo mineral semelhante (Vetter 2005).

Alguns autores referem a existência de concentrações de metais mais elevadas em corpos de frutificação mais jovens; podendo este facto ser explicado pelo transporte de metais do micélio para o corpo de frutificação durante o início da frutificação (Kalac & Svoboda 2000). A idade do corpo de frutificação ou o seu tamanho podem contribuir para uma variação da composição mineral (Kalac & Svoboda 2000). Assim, os cogumelos da espécie *A. ponderosa* analisados foram obtidos no mesmo estágio de

desenvolvimento, de forma a eliminar possíveis interferências de tamanho na comparação do seu conteúdo mineral.

Os cogumelos são agentes responsáveis pela degradação de grande parte da matéria orgânica e apresentam um papel importante nas mudanças contínuas que ocorrem na natureza. Pelo facto de apresentarem um mecanismo muito eficiente para acumular metais do ambiente, muitas espécies de *Basidiomycetes* podem ser utilizadas com a finalidade de proceder à avaliação do nível de poluição ambiental (Sesli *et al.* 2008).

As concentrações dos elementos são geralmente assumidas como dependente da espécie, mas a composição do substrato também é considerada um fator importante, devido ao teor ácido e conteúdo em matéria orgânica do solo e seu ecossistema (Cocchi *et al.* 2006; Gençcelep *et al.* 2009; Kalac & Svoboda 2000; Sesli *et al.* 2008).

Neste estudo observou-se que o conteúdo mineral foi influenciado pela área local em que as amostras de cogumelos foram recolhidas, possivelmente devido à composição do solo e por fatores ambientais, como temperatura média, a vegetação e a chuva.

Moreno-Rojas *et al.* (2004), no estudo de avaliação do conteúdo mineral em amostras de *A. ponderosa* de Andaluzia, verificaram também que ocorreram variações na composição mineral de acordo com o local de colheita das amostras, particularmente em relação aos conteúdos em ferro, potássio e sódio. Outros autores referem também que a principal causa de variações de composição mineral entre amostras de espécies diferentes de *Amanita* é o carácter e a composição dos substratos (por exemplo, areia, madeira), podendo ainda ser influenciada pela presença ou ausência de habilidade das diferentes espécies, para acumulação específica de alguns metais, nomeadamente o cobre e zinco (Vetter 2005).

Num estudo efetuado com uma espécie de boletos (*Suillus grevillei*) refere também que as variações de composição mineral das diferentes amostras estão relacionadas com a composição dos substratos e geoquímica dos solos de cada local (Chudzynski & Falandysz 2008).

2.3.2 Caracterização de culturas de *A. ponderosa* e estirpes fúngicas que vivem em associação com esta espécie

As amostras representativas de esporocarpos de *A. ponderosa* foram sequenciadas e apresentadas no *GenBank*, com o número de acesso HQ529373.

Durante o processo de isolamento das estirpes de *A. ponderosa*, foram isoladas diferentes estirpes fúngicas que vivem em associação com estes *Basidiomycetes*, os quais apresentaram uma cinética de crescimento mais elevada do que os cogumelos, interferindo com o processo de isolamento das estirpes de *A. ponderosa*. Na produção de culturas puras de *A. ponderosa* e no desenvolvimento de metodologias metagenômicas, é fundamental caracterizar a microbiota associada, tendo sido efetuadas culturas em placas de *Petri* contendo PDA e MEA das catorze estirpes fúngicas diferentes, obtidas durante o processo de isolamento. Na Tabela 2.7 estão apresentadas as características macroscópicas e microscópicas da microbiota isolada com as amostras de *A. ponderosa*.

As estirpes isoladas foram caracterizadas com base nas características das colônias, tais como o diâmetro da colônia, textura, coloração, pigmentos libertados e nas dimensões e características microscópicas como a morfologia da hifa, e estruturas reprodutoras assexuadas (quando presentes) recorrendo a métodos clássicos de classificação (Domsch *et al.* 1980).

As estirpes fúngicas predominantes que foi possível isolar, que vivem em associação com os cogumelos *A. ponderosa*, pertencem aos géneros *Aspergillus*, *Cladobotryum*, *Mucor* e *Penicillium*. Os isolados com os números 1, 2, 3, 4 e 5 foram identificados como estirpes pertencentes ao género *Penicillium*, observando-se as estruturas reprodutoras características, os conidióforos, com várias cadeias de conídios unicelulares chamadas de fiálides. As estirpes indicadas com os números 6 e 7 foram identificadas pertencentes ao género *Mucor*. Estes são *Zigomycetes* caracterizados por apresentarem hifas cenocíticas multinucleadas, esporangiósforos ramificados e a

produção de esporangiosporos em esporângios globulares apicais suportados e elevados por uma columela mundial (Hermet *et al.* 2012). Os isolados 8, 9 e 10 foram identificados como pertencentes ao género *Aspergillus*. As espécies pertencentes a este género apresentam conidióforos os quais terminam numa vesícula coberta por métulas (estirpe 8) ou fiálides (estirpe 9 e 10). Os isolados 11, 12 e 13 foram identificados como pertencentes ao filo *Ascomycota*. Estes fungos apresentam micélios constituídos por hifas septadas e esporos assexuados designados de conídios, os quais apresentam forma alongada, septados medianamente e produzidos nos topos das hifas (estirpe 13). Muitas espécies fúngicas produzem, tanto na natureza como em cultura, clamidósporos, células de paredes espessas subglobosas (Pöldmaa 2011). Em substratos naturais, os clamidósporos ocorrem como células individuais (Pöldmaa 2003, 2011), enquanto em cultura crescem a partir de uma célula intercalar simples em hifas aéreas ou submersas e podem ser seguidas pela formação de agregações mais complexas. Os membros dos géneros *Mucor*, *Penicillium* e *Aspergillus* são ubíquos na natureza, encontrados frequentemente em amostras ambientais, tais como o solo, o ar e a poeira e são principalmente saprófitas, no entanto, algumas das estirpes de *Penicillium* e *Aspergillus* podem causar doenças (Hermet *et al.* 2012). Os membros do género *Cladobotryum* são fungos parasitas, e os seus clamidósporos servem como estruturas de sobrevivência para superar períodos entre a disponibilidade de corpos de frutificação hospedeiros, e condições de ambiente desfavoráveis, como a seca (Pöldmaa 2011). Embora possam parecer mais importantes como parasitas de corpos de frutificação efêmeros de cogumelos, estes são encontrados também em culturas de espécies isoladas dos basidiomas mais persistentes de fungos decompositores da madeira (Douhan & Rizzo 2003; Pöldmaa 2003, 2011). Algumas espécies são parasitas obrigatórios e são apenas encontradas nos seus hospedeiros onde crescem causando infeções sistémicas que resultam na mumificação dos corpos de frutificação dos hospedeiros (Pöldmaa 2011). Outros são

considerados saprófitas facultativos pois são muitas vezes encontrados na madeira em decomposição.

O isolado 14 apresenta micélio com hifas septadas ramificadas nas extremidades, formando diferenciações terminais que poderão resultar em ansas de anastomose, características da presença de micélio secundário ou dicariótico (Figura 2.8) (Crous *et al.* 2009), pelo que se colocou a hipótese de se tratar de um isolado de *A. ponderosa*, o qual foi posteriormente submetido a sequenciação, para confirmação.

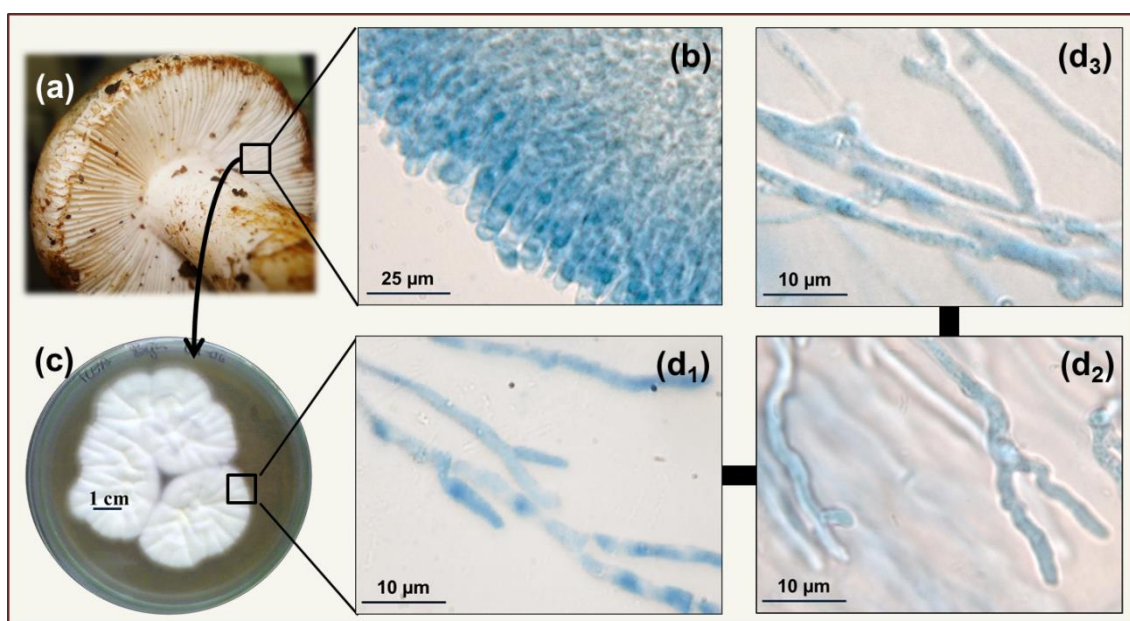

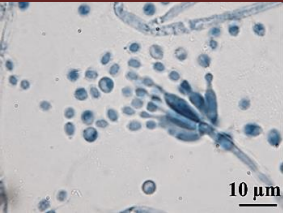



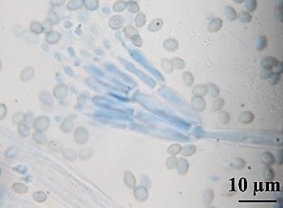

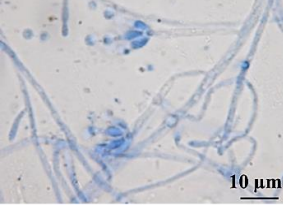



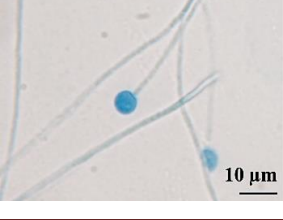

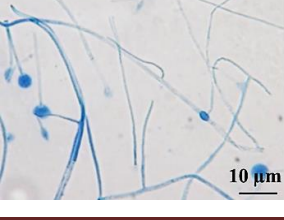





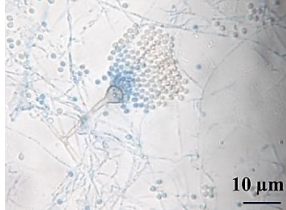

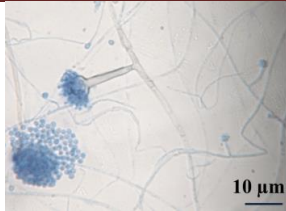





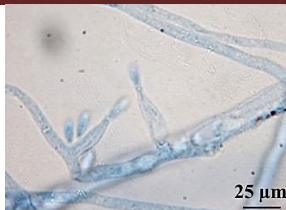


Figura 2.8. Corpo de frutificação de *A. ponderosa* (a), características micromorfológicas do himénio do corpo de frutificação, com observação dos basídios (b), micélio de *A. ponderosa* em meio sólido (c), características micromorfológicas do micélio com observação de hifas septadas ramificadas nas extremidades (d₁) e (d₂) e formação de ansas de anastomose (d₃).

Tabela 2.7. Aspectos macroscópicos e microscópicos das estirpes isoladas da microbiota de *A. ponderosa*.

| Estirpe | Aspectos macroscópicos | Aspectos microscópicos |
|--|---|--|
| <p>1 <i>Penicillium</i> sp. 1</p> |  |  |
| <p>2 <i>Penicillium</i> sp. 2</p> |  |  |
| <p>3 <i>Penicillium</i> sp. 3</p> |  |  |
| <p>4 <i>Penicillium</i> sp. 4</p> |  |  |
| <p>5 <i>Penicillium</i> sp. 5</p> |  |  |
| <p>6 <i>Mucor</i> sp. 1</p> |  |  |
| <p>7 <i>Mucor</i> sp. 2</p> |  |  |

(continua)

Tabela 2.7. (continuação) Aspectos macroscópicos e microscópicos das estirpes isoladas da microbiota de *A. ponderosa*.

| Estirpe | Aspectos macroscópicos | Aspectos microscópicos |
|---------------------------------|---|--|
| 8 <i>Aspergillus</i> sp.1 |  |  |
| 9 <i>Aspergillus</i> sp. 2 |  |  |
| 10 <i>Aspergillus</i> sp.3 |  |  |
| 11 <i>Cladobotryum</i> sp. 1 |  |  |
| 12 <i>Cladobotryum</i> sp. 2 |  |  |
| 13 <i>Cladobotryum</i> sp. 3 |  |  |
| 14 Micélio sp. 1 |  |  |

2.3.3 Perfil genético de cogumelos *A. ponderosa* e de estirpes fúngicas que vivem em associação no seu *habitat* natural

O perfil molecular de *fingerprinting* de oito amostras de *A. ponderosa* foi comparado com quatro estirpes de *Basidiomycetes*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Coriolus versicolor* e *Lactarius deliciosus*; uma estirpe de *Ascomycete*, *Terfezia arenaria*, e, em paralelo com catorze isolados fúngicos que vivem em associação com cogumelos da espécie *A. ponderosa* em seu *habitat* natural, dos géneros *Aspergillus*, *Cladobotryum*, *Mucor* e *Penicillium* e dois isolados que não foi possível identificar quanto ao género, designados de micélio sp.2 e micélio sp.3. A análise de RAPD-PCR usando o *primer* M13 gerou diferentes perfis moleculares para as amostras de *A. ponderosa*, as espécies de cogumelos comestíveis e *Ascomycetes* utilizados para comparação e as diferentes estirpes fúngicas isoladas. As Figuras 2.9 e 2.10 apresentam os eletroforetogramas de perfis de DNA resultantes dos produtos M13-PCR obtidos para as diferentes estirpes fúngicas estudadas. Os ensaios de M13-PCR produziram polimorfismos para todas as espécies diferentes testadas, resultando em padrões de bandas entre 2–20 que apresentaram uma variação de tamanho de 0,1 a 2,4 kb. Com base na análise de perfis moleculares de M13-PCR foi possível obter perfis para as amostras de *A. ponderosa* analisadas com (8–15 bandas), com fragmentos de tamanho entre 266 a 1.482 bp. (Figuras 2.9 e 2.10). A amplificação do DNA genómico das diferentes amostras por PCR com a utilização do *primer* M13 permitiu a distinção das estirpes fúngicas da classe *Basidiomycetes* das restantes estirpes fúngicas pertencentes à classe *Ascomycetes* e *Zigomycetes*. Os dendogramas obtidos (Figuras 2.11 e 2.12) permitiram agrupar em *clusters* todas as estirpes de *Basidiomycetes* com graus de similaridade de 19% (Figura 2.11) e 20% (Figura 2.12), não se observando similaridade com as restantes estirpes de diferentes classes.

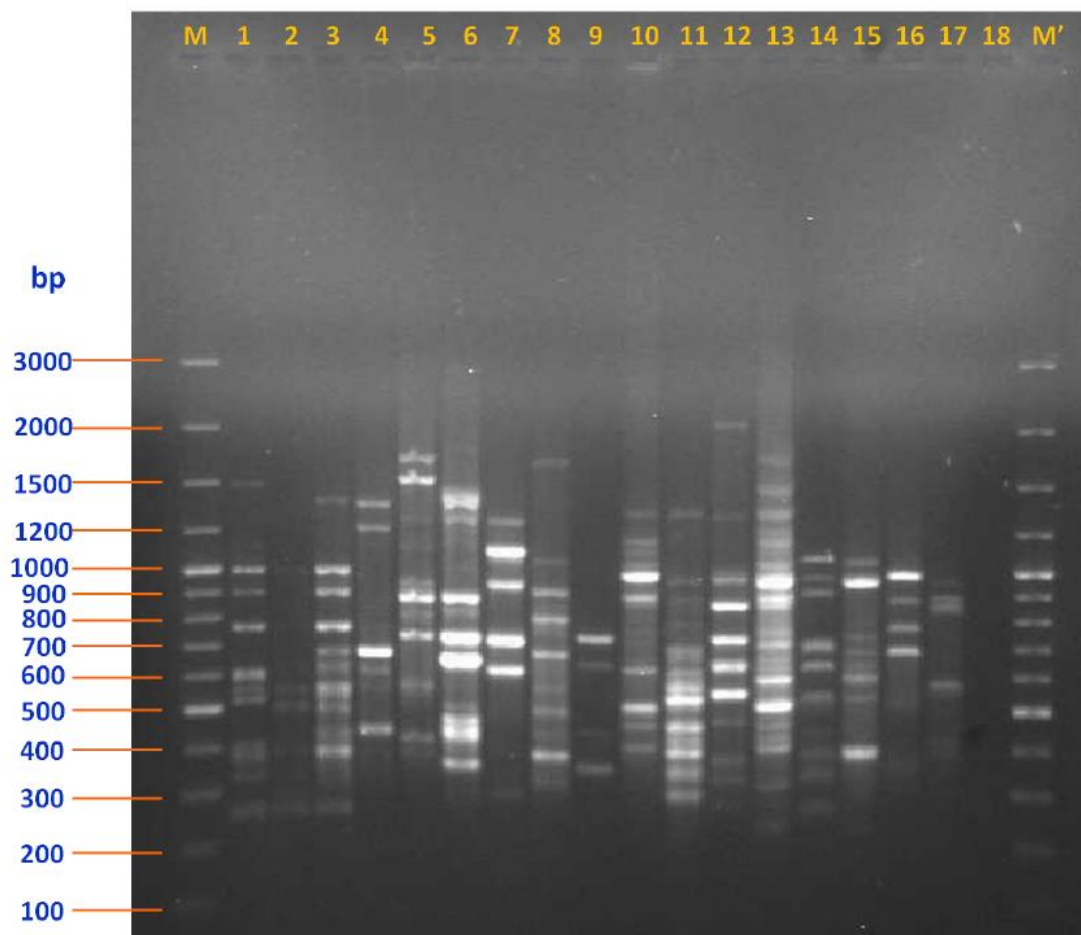


Figura 2.9. Eletroforetograma de perfis de DNA obtidos por M13-PCR *fingerprinting* correspondente ao DNA de diferentes amostras de cogumelos *A. ponderosa* recolhidos em diferentes locais, quatro estirpes de *Basidiomycetes* e dez estirpes fúngicas isoladas que vivem em associação com esta espécie de cogumelos no seu *habitat* natural. M e M': marcador de massas moleculares de DNA 100 bp Plus (Fermentas), 1 – *A. ponderosa* (Azaruja); 2 – *A. ponderosa* (Guadalupe); 3 – *A. ponderosa* (Évora); 4 – micélio sp.1; 5 – micélio sp.2; 6 – *Penicillium* sp.1; 7 – *Mucor* sp.1; 8 – micélio sp.3; 9 – *Penicillium* sp.2; 10 – *Cladobotryum* sp. 1; 11 – *Aspergillus* sp.1; 12 – *Aspergillus* sp. 2; 13 – *Cladobotryum* sp.2; 14 – *L. edodes*; 15 – *P. ostreatus*; 16 – *C. versicolor*; 17 – *L. deliciosus*; 18 – Branco.

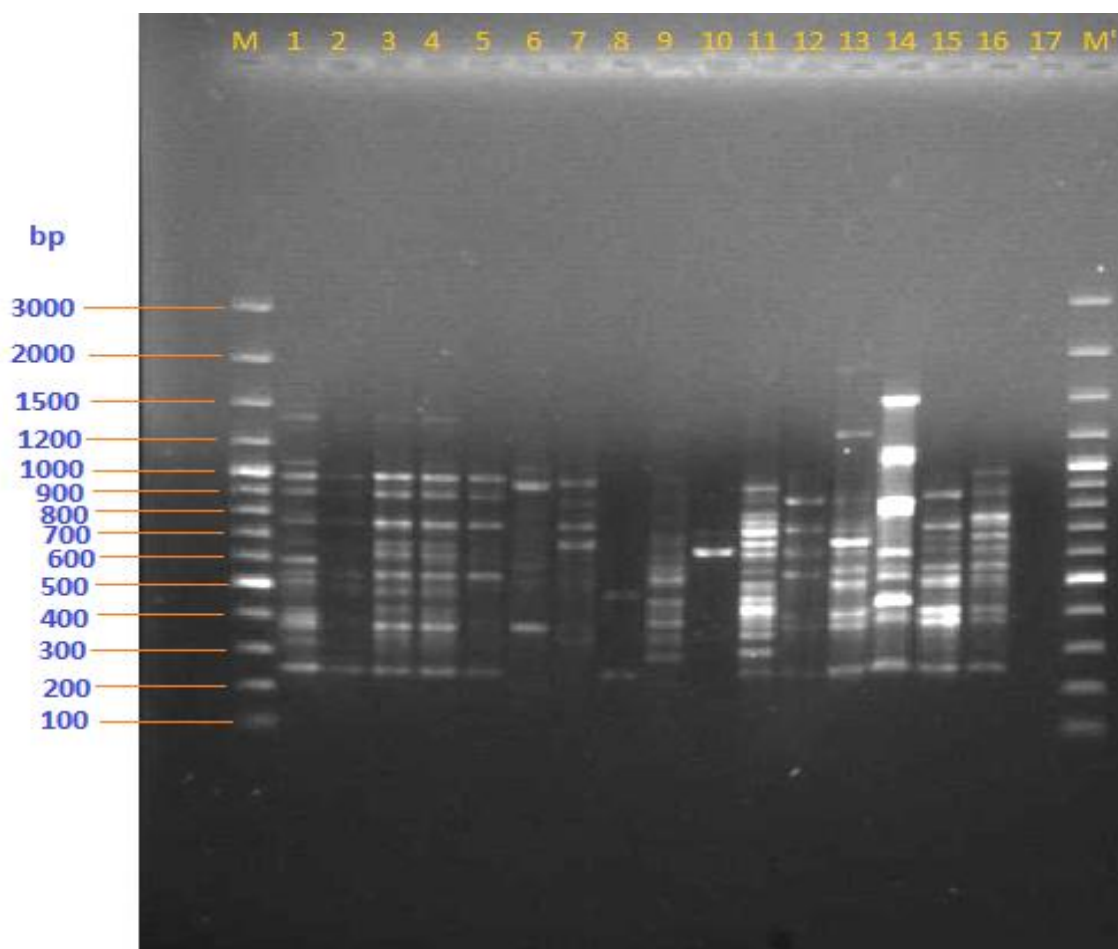


Figura 2.10. Eletroforetograma obtido através de M13-PCR *fingerprinting* correspondente ao DNA de diferentes amostras de cogumelos *A. ponderosa*, quatro estirpes de *Basidiomycetes*, uma estirpe de *Ascomycetes* e seis estirpes fúngicas de fungos isolados de *A. ponderosa*. M e M' – Marcador de DNA 100 bp Plus (Fermentas); 1 – *A. ponderosa* (Mértola); 2 – *A. ponderosa* (Rosal de la Frontera); 3 – *A. ponderosa* (S^{to} Aleixo R.); 4 – *A. ponderosa* (Beja); 5 – *A. ponderosa* (Evoramonte); 6 – *P. ostreatus*; 7 – *C. versicolor*; 8 – *L. deliciosus*; 9 – *L. edodes*; 10 – *T. arenaria*; 11 – *Mucor* sp.2; 12 – *Aspergillus* sp.3; 13 – *Penicillium* sp.3; 14 – *Cladobotryum* sp.3; 15 – *Penicillium* sp.4; 16 – *Penicillium* sp.5; 17 – Branco.

A análise dos dendogramas obtidos mostrou que todas as amostras de cogumelos *A. ponderosa* analisadas formaram *clusters* com graus de similaridade bastante elevados de 71% (Figura 2.11) e 73% (Figura 2.12). A análise polimórfica onde foi incluída a estirpe isolada nomeada como micélio sp.1, esta foi agrupada com as amostras de cogumelos *A. ponderosa* num *cluster* com 40% de similaridade, o que comprova a identificação como sendo uma das estirpes isoladas destes corpos de frutificação. Relativamente à análise dos perfis polimórficos obtidos para as restantes estirpes de *Basidiomycetes* conhecidas, a análise dos dendogramas obtidos mostrou que estas estirpes foram agrupadas num único *cluster*, tanto na primeira como na segunda análise polimórfica apresentada, com graus de similaridade de 29% (Figura 2.11) e de 20% (Figura 2.12), respetivamente. As estirpes de *Pleurotus ostreatus* e *Coriolus versicolor*, *white rot fungi*, apresentaram graus de similaridade de 61% (Figura 2.11) e 52% (Figura 2.12). A estirpe de *Lentinula edodes* foi a que apresentou graus de similaridade mais elevados com as estirpes anteriores, com valores de 44% (Figura 2.11) e 24% (Figura 2.12), seguida da estirpe de *Lactarius deliciosus*, que formou *clusters* com as restantes de 29% (Figura 2.11) e 20% (Figura 2.12).

Na Figura 2.11, observa-se que as estirpes isoladas identificadas como *Penicillium* sp.1 e *Penicillium* sp.2 formaram um *cluster* com 68% de similaridade, as estirpes identificadas como *Aspergillus* sp.1 e *Aspergillus* sp.2 foram agrupadas num *cluster* com 53% de similaridade e, estes dois agrupamentos apresentaram um grau de similaridade entre si de 27%. Todas estas estirpes pertencem ao filo *Ascomycota*. A estirpe isolada nomeada como micélio sp.2, a qual não foi possível proceder à identificação quanto ao género, apresentou um grau de similaridade de 10% com estas quatro estirpes, o que nos pode indicar que pertence ao mesmo filo. Os isolados pertencentes ao género *Cladobotryum*, nomeadas de *Cladobotryum* sp.1 e *Cladobotryum* sp.2, foram agrupadas num *cluster* com 81% de similaridade. O isolado designado por micélio sp.3, que se pensa tratar de um *Ascomycota*, apresentou uma proximidade de 56% com estas estirpes. Observou-se ainda que todas estas estirpes

dos géneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladobotryum*, pertencentes ao mesmo filo (*Ascomycota*), foram agrupadas num mesmo *cluster* com 4% de similaridade. É ainda de notar que o *cluster* que inclui todas as estirpes de *Ascomycetes* mostrou uma proximidade de apenas 2% com o *cluster* que inclui todas as estirpes de *Basidiomycetes*. A estirpe isolada identificada como *Mucor* sp.1 é a mais distante das restantes estirpes, não apresentando similaridade com os *Basidiomycetes* e *Ascomycetes*, o que parece estar de acordo com o esperado, pelo facto deste isolado ser a único *Zigomycete* isolado neste estudo.

Na análise polimórfica apresentada na Figura 2.12, na qual foram utilizadas as restantes estirpes isoladas apresentadas na Tabela 2.7, o agrupamento das estirpes foi semelhante ao obtido na primeira análise. Desta forma observou-se que as estirpes isoladas identificadas como *Penicillium* sp.3 e *Penicillium* sp.5 formaram um *cluster* com 30% de similaridade, e por sua vez a estirpe *Penicillium* sp.4 formou um *cluster* de 25% de similaridade com estas. A estirpe identificada como *Aspergillus* sp.3 foi a que apresentou maior proximidade com as estirpes do género *Penicillium*, formando um *cluster* com 18% de similaridade. A estirpe de *Terfezia arenaria* apresentou uma proximidade de 12% com as anteriores e por último a estirpe identificada como *Cladobotryum* sp.3 mostrou uma proximidade de 8% com restantes *Ascomycetes*. A estirpe isolada identificada como *Mucor* sp.2 foi a que se apresentou mais distante de todas as outras com um grau de similaridade de apenas 2%. O *cluster* que inclui todas as estirpes de *Ascomycetes* e *Zigomycetes* não apresentou qualquer proximidade de polimorfismo com o *cluster* que inclui todas as estirpes de *Basidiomycetes*.

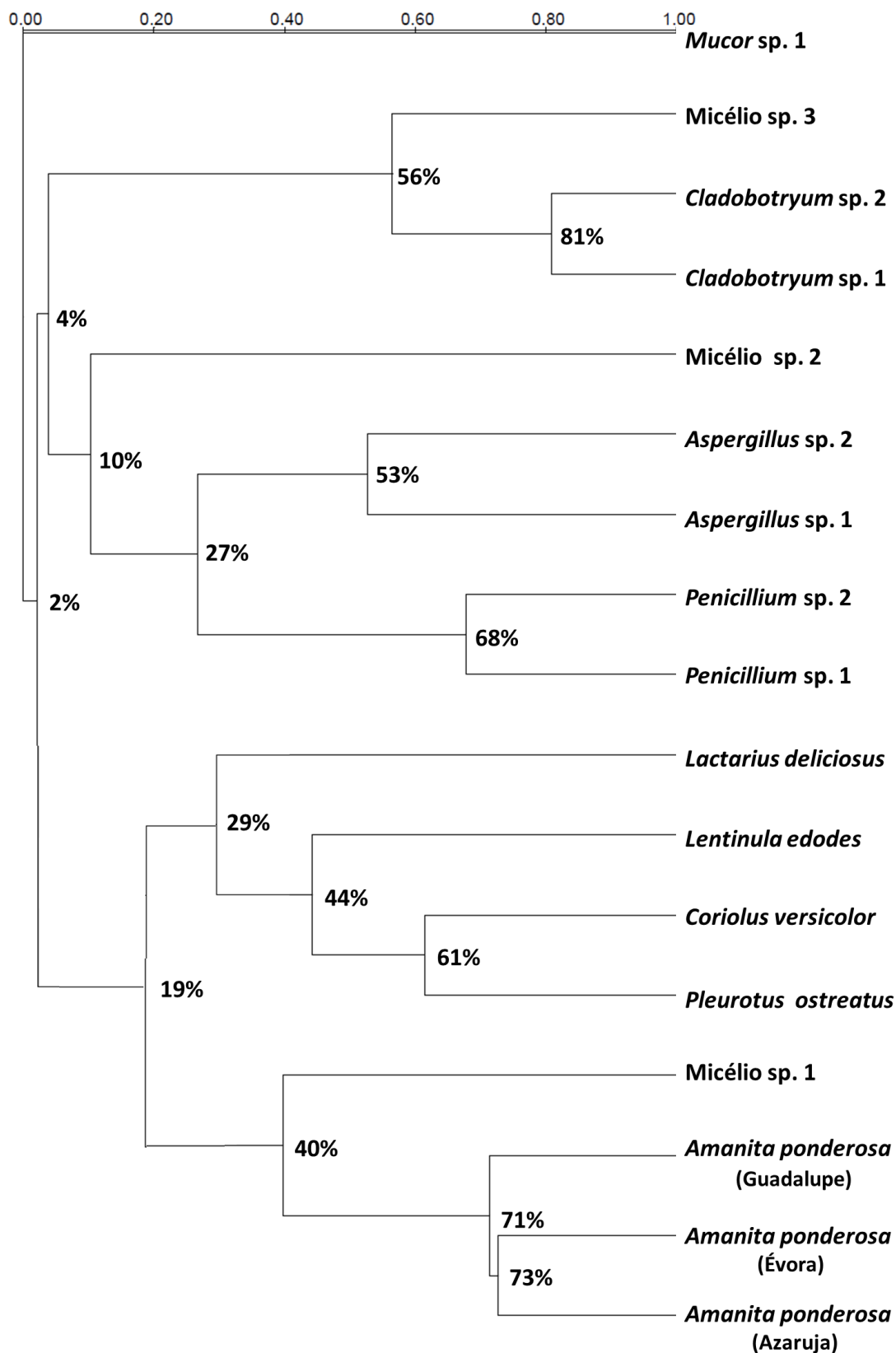


Figura 2.11. Dendrograma baseado na análise dos perfis genéticos obtidos após M13-PCR *fingerprinting* para três amostras de *A. ponderosa*, quatro estirpes de *Basidiomycetes* (*P. ostreatus*, *C. versicolor*, *L. edodes* e *L. deliciosus*) e dez estirpes fúngicas isoladas fúngicas isoladas. Os valores de distância entre os *clusters* são expressos como percentagem de similaridade (0-100%).

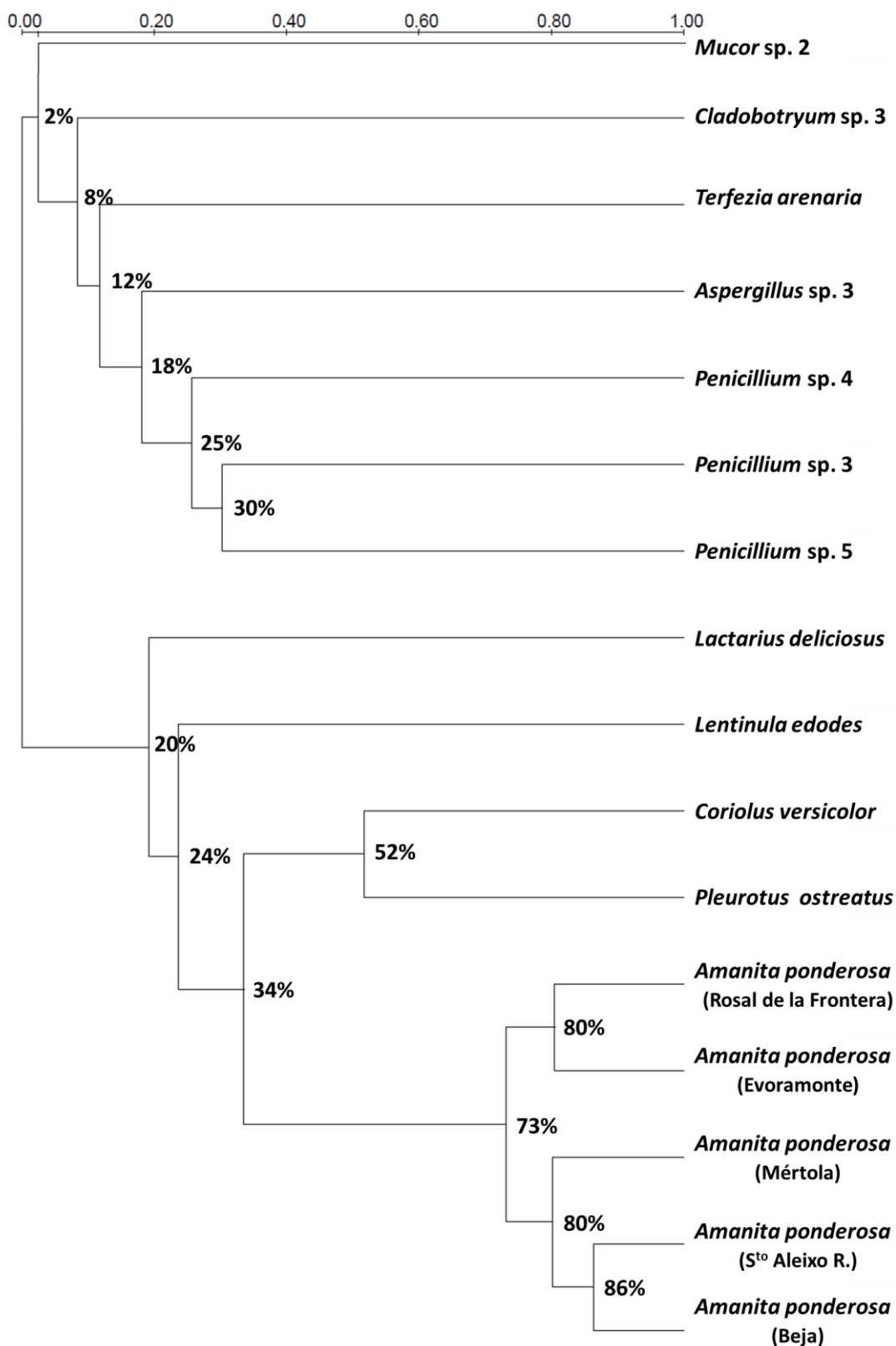


Figura 2.12. Dendrograma baseado na análise dos perfis genéticos obtidos após M13-PCR *fingerprinting* para cinco amostras de *A. ponderosa*, quatro estirpes de *Basidiomycetes* (*P. ostreatus*, *C. versicolor*, *L. edodes* e *L. deliciosus*), uma estirpe de *Ascomycete*, *T. arenaria*, e seis estirpes fúngicas isoladas. Os valores de distância entre os *clusters* são expressos como percentagem de similaridade (0-100%).

Neste estudo, a técnica de M13-PCR *fingerprinting* permitiu caracterizar o perfil molecular da espécie *A. ponderosa*, possibilitando distingui-la de outras espécies de fungos pertencentes à sua flora microbiana, identificados quanto ao género, assim como de outras estirpes de *Basidiomycetes* conhecidas.

Este método de *fingerprinting* permitiu ainda a obter uma distinção entre as diferentes estirpes testadas, com diferentes perfis moleculares, e com graus de proximidade suficientes de forma a proceder ao seu agrupamento em *clusters* de acordo com o género ao qual pertencem.

Desta forma, esta técnica de análise molecular permitiu a diferenciação de todos os isolados ao nível da espécie, possibilitando ainda distinguir estirpes da de *A. ponderosa* de diferentes regiões. Esta análise, embora permita produzir *fingerprints* de forma muito semelhante em diferentes estirpes das mesmas espécies (Alves *et al.* 2007; Caldeira *et al.* 2009; Salvador *et al.* 2013c), viabiliza uma deteção da variabilidade intraespecífica no sentido de possibilitar a identificação de diferentes polimorfismos entre estirpes das mesmas espécies (Caldeira *et al.* 2009; Ragonezi *et al.* 2013; Salvador *et al.* 2013b; Salvador *et al.* 2013c). Consequentemente, considera-se que a técnica de M13-PCR é um método rápido para proceder à caracterização dos perfis genéticos de diferentes estirpes de *A. ponderosa* com elevada reprodutibilidade e similaridade, permitindo uma tipagem que pode ser muito útil para o processo de certificação desta espécie.

Estas técnicas baseadas na análise de DNA são marcadores práticos para a utilização em fenotipagem molecular de grande número de espécies de fungos. As técnicas de análise molecular, nomeadamente o RAPD, são comumente utilizados como ferramentas para a classificação taxonómica de fungos pelo facto de permitirem discriminar as estirpes fúngicas isoladas de um nível intragenérico para o nível de estirpe (Alves *et al.* 2007).

Têm sido descritos na literatura inúmeros estudos moleculares baseados na análise da região ITS, com a finalidade de proceder à caracterização e identificação de diferentes

espécies de cogumelos comestíveis (Douhan & Rizzo 2003; Firenzuoli *et al.* 2007; Moncalvo *et al.* 2000; Moncalvo *et al.* 2002; Moreno *et al.* 2008; Ro *et al.* 2007), como é o caso do estudo de algumas espécies do género *Amanita*, recolhidas em diferentes locais de Espanha, através de ITS-ARDRA (González *et al.* 2002), e mais recentemente o estudo que visou a distinção das espécies *A. ponderosa* e *A. curtipes*, pela análise de restrição da região ITS (Moreno *et al.* 2008). Existe ainda um estudo de sequenciação parcial de duas amostras de *A. ponderosa* de Espanha, o qual apresenta sequenciação parcial das regiões 18S e 26S de rRNA, a sequenciação total da região ITS1-5.8S-ITS2 rRNA (Cornejo *et al.* 2003).

Os métodos de *fingerprinting* referidos, M13-PCR, rep-PCR (*repetitive-sequence-based PCR*) e RAPD têm sido bastante utilizados no sentido de proceder à discriminação entre espécies de fungos (Alves *et al.* 2007; Caldeira *et al.* 2008; Caldeira *et al.* 2009). As vantagens destas três metodologias são a simplicidade, disponibilidade universal de *primers* de PCR, reprodutibilidade e acessibilidade na análise de bases de dados informáticas. É possível construir bases de dados de *fingerprints* que podem ser utilizadas para identificação de rotina dos isolados por uma simples comparação de *fingerprints* com os das culturas de referência.

A maior vantagem dos métodos de *fingerprinting* sobre o método ARDRA é que, nos primeiros, não há necessidade de um passo que envolva a digestão de *amplicons* (produtos de amplificação de PCR) com endonucleases de restrição (Alves *et al.* 2007).

Na realidade o método de M13-PCR é fácil de implementar, necessita de menos tempo de execução do que outras abordagens moleculares que utilizam enzimas de restrição, apenas necessita de um único *primer* ou um conjunto de *primers* e alcança níveis mais elevados de reprodução. De facto, estas características tornam o processo muito mais rápido, mais fácil e com redução significativa de custo. Além disso, envolve menores custos de instrumentação e *imput* de trabalho, requer de pouco

conhecimento da biologia molecular das espécies em estudo e nenhuma informação da sua sequência genética.

O método de M13-PCR *fingerprinting* tem sido utilizado em estudos de variabilidade genética de espécies de fungos filamentosos (Alves *et al.* 2007; Godoy *et al.* 2004; Guimarães *et al.* 2011b; Lopes *et al.* 2007), indicando um grande potencial que estas metodologias têm como ferramentas de diagnóstico. Esta técnica tem sido também utilizada em estudos sobre a biodiversidade de fungos em ecossistemas (Guimarães *et al.* 2011a; Guimarães *et al.* 2011b), diferenciação de espécies e estirpes de fungos filamentosos (Meyer *et al.* 1991), e caracterização de espécies fúngicas isoladas de plantas hospedeiras (Guimarães *et al.* 2011a; Ma & Michailides 2002). É ainda considerado um método de DNA *fingerprinting* de primeira escolha em laboratórios clínicos envolvidos em estudos epidemiológicos de rotina.

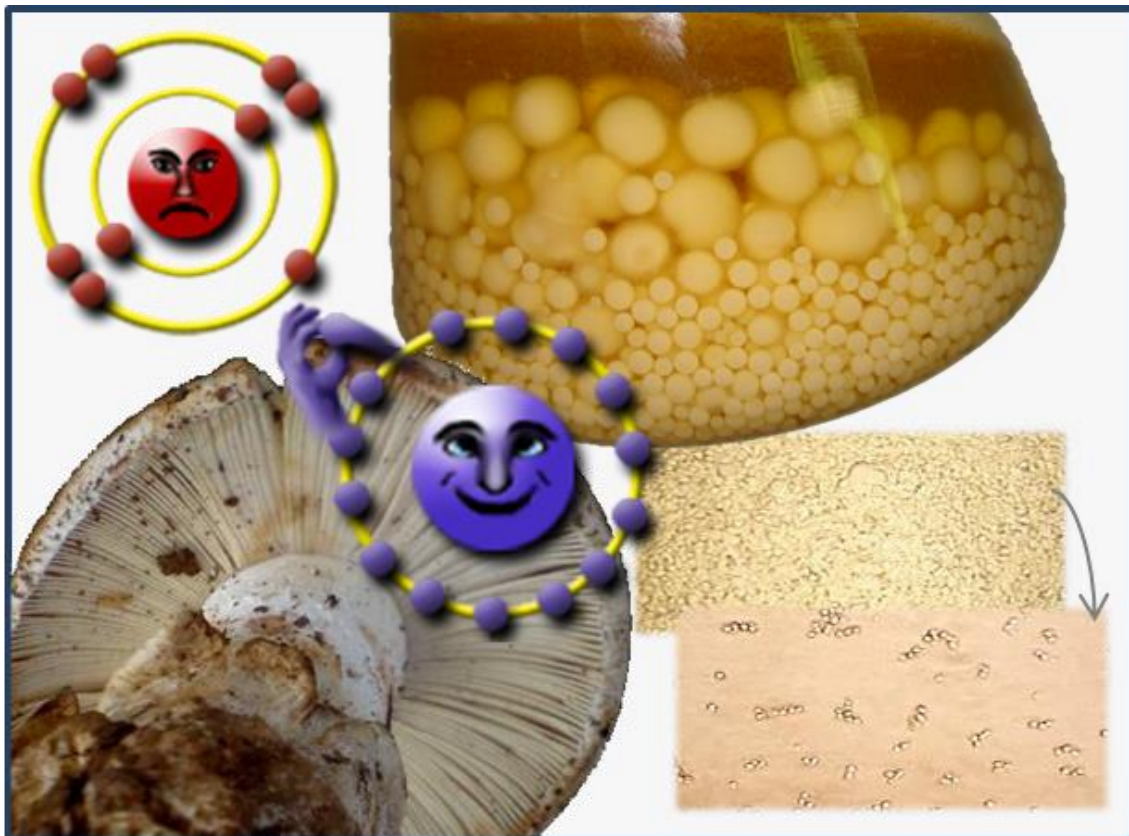
No estudo descrito neste capítulo permite-nos retirar as seguintes relações:

As análises inorgânicas das amostras de cogumelos e de solos mostraram que o conteúdo mineral dos cogumelos depende do ecossistema onde crescem.

A análise molecular efetuada por M13-PCR mostrou a obtenção de diferentes perfis genéticos para as amostras de corpos de frutificação de *A. ponderosa*, outras espécies de *Basidiomycetes* e algumas estirpes fúngicas vivem em associação com estes cogumelos em seu *habitat* natural. Esta abordagem molecular permitiu diferenciar, rápida e reprodutivamente, as diferentes estirpes testadas, possibilitando agrupá-las de acordo com o género a que pertencem. A análise por *fingerprinting* permitiu ainda distinguir diferentes amostras de cogumelos de *A. ponderosa* recolhidos em diferentes regiões, exibindo uma abordagem bastante discriminatória.

Desta forma, esta metodologia poder ser uma ferramenta útil para o desenvolvimento de uma estratégia para o processo de certificação da espécie *A. ponderosa*.

Produção e atividade biológica de compostos bioativos produzidos em culturas de *A. ponderosa*



3.1 Introdução

O *stress* oxidativo pode estar envolvido na gênese de diferentes patologias, como por exemplo, cardiovasculares, doenças hepáticas, aterosclerose, artrite reumatoide, e outras patologias inflamatórias e crescimento tumoral, bem como processos degenerativos associados ao envelhecimento, como é o caso da doença de *Alzheimer* (Vaz *et al.* 2011b). A produção de radicais livres ocorre durante o metabolismo aeróbio celular, principalmente na forma de espécies reativas de oxigênio (ROS - *reactive oxygen species*) (Barros *et al.* 2007c; Vaz *et al.* 2011b). A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e os mecanismos de proteção antioxidante é uma condição essencial para homeostase do organismo (Ferreira *et al.* 2009). Na generalidade, os organismos encontram-se protegidos contra danos provocados por radicais livres pela ação de enzimas oxidativas, como a superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), ou compostos de origem exógena ou endógena, como α -tocoferol, ácido ascórbico, carotenoides, compostos polifenóis e glutationo (Reis *et al.* 2012a). No entanto, a produção descontrolada de radicais livres derivados do oxigênio leva a um *stress* oxidativo, com oxidação de proteínas, peroxidação lipídica e dano oxidativo do DNA em células e tecidos vivos (Choi *et al.* 2006).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma a permitir uma rápida seleção de substâncias e/ou misturas potencialmente interessantes, na prevenção de doenças crónico-degenerativas. Dentre estes métodos destacam-se o sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico e o método de captação de radicais livres, tais como o radical DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil. O método de oxidação do β -caroteno/ácido linoleico avalia a atividade de uma amostra ou composto na inibição de formação de radicais peróxido gerados durante a peroxidação do ácido linoleico. O método está fundamentado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoleico. Por outro lado o método de

radicais livres está baseado no descoramento de uma solução composta por radicais estáveis DPPH de cor violeta, baseando-se na capacidade de compostos antioxidantes de doar um átomo de H a um composto oxidante, formando a molécula estável DPPH-H (Duarte-Almeida *et al.* 2006; Tepe *et al.* 2007).

Nos últimos anos, o aumento do interesse na saúde humana, nutrição e prevenção de doenças permitiu alargar a procura de alimentos funcionais, designadamente em suplementos alimentares com antioxidantes naturais, que podem ser utilizados para ajudar a reduzir os danos oxidativos do organismo. Alguns compostos naturais com propriedades antioxidantes têm sido utilizados em aplicações farmacêuticas, nomeadamente como coadjuvantes do tratamento de doenças crónicas em que há produção de radicais livres, como por exemplo as doenças de *Parkinson* e *Alzheimer* (Heleno *et al.* 2010).

Os cogumelos são apreciados, não só pela textura e sabor, mas também pelas suas propriedades químicas e nutricionais, sendo algumas espécies referidas como alimentos funcionais (Elmastas *et al.* 2007). As propriedades medicinais associadas a várias espécies de cogumelos comestíveis, e/ou de extratos derivados, têm sido extensivamente investigadas e descritas e a sua atividade antitumoral tem sido objeto de amplo interesse (Zhao *et al.* 2010). Os extratos derivados de cogumelos com compostos bioativos tais como os compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonóides) e tocoferóis (Heleno *et al.* 2010), ácido ascórbico e carotenóides (Ferreira *et al.* 2009), e polissacáridos (Arteiro *et al.* 2012; Cheng *et al.* 2008; Salvador *et al.* 2012), têm sido descritos como potenciais agentes com inúmeras propriedades terapêuticas, nomeadamente antioxidantes e antitumorais. (Ferreira *et al.* 2007; Nada *et al.* 2010).

Pelo facto de muitas espécies de cogumelos comestíveis consumidos apresentarem propriedades medicinais essenciais, é imperativo identificar o potencial biológico e farmacológico destas espécies, em especial cogumelos silvestres. A identificação destas possíveis propriedades nutracêuticas e medicinais permitirão ajudar num melhor

conhecimento das espécies de forma a poder avançar para um processo de comercialização como alimentos funcionais (Venkatakrishnan *et al.* 2010; Zhao *et al.* 2010).

As doenças cancerígenas continuam a ser uma das principais causas de morte dos países desenvolvidos, sendo o carcinoma da mama a segunda causa de morte por tumores, entre as mulheres (Hsieh *et al.* 2011; Ravikumar *et al.* 2012).

Os cogumelos comestíveis da espécie *A. ponderosa* têm sido pouco estudados, existindo na bibliografia apenas referências a estudos de composição mineral (Moreno-Rojas *et al.* 2004) e análise molecular (Caldeira *et al.* 2009; Moreno *et al.* 2008; Salvador *et al.* 2013b; Salvador *et al.* 2013c). Neste capítulo, avaliam-se as propriedades antioxidantes destes cogumelos silvestres comestíveis, bem como o efeito antiproliferativo das culturas em células humanas de tumor mamário (MDA-MB-231). Esta linha celular tumoral, proveniente de um carcinoma mamário altamente metastático, é constituída por células derivadas de um fluido de efusão plural metastático e são amplamente utilizados como modelo para tumores do subtipo triplo negativo (Lin *et al.* 2011).

3.2 Metodologia

3.2.1 Amostras

As amostras de corpos de frutificação de *A. ponderosa*, recolhidos em três locais diferentes: Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R., foram preparadas como descrito na secção 2.2.1 submetidas a secagem a 60°C, em estufa, durante 48 h, antes da análise.

As estirpes de *A. ponderosa* isoladas de corpos de frutificação (secção 2.2.3), dos locais acima referidos, foram também utilizadas neste estudo.

3.2.2 Culturas líquidas

As culturas puras de *A. ponderosa* foram transferidas para novas placas com meio de cultura PDA fresco e incubadas a 28°C durante 7 dias de forma a promover o seu crescimento. As culturas em *batch* foram preparadas em frascos de agitação contendo 500 mL de meio de cultura *malt extract* (Anexo A, Tabela A.5) com 20 g L⁻¹ de glucose. As culturas líquidas foram inoculadas com um inóculo de cultura, preparado em soro fisiológico, contendo 10⁸ UFC/ mL e foram incubadas a 28°C, durante 15 dias, em agitador orbital, a 150 rpm (Figura 3.1 (a) e (b)).

Todos os reagentes utilizados são de elevado grau de pureza (Sigma).



Figura 3.1. Produção de culturas líquidas de micélios isolados de *A. ponderosa*: incubação a 28°C em agitação orbital, a 150 rpm (a) e aspeto da cultura crescida ao fim de 15 dias de incubação (b).

3.2.2.1 Obtenção da biomassa

O caldo de fermentação foi centrifugado a 10.000 *g*, durante 15 min, de forma a promover a separação do micélio do sobrenadante das culturas. A biomassa foi lavada com água destilada e as amostras (micélios e sobrenadantes) foram conservadas a -20°C para posteriores determinações ou com posterior liofilização.

3.2.3 Extração dos compostos lipofílicos

Os compostos lipofílicos foram extraídos das amostras secas de corpos de frutificação e micélios liofilizados das culturas das três estirpes referidas. As extrações foram efetuadas com 25 g de massa seca das amostras e 400 mL de diclorometano, num extrator *Soxhlet* de 250 mL (Figura 3.2 (a) e (b)). A extração foi efetuada a 40°C, com ciclos de extração de 20 min, tendo-se efetuado um total de 9 ciclos. Os extratos foram evaporados à secura, utilizando o evaporador rotativo e dissolvidos em 1 mL de água destilada.



Figura 3.2. Representação da montagem do extrator *Soxhlet* para a extração dos compostos lipofílicos (a), pormenor do cartucho contendo a amostra liofilizada de corpos de frutificação e micélios de *A. ponderosa* (b).

3.2.4 Extração de compostos fenólicos pelo método de desintegração com areia

O método de desintegração com a areia (*SSDM – sea sand disruption method*) consiste na utilização de areia do mar, previamente tratada, como matriz sólida (Teixeira *et al.* 2006) em colunas para extração de compostos fenólicos.

As amostras (500 mg) de corpos de frutificação secos e de micélios e sobrenadantes liofilizados foram colocadas num almofariz de vidro com 2 g de areia do mar (proporção 1:4) e 2,0 mL de n-hexano. As amostras foram misturadas com a areia com o auxílio de um pilão na presença de azoto líquido, de modo a obter uma mistura homogênea apropriada para o empacotamento da coluna. A mistura foi transferida para uma seringa de 5 mL com três círculos de papel de filtro na parte inferior. Após a colocação e empacotamento de toda a mistura na seringa, esta foi coberta com outro círculo de papel de filtro e comprimida com o auxílio do êmbolo da seringa (Teixeira *et al.* 2006).

O conteúdo da seringa foi então seco sob vácuo antes da eluição. Os compostos fenólicos foram eluídos com 10 mL de uma solução de metanol: água (9:1, v/v) (Figura 3.3). Todos os extratos foram secos sob vácuo, dissolvidos em 1,0 mL de água destilada e filtrados através de filtros de 0,45 µm (*Millipore HA*).

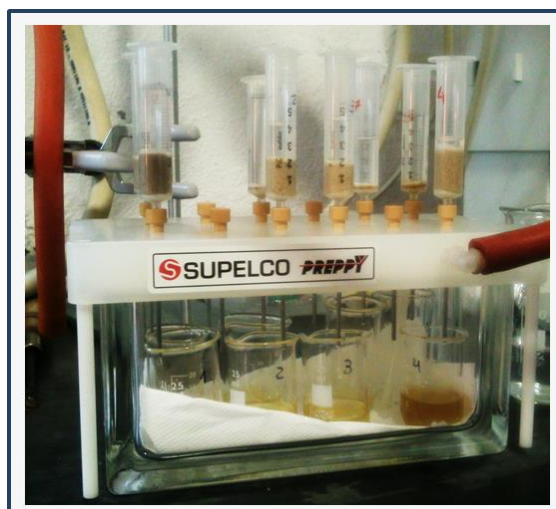


Figura 3.3. Representação da montagem da câmara de vácuo para a extração dos compostos fenólicos totais nas amostras de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das culturas.

3.2.4.1 Quantificação de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu

A concentração de compostos fenólicos totais presentes nos extratos foi determinada espectrofotometricamente através do método de Folin-Ciocalteu adaptado a microplaca (Box 1984). Foram preparadas soluções de ácido cafeico com concentrações compreendidas entre 10 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para construção de uma curva de calibração (Anexo C, Figura C.1). Aplicaram-se na microplaca 235 μL de água destilada e adicionaram-se 5 μL de padrão ou amostra. Adicionaram-se 15 μL de Folin-Ciocalteu a cada poço. Após 5 min foram adicionados 45 μL de solução saturada de carbonato de sódio a 20% (Barros *et al.* 2009). Incubou-se a placa durante 30 min a 40°C. De seguida leu-se a absorvância a 630 nm em leitor de microplaca (*ELX800G model, Biotek Instruments Inc. and Gen 51.5 software, Biotek*). Os ensaios foram realizados em sextuplicado. Os resultados foram expressos em μg de ácido cafeico por mg de massa seca de extrato fenólico total.

3.2.5 Extração dos complexos proteína-polissacárido dos corpos de frutificação e culturas

A extração dos complexos proteína-polissacárido (PPS) extra e intracelulares das culturas líquidas e corpos de frutificação das diferentes estirpes de *A. ponderosa* efetuou-se de acordo com Lee *et al.* (2006). Os extratos PPS extracelulares foram extraídos do sobrenadante das culturas por precipitação com a adição de 2 volumes de etanol a 96% (Figura 3.4 (a)). A mistura foi deixada a repousar *overnight* a 4°C, para facilitar a precipitação dos complexos. Para isolamento dos extratos PPS intracelulares, os corpos de frutificação e micélios das culturas, previamente secos a 60°C, foram colocados em banho de água a 90°C, durante 5 h e posteriormente centrifugados a 10.000 *g*, durante 10 min. De fora a permitir a precipitação dos PPS adicionaram-se 4 volumes de etanol a 96% ao sobrenadante obtido (Figura 3.4 (a)) e

deixou-se a repousar *overnight* a 4°C (Arteiro *et al.* 2012; Lee *et al.* 2006; Lin & Sung 2006; Salvador *et al.* 2012). Para obtenção dos extratos PPS extra e intracelulares procedeu-se à centrifugação das misturas etanólicas a 3.000 g, durante 15 min, a 4°C. Os precipitados obtidos foram ressuspensos em etanol a 75% e centrifugados nas mesmas condições. Efetuou-se a secagem dos precipitados a 60°C, de forma a permitir a remoção do etanol residual, sendo posteriormente ressuspensos em água destilada (Kim *et al.* 2002; Lin & Sung 2006).

3.2.5.1 Quantificação de polissacáridos pelo método do fenol-ácido sulfúrico

A concentração de polissacáridos presentes nos extratos de PPS extra e intracelulares foi determinada pelo método do fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.* 1956; Salvador *et al.* 2012). Este método baseia-se na reação dos glúcidos com o fenol, na presença de ácido sulfúrico concentrado, ocorrendo formação de um complexo aromático corado, que apresenta um máximo de absorção a 490 nm. Foram adicionados a tubos de ensaio 0,2 mL da amostra ou padrão, 0,2 mL de solução de fenol a 5% e 1 mL de ácido sulfúrico 95%. Aguardou-se 10 min à temperatura ambiente e agitou-se os tubos no vórtex. Aguardou-se mais 30 min antes de se ler a absorvância a 490 nm (UV-Vis *spectrophotometer Hitachi, U-3010 model*). Para determinação da concentração de polissacáridos efetuou-se uma curva de calibração utilizando soluções de glucose de concentrações compreendidas entre 6 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 3.4 (b)) (Anexo C, Figura C.2). Os ensaios foram realizados em triplicado. Os resultados foram expressos em μg de glucose por mg de massa seca de extrato de polissacáridos total.

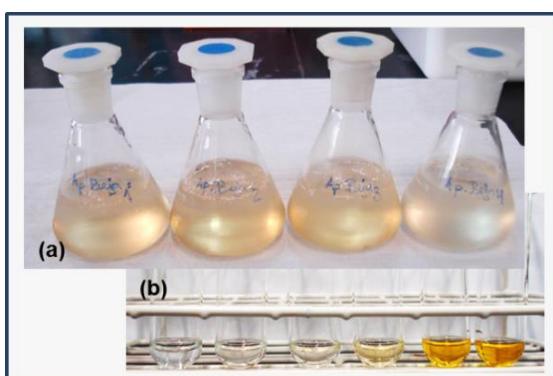


Figura 3.4. Extração dos extratos PPS extra e intracelulares por precipitação com a adição de etanol a 96% (a) e quantificação pelo método do fenol-ácido sulfúrico (b).

3.2.5.2 Quantificação de proteína pelo método de Bradford

A concentração de proteína presente nos extratos de PPS de várias estirpes de cogumelos e de culturas líquidas foi determinada pelo método de Bradford que utiliza o corante Azul de *Coomassie* G-250 (Bradford 1976). O corante Azul de *Coomassie* G-250 tem capacidade de reagir em meio ácido com os grupos amino das proteínas, ocorrendo a formação de um complexo corado, o qual tem um máximo de absorção a 630 nm. Aplicaram-se na microplaca 100 µL de amostra ou padrão e adicionaram-se 100 µL de solução de azul de *Coomassie* a 0,06% em HCl a 0,6 M. Após 5 min de incubação, procedeu-se à leitura da absorvância a 630 nm (*Automated Microplate Reader, ELX800G model, Biotek Instruments, Gen 51.5 software, Biotek*). Para quantificação da proteína, procedeu-se à construção de uma curva de calibração com soluções padrão de albumina do soro bovino (BSA) de concentrações compreendidas entre 1 e 20 µg mL⁻¹ (Anexo C, Figura C.3). Os ensaios foram realizados em triplicado.

3.2.6 Avaliação das propriedades antioxidantes

3.2.6.1 Método de redução do radical DPPH

A atividade antioxidante nos corpos de frutificação, culturas liofilizadas e nos extratos lipofílicos, fenólicos e complexos PPS foi avaliada pelo método espectrométrico do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo). Este método baseia-se na descoloração da solução de cor violeta composta por radicais estáveis de DPPH, quando há adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogénio ($\text{DPPH}^{\bullet} + [\text{AH}]_n \rightarrow \text{DPPH-H} + [\text{A}^{\bullet}]_n$), sendo a redução do radical DPPH, quantificada por espectrometria de UV-Vis a 490nm, um bom índice para estimar a capacidade antioxidante (Duarte-Almeida *et al.* 2006; Tepe *et al.* 2007).

As determinações foram realizadas adicionando-se 30 µL de amostra de extratos (1 mg mL⁻¹) a 200 µL solução etanólica de DPPH 0,1 mM. A curva de calibração foi

preparada utilizando como padrão soluções de ácido ascórbico de concentrações compreendidas entre 1 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Anexo D, Figura D.1(a)), e o controlo negativo preparado com etanol. A mistura foi homogeneizada e incubada à temperatura ambiente durante 30 min de reação na ausência total de luz. A redução do radical DPPH foi determinada pela leitura da absorvância a 490 nm em leitor de microplaca (*ELX800G model, Biotek Instruments, Gen 51.5 software, Biotek*). Os ensaios foram realizados em sextuplicado.

A capacidade de captação do radical livre DPPH (RSA – *radical scavenging activity*) foi avaliada através da descoloração da solução, como percentagem de inibição (I%), observando-se um decréscimo do valor de absorvância das amostras relativamente ao valor de absorvância do branco de acordo com a seguinte equação:

$$I\% = \frac{Abs_{490}(\text{branco}) - Abs_{490}(\text{amostra})}{Abs_{490}(\text{branco})} \times 100$$

Onde $Abs_{490}(\text{Amostra})$ é a absorvância da solução quando a amostra de extrato foi adicionada e $Abs_{490}(\text{branco})$ é a absorvância da solução de DPPH (controlo negativo).

Os resultados foram expressos em μg equivalentes de ácido ascórbico por mg de massa seca de extrato. Foram ainda testadas diferentes concentrações (0,1, 0,2, 0,5, 1,2, 4 e 8 mg mL^{-1}) de extratos liofilizados de sobrenadantes das três estirpes de *A. ponderosa*, de forma a proceder à determinação de concentração inibitória de 50% (IC_{50} – *inhibitory concentration 50%*).

A concentração de extrato de sobrenadante liofilizado, que promoveu uma atividade de redução do radical livre em 50% foi calculada a partir das curvas de dose resposta obtidas através das percentagens RSA pelas concentrações de extratos (Anexo D, Figura D.2) (Pereira *et al.* 2012; Vaz *et al.* 2011b).

3.2.6.2 Método do β -caroteno/ácido linoleico

A capacidade antioxidante dos corpos de frutificação, culturas liofilizadas e dos extratos lipofílicos, fenólicos e complexos PPS foi também determinada pela medição da capacidade de inibição dos compostos orgânicos voláteis e os hidroperóxidos de dieno conjugados resultantes da oxidação do ácido linoleico (Dapkevicius *et al.* 1998).

A solução de β -caroteno foi preparada em clorofórmico na concentração de 0,5 mg mL⁻¹. Foram adicionados à mistura 25 μ L de ácido linoleico e 200 mg do emulsionante *tween* 40. Fez-se evaporar completamente o clorofórmio usando um evaporador rotativo. Em seguida foram adicionados 100 mL de água destilada, saturada com oxigênio (30 min 100 mL min⁻¹), com agitação vigorosa. A absorvância da solução foi ajustada a 0,7, a 490nm (Pereira *et al.* 2012; Vaz *et al.* 2011b).

O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços, em que foram adicionados 35 μ L de amostra a 250 μ L da mistura reacional. Foi preparado um branco do ensaio com tampão fosfato 50 mM, pH 7,0. As placas foram incubadas a 50°C durante 2 h, de forma a promover a aceleração as reações de oxidação e iniciar a descoloração do β -caroteno. As leituras das absorvâncias foram realizadas a 490 nm (*Automated Microplate Reader, Biotek Instruments, Gen 51.5 software, Biotek*), imediatamente após a adição da emulsão (tempo zero) e após as 2 h de incubação. O ácido ascórbico nas concentrações correspondidas entre 0,2 e 4 mg mL⁻¹ foi utilizado como padrão (Anexo D, Figura D.1(b)). Os ensaios foram realizados em sextuplicado.

A diminuição do valor de absorvância das amostras ($Abs_{amostra}$) foi correlacionada com a diminuição do valor de absorvância do branco (Abs_{branco}), obtendo-se a percentagem de inibição da oxidação (I%) do β -caroteno, de acordo com a equação:

$$Abs_{branco} = Abs_{inicial} - Abs_{final}$$

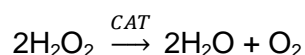
$$Abs_{amostra} = Abs_{inicial} - Abs_{final}$$

$$I\% = \frac{Abs_{490 (branco)} - Abs_{490 (amostra)}}{Abs_{490 (branco)}} \times 100$$

Onde, Abs_{490} (*Amostra*) e Abs_{490} (*branco*) são as diferenças de absorvância entre o tempo zero e ao fim de 2h de ensaio, das amostras e branco do ensaio (controlo negativo), respetivamente (Duarte-Almeida *et al.* 2006; Orhan & Ustun 2011). A concentração dos extratos foi calculada por interpolação no gráfico de percentagem de inibição da oxidação do β -caroteno pela concentração de padrão e os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido ascórbico por mg de massa seca de extrato.

3.2.6.3 Atividade enzimática da catalase (CAT)

O enzima catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) é um enzima homotetramérico, que tem como cofatores o grupo heme ou o manganês e está distribuído amplamente em todos os tecidos, predominando nos peroxissomas. Este enzima promove a redução do peróxido de hidrogénio (H_2O_2), cujos níveis podem ser alterados por exemplo pela atividade da superóxido dismutase, a água e oxigénio, de acordo com a seguinte equação:

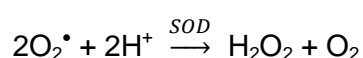


A capacidade de mimetização da atividade CAT foi determinada nos corpos de frutificação, culturas e extratos lipofílicos, fenólicos e complexos PPS, pela quantificação do decréscimo da absorvância, sendo esta diminuição proporcional à taxa de redução do peróxido de hidrogénio (H_2O_2) por ação do enzima, a 240 nm (Yoo *et al.* 2008).

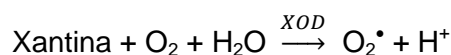
A mistura reacional foi preparada em tampão fosfato 50 mM, pH 7,0 contendo 12 μ L de H_2O_2 a 3% (v/v) e 100 μ L de amostra na concentração final de 5% (v/v), num volume final de 1 mL. Incubou-se a mistura a 37°C, durante 2 min, e determinou-se a variação do valor de absorvância a 240 nm, durante 240 s, em espectrofotómetro UV (Perkin Elmer Lambda 25). A atividade foi expressa em Unidades (μ mol/min) por mg de massa seca da amostra. Todos os ensaios foram efetuados em triplicado.

3.2.6.4 Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD)

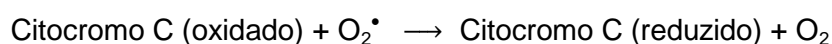
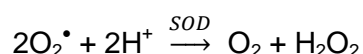
O enzima superóxido dismutase (EC 1.15.1.1) é um dos enzimas mais importantes na proteção antioxidante, que tem como função proteger o organismo dos efeitos causados pelo anião superóxido (McCord & Fridovich 1969). Este enzima, pertencente ao grupo das metaloproteínas, tem como cofatores o ferro (quando se encontra no cloroplasto), o manganês (quando se encontra na mitocôndria ou nos peroxissomas) ou o cobre e o zinco (quando se encontra no citosol ou no cloroplasto) e é responsável pela dismutação do anião superóxido a peróxido de hidrogénio e oxigénio.



Para determinar a capacidade de mimetização do enzima superóxido dismutase tem-se por base o facto do enzima xantina oxidase (XOD) reagir com a xantina na presença de oxigénio e água, dando origem a radicais superóxido, de acordo com a seguinte equação:



Na presença de citocromo C, que é reduzido pelo radical superóxido, irão ocorrer as seguintes reações acopladas:



A capacidade de mimetização da atividade da superóxido dismutase foi avaliada nos corpos de frutificação, culturas e extratos lipofílicos, fenólicos e complexos PPS pela quantificação da inibição da taxa de redução do citocromo C pelo radical superóxido observada a 550 nm, em espectrofotómetro de UV-Vis (Perkin Elmer Lambda 25).

Preparou-se uma mistura reacional, com um volume total de 1 mL, em tampão fosfato de potássio 216 mM em EDTA 1,3 mM, pH 7,8, contendo 0,72 mM de xantina, 0,11 mM de citocromo C e 50 µL amostra (3% (v/v)). A reação foi iniciada com a adição da xantina oxidase (0,075 U) e a leitura do valor de absorvância da mistura reacional foi efetuada durante 5 min, à temperatura ambiente, de forma a ler a diminuição da concentração de citocromo C oxidado (Salvador *et al.* 2012). Todos os ensaios foram efetuados em triplicado.

A percentagem de inibição foi calculada tendo em conta que a variação do valor de absorvância do branco deverá estar próximo de 0 min⁻¹, a variação do valor de absorvância do teste (sem adição de amostra) deverá estar próximo de 0,025 min⁻¹ e a variação do valor de absorvância da amostra deverá estar entre 0,005 e 0,025 min⁻¹. Assim, a percentagem de inibição (I%) da taxa de redução do citocromo C foi calculada pela expressão seguinte:

$$I\% = \frac{Abs_{550} (teste) - Abs_{550} (amostra)}{Abs_{550} (teste) - Abs_{550} (branco)}$$

Uma unidade de SOD corresponde à quantidade de enzima que produz uma inibição de redução do citocromo C em 50% num sistema acoplado com xantina oxidase pH 7,8 e a 25°C.

3.2.7 Avaliação do efeito das culturas de *A. ponderosa* em células MDA-MB231

3.2.7.1 Cultura celular e manuseamento

A linha celular MDA-MB-231 representa o subtipo de tumores humanos de mama denominado tripo negativo, devido à falta de expressão de três importantes recetores: estrogénio, progesterona e fator de crescimento epidermal. As células MDA-MB-231 foram obtidas a partir da coleção de cultura *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, EUA), cultivada e mantida em meio *Dulbecco's Modified Eagle's* (DMEM, 4,5 g L⁻¹ de glucose de e L-glutamina) (*Lonza*, Verviers, Belgium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS – *fetal bovine serum*) (*Lonza*, Verviers, Belgium) e suplementado com 1% (v/v) penicilina-estreptomicina (*Lonza* Verviers, Belgium). As culturas foram mantidas em ambiente húmido com 5% de CO₂ a 37°C (*C150, Binder GmbH*, Tuttlingen, Alemanha). Antes de atingirem a confluência, as células foram tripsinizadas com solução de tripsina (0,5 g L⁻¹) / EDTA (0,2 g L⁻¹), suspendidas em meio de cultura e cultivadas a uma densidade de 1 x 10⁶ células mL⁻¹. O procedimento para a contagem de células viáveis foi feito pelo método de exclusão com o corante azul de Tripiano (Arunasree 2010; Luo *et al.* 2012; Mota *et al.* 2012).

3.2.7.2 Proliferação celular

No *screening* da atividade antitumoral baseado na citotoxicidade, viabilidade e proliferação celular, têm sido amplamente utilizados sais de tetrazólio (Lü *et al.* 2012; Wang *et al.* 2011). O efeito dos extratos de *A. ponderosa* na proliferação celular foi determinado pelo ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (*Calbiochem*), o qual se baseia na capacidade de redução do MTT, por enzimas desidrogenases mitocondriais e agentes redutores presentes nas células vivas, transformando a solução aquosa amarela num produto púrpura insolúvel de sal de

formação (Lü *et al.* 2012; Wang *et al.* 2011). O produto de formação solúvel em lípidos pode ser extraído com solventes orgânicos e quantificado por espectrofotometria. É referido que a quantidade de sais de formação de MTT formados é diretamente proporcional ao número de células vivas (Lü *et al.* 2012).

Foram efetuadas culturas de células MDA-MB-231 em placas de 96 poços na concentração de 2×10^4 células / poço, num volume final de 100 μL e incubadas em atmosfera com 5% CO_2 e a 37°C . Após 24 h, as células foram incubadas com crescentes concentrações de extratos liofilizados de micélios e sobrenadantes de *A. ponderosa* (0.1, 30, 60, 80, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$), dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO, *cell culture grade*, *Sigma-Aldrich*) e os controlos foram efetuados com DMSO (Figura 3.5 (a), (b) e (c)). O fármaco comercial obtido de micélio seco de *Coriolus versicolor* (CORIOLUS – M.R.L. (ANEID®)) foi também testado nos mesmos valores de variação de concentração. Após 44 h de incubação a 37°C e 5% CO_2 , foi adicionado a cada poço 20 μL da solução de MTT (2.5 mg mL^{-1} em PBS), seguido de um período de incubação de 4 h. O meio de cultura foi aspirado e os cristais de formação foram dissolvidos com 100 μL da solução de DMSO/ etanol (1:1 v/v) (Figura 3.5 (d)) (Luo *et al.* 2012; Mota *et al.* 2012; Sun *et al.* 2012).

A absorvância foi lida a 570 nm num leitor de microplacas (*Bio-Rad CODA Open Microplate System*). A proliferação celular relativa foi determinada pela quantidade de MTT convertido em sal insolúvel de formação. A percentagem de proliferação foi determinada através da redução de absorvância das amostras a várias concentrações por comparação com as absorvâncias dos controlos (células sem adição de qualquer composto teste) (Mota *et al.* 2012; Yoo *et al.* 2008).

O valor de IC_{50} , definido como a concentração necessária para promover uma inibição de proliferação celular em 50%, foi calculado através da construção de curvas de dose resposta da percentagem de proliferação celular das amostras em comparação com a do controlo (sem extrato adicionado) de acordo com as diferentes concentrações.

Todos os resultados experimentais foram efetuados em triplicado ($n = 3$) para cada amostra e os valores foram apresentados com valores médios \pm desvio padrão (SD).

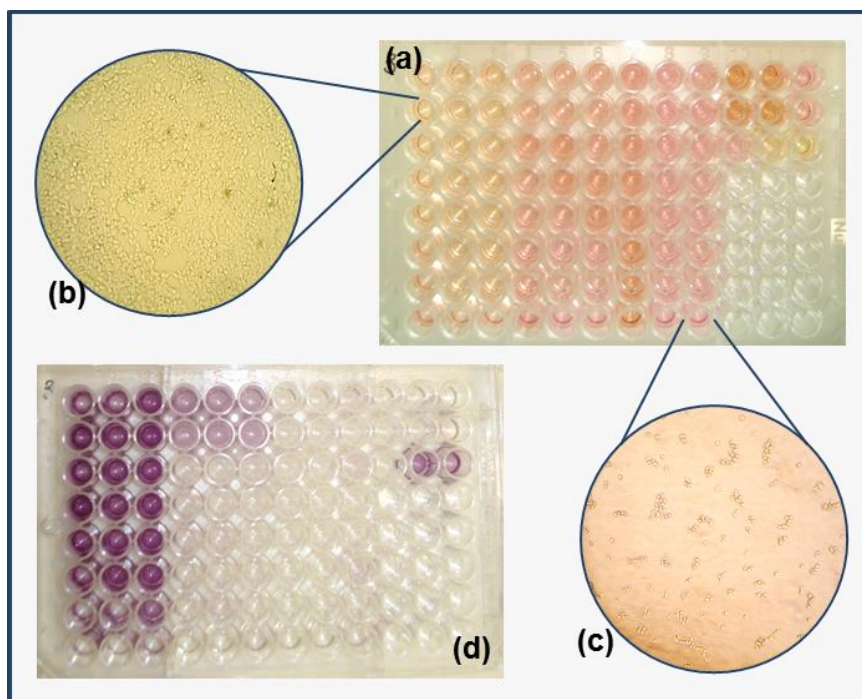


Figura 3.5. Cultura de células MDA-MB-231 em placa de 96 poços após 24 h de incubação com crescentes concentrações de extratos liofilizados de micélios e sobrenadantes de *A. ponderosa* (a), células em DMSO (b), células em presença de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ de extrato liofilizado (c) e cristais de formazina dissolvidos na solução de DMSO/ etanol (1:1 v/v) para leitura da absorvância a 570 nm (d).

3.2.8 Análise estatística

As curvas dose resposta e os valores de IC_{50} das amostras de sobrenadantes para o método do DPPH, e das amostras das culturas para o efeito antiproliferativo, foram determinados utilizando o software *OriginPro 9.0* (*OriginLab® Corporation*, 2013).

Os resultados das atividades antioxidantes, capacidade de mimetização dos enzimas CAT e SOD e o potencial antiproliferativo dos diferentes amostras e extratos foram apresentados como valores médios \pm desvio padrão (SD). Os dados foram avaliados

estatisticamente com o software SPSS[®] 21.0 para Windows Copyright[®] (Microsoft Corporation), por análise descritiva e análise de ANOVA *One-way*. A homogeneidade das variâncias populacionais foi confirmada pelo teste de *Levene* e as comparações múltiplas de médias foram avaliadas pelo teste de *Tukey*. A significância dos valores estabeleceu-se para um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Análise das propriedades antioxidantes presentes nos corpos de frutificação e nas culturas de *A. ponderosa*

Para produção de micélios de *A. ponderosa* prepararam-se culturas líquidas dos isolados de *A. ponderosa* das amostras colhidas em Beja, Mértola e S^{to} Aleixo da Restauração, durante 15 dias. O aspeto das culturas líquidas e do micélio é apresentado na Figura 3.6.

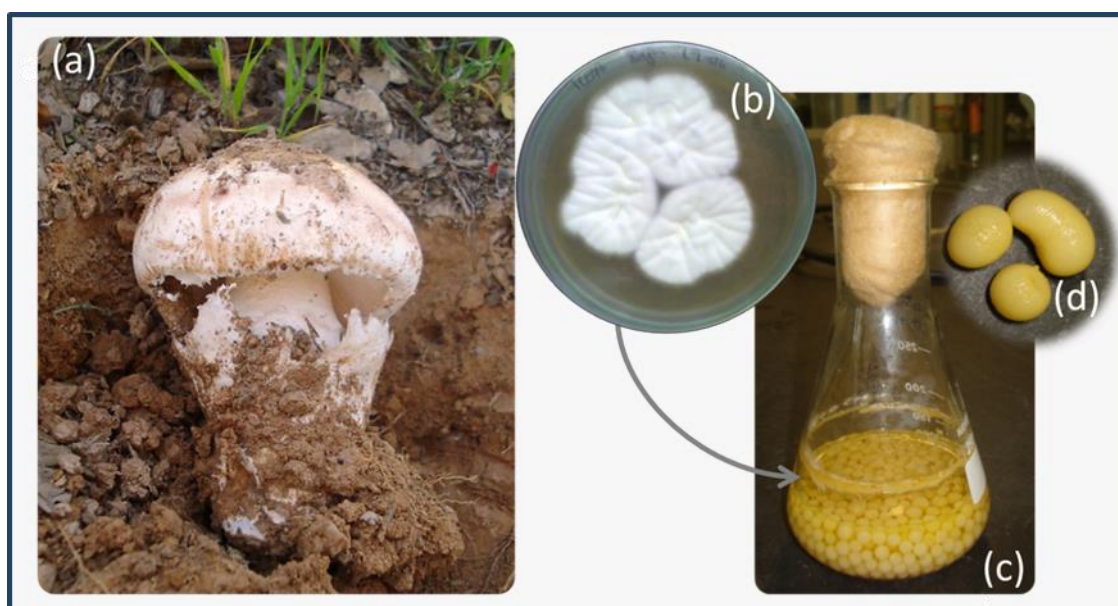


Figura 3.6. Cogumelo silvestre comestível da espécie *A. ponderosa*: características macroscópicas (a), micélio de culturas puras de *A. ponderosa* em meio sólido (b), culturas líquidas de micélios isolados de *A. ponderosa* (c), características morfológicas do micélio de *pellet* das culturas líquidas de *A. ponderosa* (d).

As culturas foram incubadas durante 15 dias, ao fim dos quais se procedeu à separação dos micélios e sobrenadantes, os quais foram liofilizados. A quantidade de micélios liofilizados obtidos para as diferentes estirpes foi de 4,8–7,5 g enquanto a quantidade de sobrenadantes liofilizados foi apenas de 1–1,4 g (Anexo I, Tabela I.1).

De forma a proceder a uma análise *screening* das propriedades antioxidantes presentes nestas amostras de corpos de frutificação e culturas de *A. ponderosa* foram

efetuados ensaios bioquímicos, tais como: a capacidade de eliminação de radicais livres DPPH (medindo a diminuição de absorção de radicais DPPH após exposição aos compostos captadores de radicais), inibição da oxidação do β -caroteno (neutralizando os radicais livres formados pela degradação oxidativa do ácido linoleico e outros radicais livres formados no sistema que atacam os modelos altamente insaturados β -caroteno) e a capacidade de mimetizar a atividade dos enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD).

O ácido ascórbico, utilizado como padrão no estudo da atividade antioxidante, apresentou valores de IC_{50} de $30,36 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $3,22 \text{mg mL}^{-1}$ para os métodos do radical DPPH e β - caroteno/ácido linoleico respetivamente. Os resultados de atividade antioxidante de corpos de frutificação e culturas líquidas de *A. ponderosa* determinados pelos métodos DPPH e β -caroteno/ ácido linoleico estão apresentados nas Figuras 3.7 e 3.8, mostrando que as amostras exibem atividade antioxidante por ambos os métodos.

Em relação ao método DPPH, os resultados mostraram que os corpos de frutificação da estirpe de Mértola apresentaram maior atividade antioxidante, com valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) das restantes amostras, enquanto as amostras de corpos de frutificação de Beja e S^{to} Aleixo R. mostraram atividades antioxidantes mais baixas e sem diferenças significativas entre si ($p > 0,05$) (Anexo J.II, Tabelas J.II.1 e J.II.2). Os extratos de micélios e sobrenadantes das culturas líquidas apresentaram valores mais elevados de atividade antioxidante para as estirpes de Mértola e de S^{to} Aleixo R., com valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

O ensaio de atividade antioxidante realizada pelo método do β -caroteno/ácido linoleico indicou que os corpos de frutificação de Mértola mostraram capacidade de inibição de oxidação mais elevada, comparativamente com os outros cogumelos testadas ($p < 0,05$). Os extratos de micélios e sobrenadantes das culturas líquidas de *A. ponderosa* a estirpe de Mértola foi a que apresentou valores de atividade antioxidante mais elevada. Os extratos de micélios de Beja e S^{to} Aleixo R. não apresentaram

diferenças significativas ($p > 0,05$), no entanto nas amostras de sobrenadantes liofilizados foram observadas diferenças significativas entre todas as estirpes testadas ($p < 0,05$). As culturas de *A. ponderosa* da estirpe de Mértola parecem ser mais eficientes em inibir a atividade dos radicais livres gerados pela peroxidação do ácido linoleico, do que as estirpes de Beja e S^{to} aleixo R.

Foi possível proceder à determinação de concentração inibitória de 50% (IC₅₀), a qual promove uma redução em 50% do radical livre DPPH, para as amostras de sobrenadantes liofilizados das culturas das três estirpes de *A. ponderosa* estudadas.

No entanto, não foi possível efetuar este estudo para as amostras liofilizadas de corpos de frutificação e micélios das culturas, devido à sua baixa solubilidade em vários solventes testados. Os valores de IC₅₀ de atividade antioxidante dos sobrenadantes liofilizados foram obtidos pela avaliação de concentrações crescentes em extrato (0,1–8 mg mL⁻¹), tendo-se observado proporcionalidade entre a concentração e a atividade antioxidante. Os sobrenadantes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R apresentaram valores de IC₅₀ de $3,11 \pm 1,13$, $1,27 \pm 1,15$ e $2,35 \pm 1,09$ mg mL⁻¹, respetivamente (Anexo D, Figura D.2 (a), (b) e (c)). O sobrenadante das culturas de *A. ponderosa* da estirpe de Mértola foi o que apresentou maior capacidade antioxidante.

A análise do efeito das espécies antioxidantes sobre os radicais livres de DPPH resulta da sua capacidade em doar iões de hidrogénio. O DPPH é um radical livre estável e aceita um eletrão ou radical de hidrogénio de forma a se tornar uma molécula diamagnética estável (Elmastas *et al.* 2007). O método de β-caroteno/ácido linoleico, que se baseia na oxidação de β-caroteno, induzida por produtos de degradação oxidativa do ácido linoleico, avalia a atividade inibidora dos extratos nos radicais livres gerados durante o processo de peroxidação (Duarte-Almeida *et al.* 2006). Todas as amostras (corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes) mostraram maior atividade pelo método de ácido β-caroteno/ ácido linoleico, no entanto o modelo de redução do radical DPPH é um método amplamente utilizado para avaliar a atividade antioxidante num tempo relativamente curto em comparação com outros métodos.

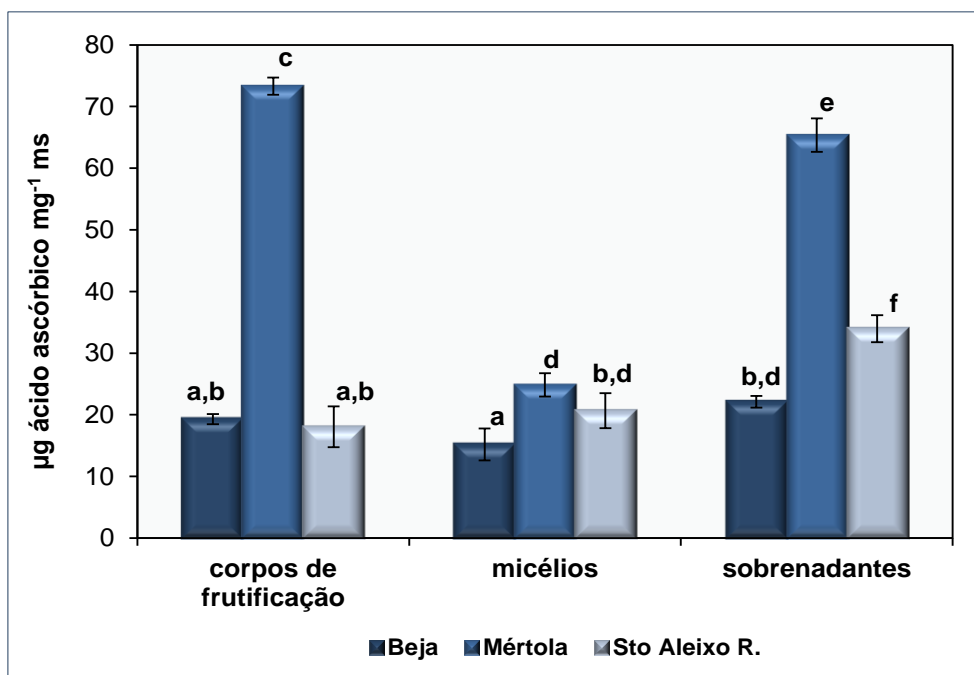


Figura 3.7. Atividade antioxidante presente nas amostras secas de corpos de frutificação de *A. ponderosa* e amostras liofilizadas de micélios e sobrenadantes das culturas líquidas das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R., avaliada pelo método do radical livre DPPH. Os valores apresentados são a média \pm desvio padrão de seis réplicas. Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si ($p < 0,05$) para cada um dos parâmetros em análise.

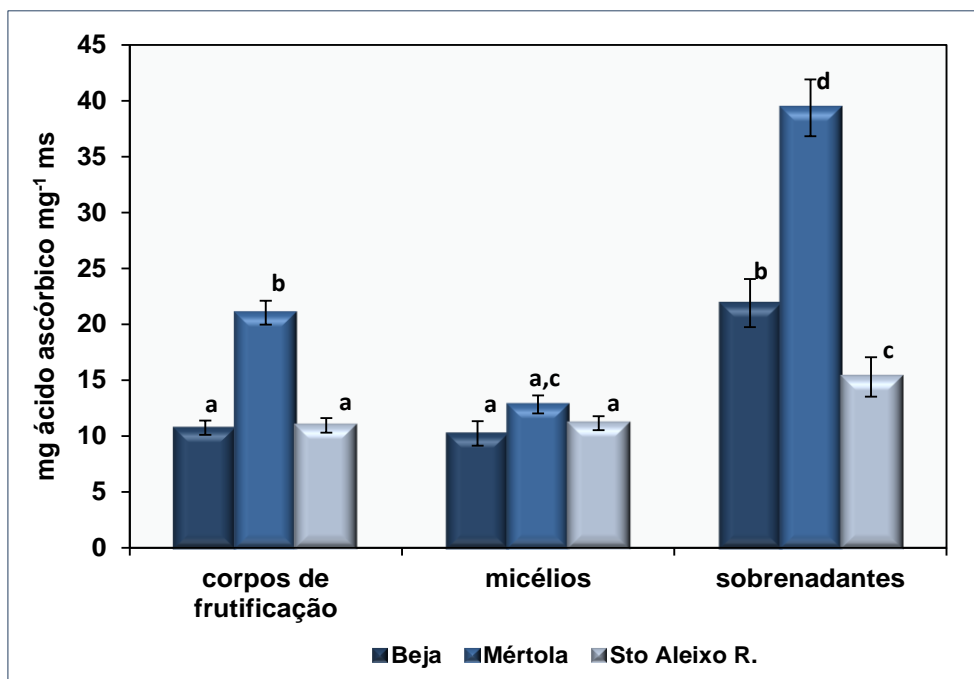


Figura 3.8. Atividade antioxidante presente nas amostras secas de corpos de frutificação de *A. ponderosa* e amostras liofilizadas de micélios e sobrenadantes das culturas líquidas das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R., avaliada pelo método do β -caroteno/ácido linoleico. Os valores apresentados são a média \pm desvio padrão de seis réplicas. Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si ($p < 0,05$) para cada um dos parâmetros em análise.

Com o objetivo de avaliar as propriedades antioxidantes dos extratos das culturas líquidas procedeu-se ainda à avaliação da capacidade dos extratos para mimetizar as atividades dos enzimas catalase e superóxido dismutase. As Figuras 3.9 e 3.10 mostram os resultados referentes à capacidade dos corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes liofilizados para mimetizar as atividades dos enzimas CAT e SOD, respetivamente. Todos os extratos apresentaram capacidade para mimetizar a atividade CAT e SOD, no entanto observou-se que os sobrenadantes liofilizados apresentaram capacidade muito superior para mimetizar a atividade CAT (Figura 3.9). Este facto poderá ser explicado pela presença de compostos bioativos, como complexos proteína – polissacáridos, que podem ter sido excretados para o meio de cultura, apresentando desta forma uma maior concentração nos sobrenadantes

Os testes de análise de variância (ANOVA) (Anexo J.II, Tabela J.II.1 e J.II.2) mostraram que os corpos de frutificação e micélios liofilizados não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as diferentes estirpes, para a atividade de CAT. Os sobrenadantes apresentaram valores de atividade enzimática CAT significativamente superiores aos das amostras de corpos de frutificação e micélios ($p < 0,05$) não apresentando diferenças significativas entre si ($p > 0,05$).

As amostras de corpos de frutificação mostraram uma atividade SOD superior comparativamente com a atividade CAT. As estirpes recolhidas em Beja e Mértola apresentaram capacidade mais elevada para mimetizar a atividade SOD do que a estirpe de S^{to} Aleixo R. ($p < 0,05$). No entanto, a atividade da SOD é maior nas culturas (micélios e sobrenadantes) do que nos corpos de frutificação. Os micélios e sobrenadantes mostraram diferenças significativas entre as estirpes ($p < 0,05$).

Outros estudos, com extratos obtidos de corpos de frutificação de *P. ostreatus*, apresentaram também capacidade para mimetizar a atividade destes enzimas (Jayakumar *et al.* 2006; Keyhani *et al.* 2002).

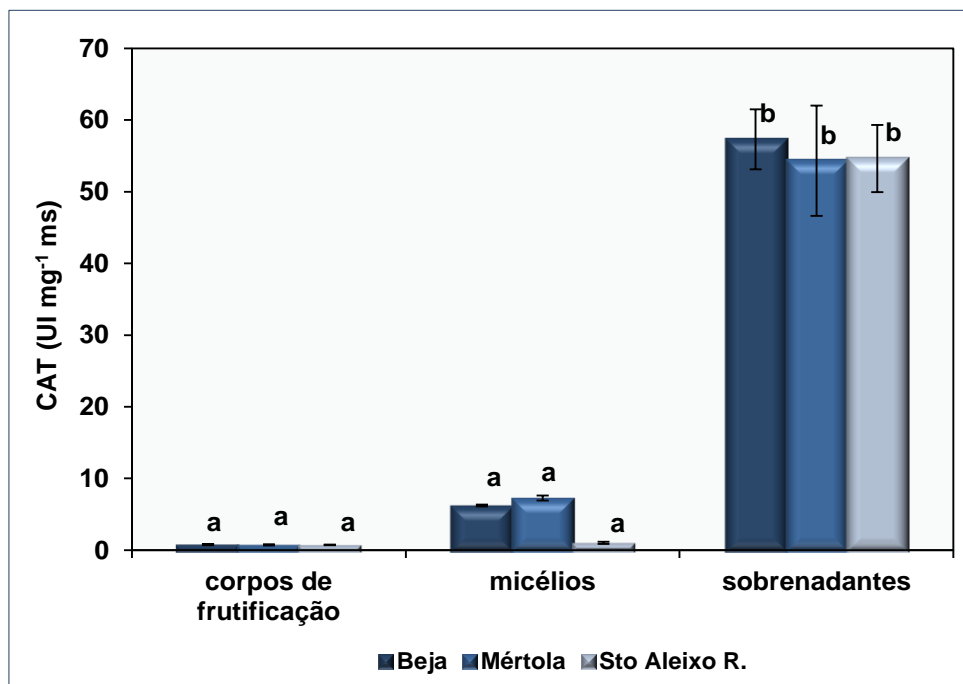


Figura 3.9. Atividade enzimática do enzima catalase avaliada em amostras secas de corpos de frutificação de *A. ponderosa* e amostras liofilizadas de micélios e sobrenadantes das culturas líquidas das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R.. Os valores apresentados são a média \pm desvio padrão de três réplicas. Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

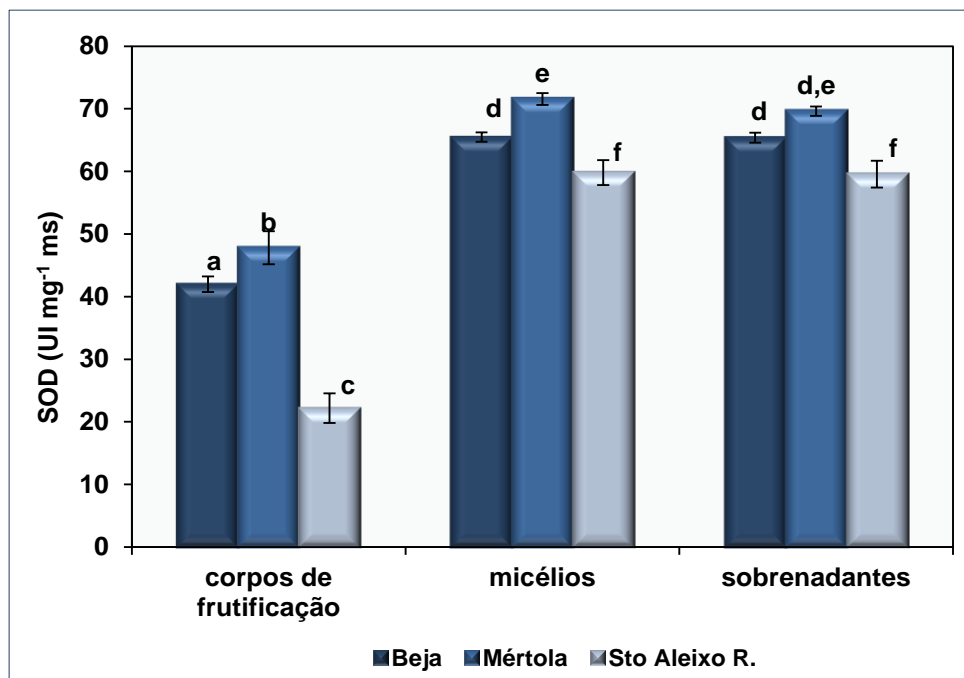


Figura 3.10. Atividade enzimática do enzima superóxido dismutase avaliada em amostras secas de corpos de frutificação de *A. ponderosa* e amostras liofilizadas de micélios e sobrenadantes das culturas líquidas das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R.. Os valores apresentados são a média \pm desvio padrão de três réplicas. Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

3.3.2 Análise das propriedades antioxidantes nos extratos lipofílicos

Os extratos lipofílicos obtidos a partir dos corpos de frutificação e micélios das culturas das três estirpes de *A. ponderosa* referidas foram avaliados também quanto à sua capacidade antioxidante.

Nas Figuras 3.11 e 3.12 estão apresentados os resultados de atividade antioxidantes avaliada pelos métodos do Radical livre DPPH e β -caroteno/ácido linoleico, respetivamente, apresentando todas as amostras atividade por ambos os métodos testados.

Relativamente aos resultados de capacidade antioxidante obtidos pelo método do radical livre de DPPH (Figura 3.11), observa-se que os extratos lipofílicos dos corpos de frutificação e micélios da estirpe de S^o Aleixo R. foram os que mostraram valores mais elevados de atividade, seguido dos extratos da estirpe de Mértola e por último os extratos da estirpe de Beja. Pela análise de variância (ANOVA), (Anexo J.II, Tabelas J.II.3 e J.II.4) observa-se que todas as amostras de extratos lipofílicos testadas apresentaram valores de atividade antioxidante significativamente diferentes ($p < 0,05$).

No caso dos resultados obtidos de atividade antioxidante avaliada pelo método do β -caroteno/ácido linoleico (Figura 3.12) observam-se valores de atividade mais próximos para os diferentes extratos lipofílicos analisados.

As amostras de corpos de frutificação e micélios das estirpes de Beja e S^o Aleixo R. não apresentam diferenças significativas entre si ($p > 0,05$), e os extratos da estirpe de Mértola também apresentam valores de atividade semelhantes ($p > 0,05$), mas significativamente diferentes das restantes ($p < 0,05$).

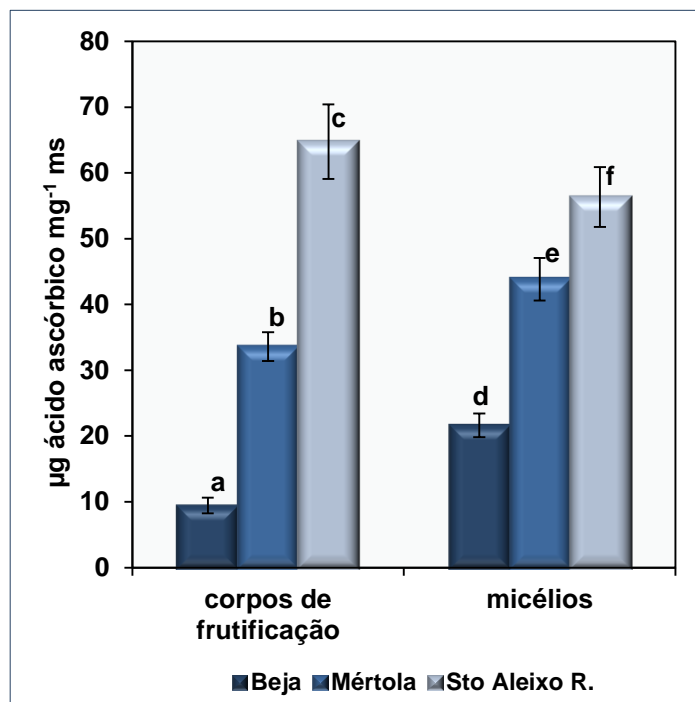


Figura 3.11. Atividade antioxidante determinada pelo DPPH presente nos extratos lipofílicos extraídos de corpos de frutificação e micélios das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R.. Os valores apresentados são a média \pm desvio padrão de seis réplicas. Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

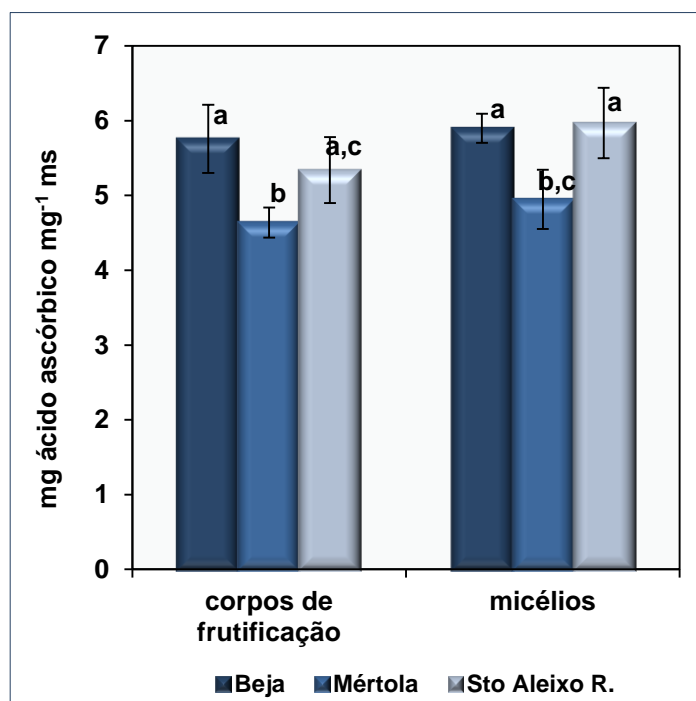


Figura 3.12. Atividade antioxidante determinada pelo método do β -caroteno/ácido linoleico presente nos extratos lipofílicos extraídos de corpos de frutificação e micélios das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R.. Os valores apresentados são a média \pm desvio padrão de seis réplicas. Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

As atividades CAT e SOD avaliadas nos extratos lipofílicos, exibidos nas Figuras 3.13 e 3.14, respetivamente, mostraram atividade para ambos os enzimas em todos os extratos.

A atividade CAT (Figura 3.13) observada mostrou que existe um ligeiro aumento de atividade para os extratos lipofílicos de corpos de frutificação, obtendo-se os valores mais elevados nas estirpes de Beja e Mértola ($p < 0,05$), sem diferenças significativas entre si ($p > 0,05$). Para os restantes extratos analisados apenas se observam diferenças significativas de atividade para os extratos lipofílicos de micélios obtidos das estirpes de Beja e S^{to} Aleixo R. ($p < 0,05$) (Anexo J.II, Tabelas J.II.3 e J.II.4).

Nos resultados de atividade SOD (Figura 3.14) observa-se que os extratos lipofílicos obtidos dos corpos de frutificação da estirpe de Beja e S^{to} Aleixo R. não apresentaram diferenças significativas de atividade ($p > 0,05$), enquanto que os extratos obtidos de corpos de frutificação de Mértola mostraram atividade SOD significativamente superior ($p < 0,05$). Os extratos lipofílicos obtidos dos micélios das culturas não apresentaram diferenças significativas entre si ($p > 0,05$).

Observa-se que estes extratos apresentam atividade CAT semelhante à observada nos corpos de frutificação e micélios liofilizados, enquanto os resultados de atividade SOD são inferiores.

Deve ainda referir-se que não foi possível obter extratos lipofílicos dos sobrenadantes das culturas, uma vez que seriam necessários volumes de culturas bastante elevados, de forma a obter a quantidade de amostras liofilizadas dos sobrenadantes necessária à extração no aparato de *Soxhlet* disponível.

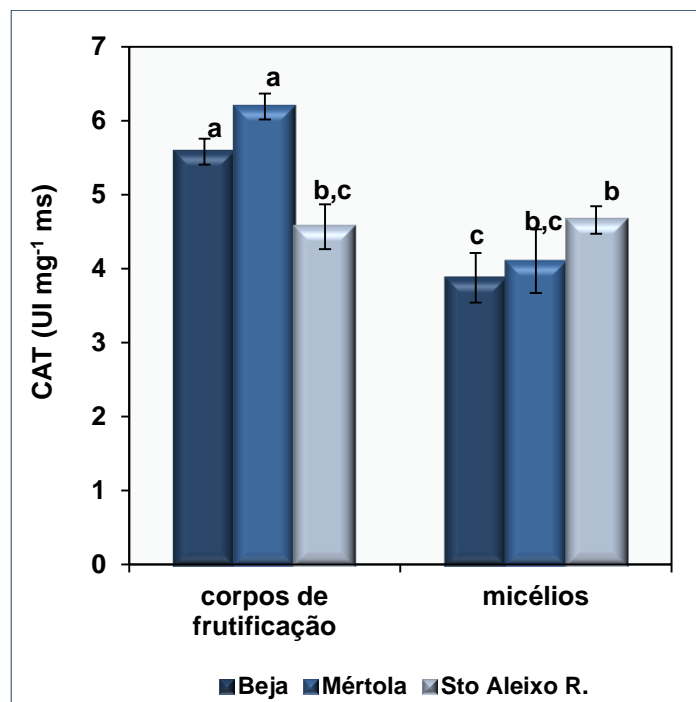


Figura 3.13. Atividade enzimática do enzima catalase avaliada extratos lipofílicos extraídos de corpos de frutificação e micélios das estirpes de Beja, Mértola e S¹⁰ Aleixo R.. Os valores apresentados são a média \pm desvio padrão de três réplicas. Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

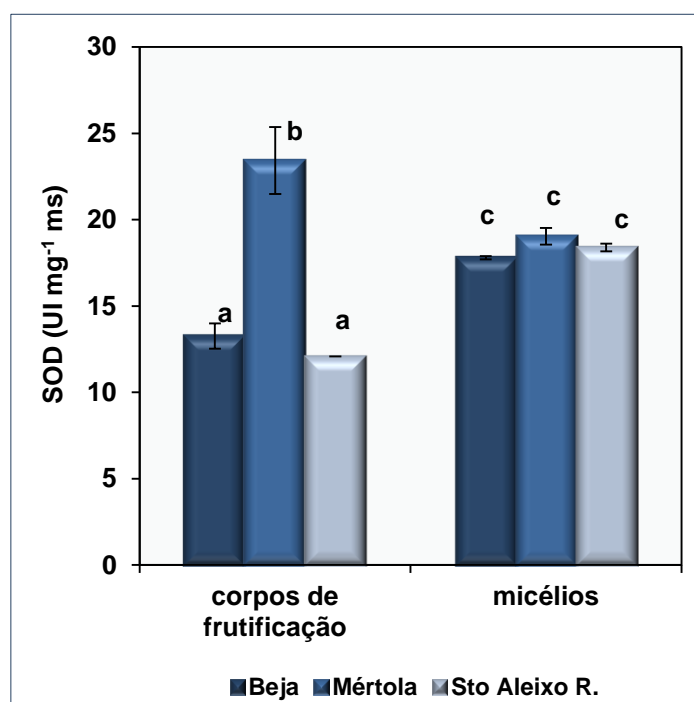


Figura 3.14. Atividade enzimática do enzima superóxido dismutase avaliada extratos lipofílicos extraídos de corpos de frutificação e micélios das estirpes de Beja, Mértola e S¹⁰ Aleixo R.. Os valores apresentados são a média \pm desvio padrão de três réplicas. Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

3.3.3 Análise das propriedades antioxidantes nos extratos fenólicos

Os extratos de compostos fenólicos caracterizados no presente estudo foram obtidos a partir dos corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das culturas líquidas das três estirpes de *A. ponderosa* referidas. A quantificação dos fenóis totais nos diferentes extratos foi avaliada pelo método Folin–Ciocalteu, com construção de uma curva de calibração com padrões de ácido cafeico de concentrações entre 0 e 250 mg/L ((Anexo C, Figura C.1).

Na Figura 3.15 estão apresentados os conteúdos de fenóis totais presentes em cada um dos extratos em estudo, expressas em μg de ácido cafeico por mg de massa seca de extrato fenólico. As estirpes de corpos de frutificação que apresentaram maior conteúdo em compostos fenólicos foram as estirpes de Beja e Mértola. A análise de variância (ANOVA) (Anexo J.II, Tabelas J.II.5 e J.II.6) mostrou que não se observam diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os conteúdos fenólicos dos corpos de frutificação de Beja e Mértola, observando-se no entanto, que estas apresentam concentrações significativamente superiores ($p < 0,05$) à estirpe de S^{to} Aleixo R. (Figura 3.15). Os micélios que apresentaram maior conteúdo em fenóis totais foram os das culturas de Mértola, seguido das culturas de Beja e por último os micélios das culturas de S^{to} Aleixo R., apresentando as amostras das estirpes de Mértola e S^{to} Aleixo R. diferenças significativas ($p < 0,05$) entre si (Figura 3.15). Nos compostos fenólicos totais extraídos dos sobrenadantes observou-se que as estirpes que apresentam maior concentração em fenóis são as estirpes de Beja e Mértola, e a estirpe que contém menor concentração em fenóis é a estirpe de S^{to} Aleixo R., observando-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre todas as estirpes.

Os valores de concentração de fenóis totais obtidos nas amostras das várias estirpes de *A. ponderosa* estudadas vão de encontro a resultados obtidos para outras espécies de cogumelos comestíveis, nomeadamente *Boletus edulis*, *Lactarius deliciosus*,

Pleurotus ostreatus, *Lactarius aurantiacus* e *Russula caerulea* (Palacios *et al.* 2012; Vaz *et al.* 2011b).

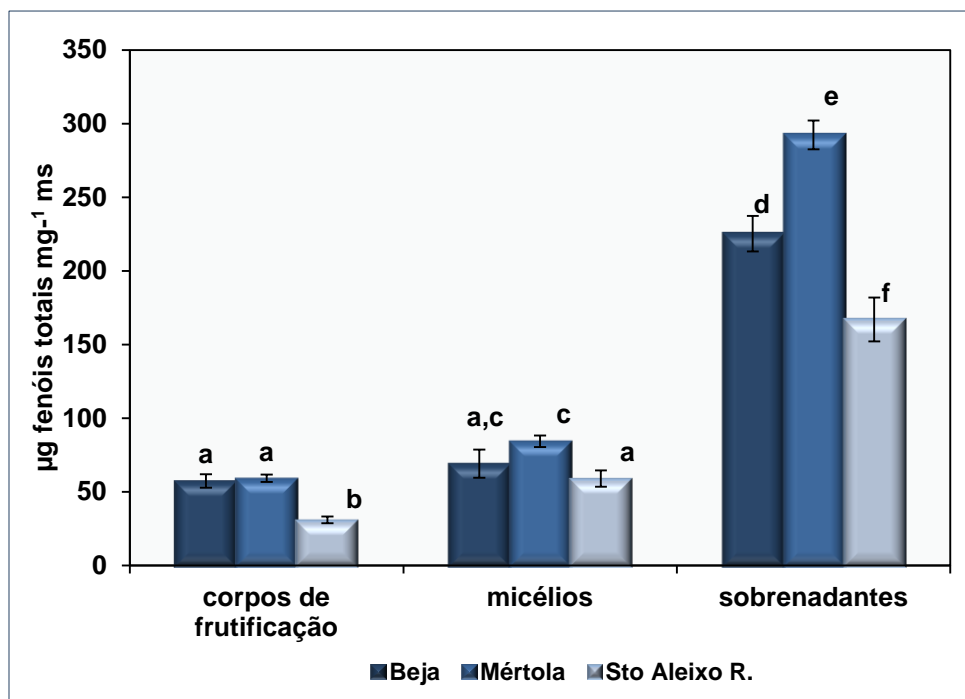


Figura 3.15. Quantificação de compostos fenólicos extraídos de corpos de frutificação de *A. ponderosa* e amostras liofilizadas de micélios e sobrenadantes das culturas líquidas das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R.. Os valores apresentados são a média \pm desvio padrão de seis réplicas. Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

Efetuarão-se também ensaios de avaliação de atividade antioxidante nos extratos de compostos fenólicos totais extraídos dos corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes, tendo-se observado capacidade antioxidante para todas as amostras estudadas.

Relativamente aos resultados obtidos de capacidade antioxidante, pelo método do radical livre de DPPH, nos extratos de compostos fenólicos totais, observa-se que todas as amostras apresentaram atividade antioxidante (Figura 3.16). Os extratos fenólicos totais extraídos dos corpos de frutificação da estirpe de Beja foram os que apresentaram valores mais elevados de capacidade antioxidante, seguido dos extratos da estirpe de Mértola e por último a estirpe de S^{to} Aleixo R., e segundo a análise de variância (ANOVA) (Anexo J.II, Tabelas J.II.7 e J.II.8), apresentam valores com

diferenças significativas entre si ($p < 0,05$). Nos compostos fenólicos extraídos das culturas líquidas a estirpe que apresentaram maior capacidade antioxidante foi a estirpe de Beja ($p < 0,05$). Os compostos fenólicos extraídos dos micélios e sobrenadantes das culturas das estirpes de Beja e S^{to} Aleixo R. não apresentam valores de percentagem de inibição significativamente diferentes ($p > 0,05$).

No caso dos resultados obtidos de atividade antioxidante avaliada pelo método do β -caroteno/ácido linoleico (Figura 3.17) observou-se que nas amostras extraídas dos corpos de frutificação a estirpe com maior capacidade antioxidante foi a de Mértola, apresentando todas diferenças significativas si ($p < 0,05$). Nos compostos extraídos dos micélios das culturas observa-se que a estirpe de S^{to} Aleixo R. foi a que mostrou valores de atividade de atividade antioxidante superiores, sendo todas elas diferentes entre si ($p < 0,05$). Nos extratos de compostos fenólicos totais extraídos dos sobrenadantes das culturas obtiveram-se os valores de atividade antioxidante mais elevados, não diferindo significativamente entre si ($p > 0,05$).

A capacidade antioxidante das amostras de compostos fenólicos por vezes não é proporcional à concentração destes compostos. Isto pode dever-se ao facto destas amostras serem extratos de compostos fenólicos totais, podendo a sua constituição estar diretamente relacionada à capacidade antioxidantes destes compostos.

Outros *Basidiomycetes*, de espécies de cogumelos silvestres comestíveis, nomeadamente *Agaricus* sp, *Tricholoma* sp., *Lactarius* sp., *Leucopaxillus* sp., *Sarcodon* sp. (Barros *et al.* 2008a; Barros *et al.* 2009; Barros *et al.* 2008b; Barros *et al.* 2007c), *Boletus* sp., *Pleurotus* sp. (Palacios *et al.* 2011; Reis *et al.* 2012b) também apresentaram atividade antioxidante, quer na proteção do substrato lipídico, quer na inibição da formação de radicais livres, em estudos efetuados com extratos fenólicos obtidos de corpos de frutificação.

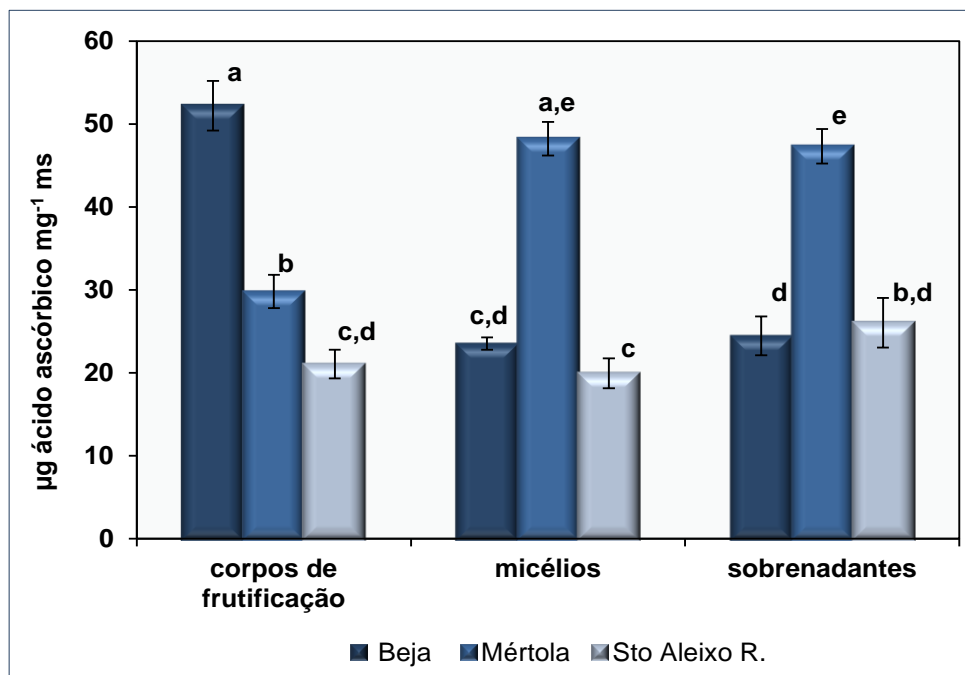


Figura 3.16. Atividade antioxidante determinada pelo DPPH presente nos extratos fenólicos totais extraídos de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das estirpes de Beja, Mértola e S¹⁰ Aleixo R.. Os valores apresentados são a média ± desvio padrão de seis réplicas. Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

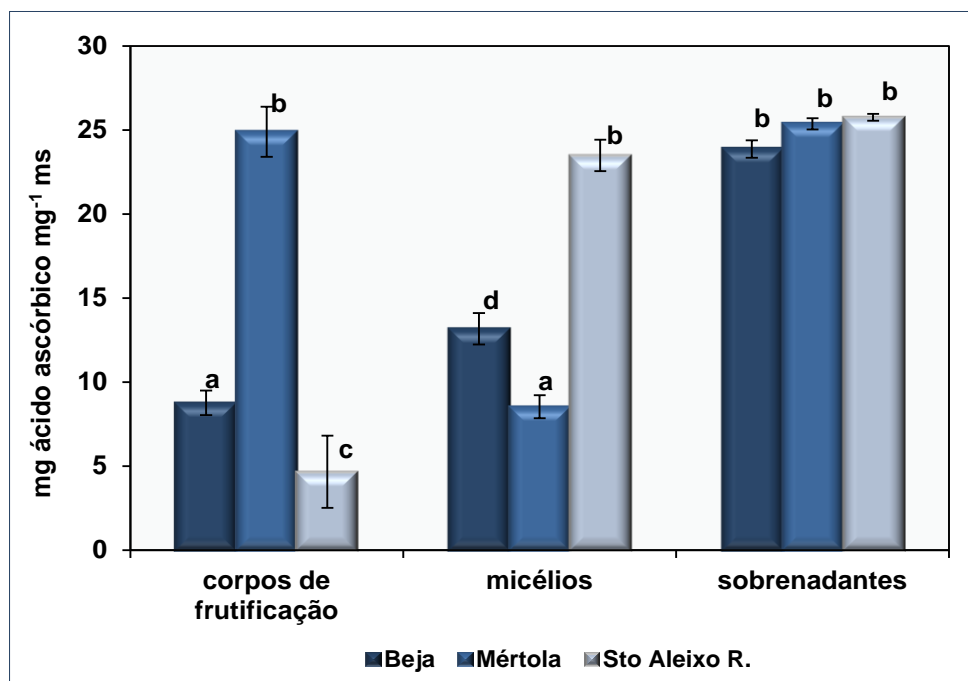


Figura 3.17. Atividade antioxidante determinada pelo método do β -caroteno/ácido linoleico presente nos extratos fenólicos totais extraídos de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das estirpes de Beja, Mértola e S¹⁰ Aleixo R.. Os valores apresentados são a média ± desvio padrão de seis réplicas. Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

As Figuras 3.18 e 3.19 mostraram os resultados referentes à atividade presente nos extratos fenólicos totais, dos enzimas CAT e SOD, respetivamente. Todos os extratos fenólicos apresentaram capacidade para mimetizar a atividade CAT e SOD.

Os testes de análise de variância (ANOVA) (Anexo J.II, Tabelas J.II.7 e J.II.8) mostraram que os diferentes extratos apresentaram diferenças significativas para a atividade de ambos os enzimas ($p < 0,05$). Na análise dos resultados da atividade de CAT, observa-se que os extratos fenólicos obtidos dos sobrenadantes apresentaram valores de atividade enzimática significativamente superiores aos extratos obtidos das amostras de corpos de frutificação e micélios ($p < 0,05$) e apresentando diferenças significativas entre si ($p < 0,05$). As estirpes de Mértola e S^{to} Aleixo R. foram as que deram origem aos extratos fenólicos totais com maior atividade CAT ($p < 0,05$).

Também os extratos fenólicos obtidos, tal como observado nas amostras de corpos de frutificação e culturas, mostraram uma SOD superior comparativamente com a atividade CAT. As estirpes recolhidas em Mértola e S^{to} Aleixo R apresentaram capacidade mais elevada para mimetizar a atividade SOD do que a estirpe de Beja ($p < 0,05$). No entanto, a atividade da SOD é maior nas culturas (micélios e sobrenadantes) do que nos corpos de frutificação, com diferenças significativas entre as estirpes ($p < 0,05$).

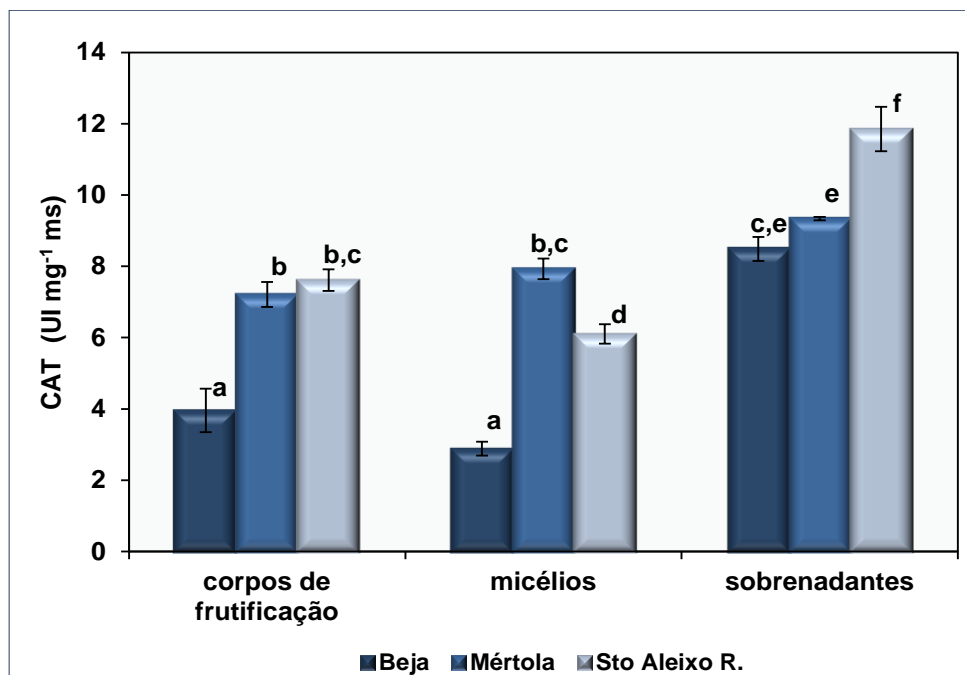


Figura 3.18. Atividade enzimática do enzima catalase avaliada extratos fenólicos totais extraídos de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das estirpes de Beja, Mértola e S¹⁰ Aleixo R.. Os valores apresentados são a média ± desvio padrão de três réplicas. Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

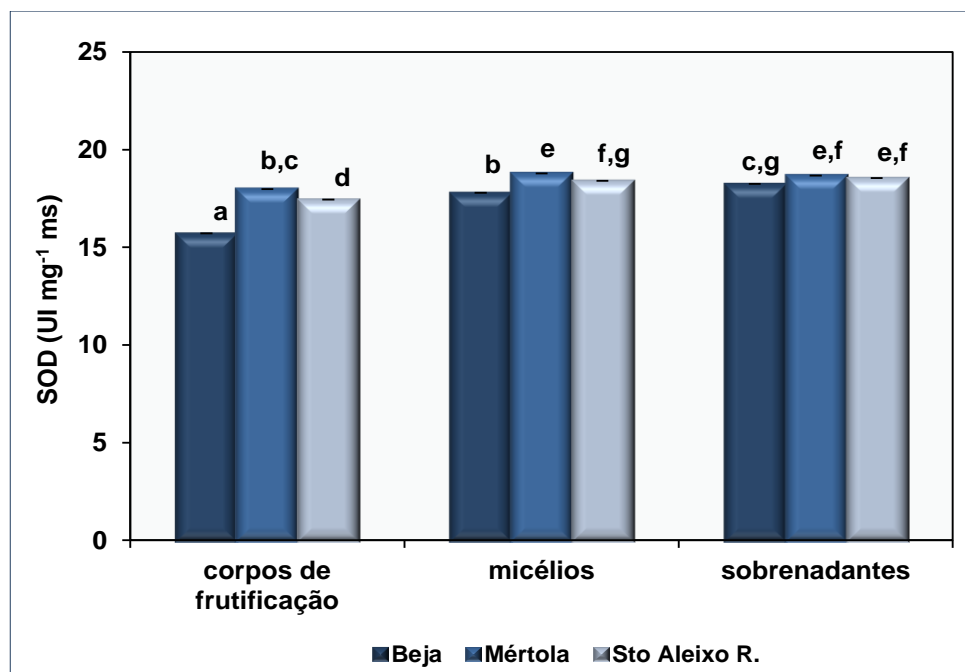


Figura 3.19. Atividade enzimática do enzima superóxido dismutase avaliada extratos fenólicos totais extraídos de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das estirpes de Beja, Mértola e S¹⁰ Aleixo R.. Os valores apresentados são a média ± desvio padrão de três réplicas. Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

3.3.4 Análise das propriedades antioxidantes nos extratos de complexos proteína-polissacáridos

Foram extraídos complexos proteína-polissacáridos dos corpos de frutificação, micélios e dos sobrenadantes das culturas líquidas de *A. ponderosa* das estirpes de S^{to} Aleixo R., sendo quantificados em concentração de polissacáridos e de proteína por mg peso seco de polissacárido. Na Figura 3.20 estão apresentados os valores de concentração de polissacáridos e concentração de proteína presentes nos complexos proteína-polissacáridos (PPS) obtidos das diferentes amostras referentes às três estirpes estudadas. Pode observar-se que todos os extratos de polissacáridos apresentaram proteínas associadas, por isso pode afirmar-se que todas as amostras são complexos proteínas-polissacárido. No entanto, existem alguns extratos que são maioritariamente constituídos por polissacáridos como é o caso dos complexos PPS extraídos dos micélios e sobrenadantes das culturas de *A. ponderosa*, apresentando uma proporção no conteúdo em polissacáridos entre 20 a 90 vezes maior que conteúdo proteico. Destacam-se os extratos de complexos PPS extraídos de micélios da estirpe recolhida na zona Mértola que apresentam um conteúdo de polissacáridos 89,9 vezes superior ao proteico.

Os complexos PPS extraídos dos micélios de Beja e S^{to} Aleixo R. apresentaram conteúdo polissacarídico de 53,9 e 47,2 vezes superior ao proteico, os compostos extraídos dos sobrenadantes de Beja de 53,4 vezes e por ultimo os compostos extraídos dos sobrenadantes de S^{to} Aleixo R. com 23,3 vezes de proporção. Os complexos PPS extraídos dos corpos de frutificação das diferentes estirpes são maioritariamente complexos proteína-polissacáridos, contando com conteúdos polisacarídico e proteico mais equilibrados, com uma proporção entre 3 a 13 vezes superior apenas. Os complexos extraídos dos corpos de frutificação *A. ponderosa* recolhidos na zona de S^{to} Aleixo R. foram os que apresentaram conteúdo mais semelhante com apenas 3,3 vezes mais de conteúdo polissacarídico.

Pode ainda referir-se que foi possível obter uma maior quantidade de polissacáridos por mg de massa seca de extrato liofilizado nos extratos de micélios e sobrenadantes das culturas líquidas.

Pela análise de variância (ANOVA) (Anexo J.II, Tabelas J.II.9 e J.II.10), relativamente à concentração em polissacáridos extraídos das várias estirpes de corpos de frutificação não se observaram diferenças significativas ($p>0,05$). As amostras de micélios das culturas das estirpes de Mértola e S^{to} Aleixo R. não apresentam diferenças significativas entre si ($p>0,05$) e diferem significativamente ($p<0,05$) da estirpe de Beja.

Nos resultados de concentração de polissacáridos presentes nos sobrenadantes das culturas líquidas observaram-se diferenças significativas ($p<0,05$) entre estes extratos e com as restantes amostras de extratos de corpos de frutificação e micélios.

Em relação ao conteúdo proteico presente nos complexos observaram-se maiores diferenças significativas nos extratos de corpos de frutificação e sobrenadantes da estirpe de S^{to} Aleixo R, apresentado valores de proteína significativamente superiores ($p<0,05$) aos observados nos restantes extratos, diferindo significativamente ($p<0,05$) entre si.

Os valores de concentração de complexos proteína-polissacáridos apresentados para as amostras da espécie em estudo são da mesma ordem de grandeza do que os complexos proteína-polissacáridos extraídos de culturas de cogumelos comestíveis, nomeadamente *Coriolus versicolor* (Arteiro *et al.* 2012; Arteiro *et al.* 2008; Tavares *et al.* 2005). Podemos ainda observar que os complexos proteína-polissacáridos aparecem em maior quantidade nos sobrenadantes, isto deve-se ao facto de estes complexos, dependendo das condições de cultura, poderem ser excretados para o meio. Outros estudos, efetuados com outras estirpes de *Basidiomycetes* referem também que a presença destes complexos é predominante nos sobrenadantes das culturas (Arteiro *et al.* 2012; Salvador *et al.* 2013a; Salvador *et al.* 2012).

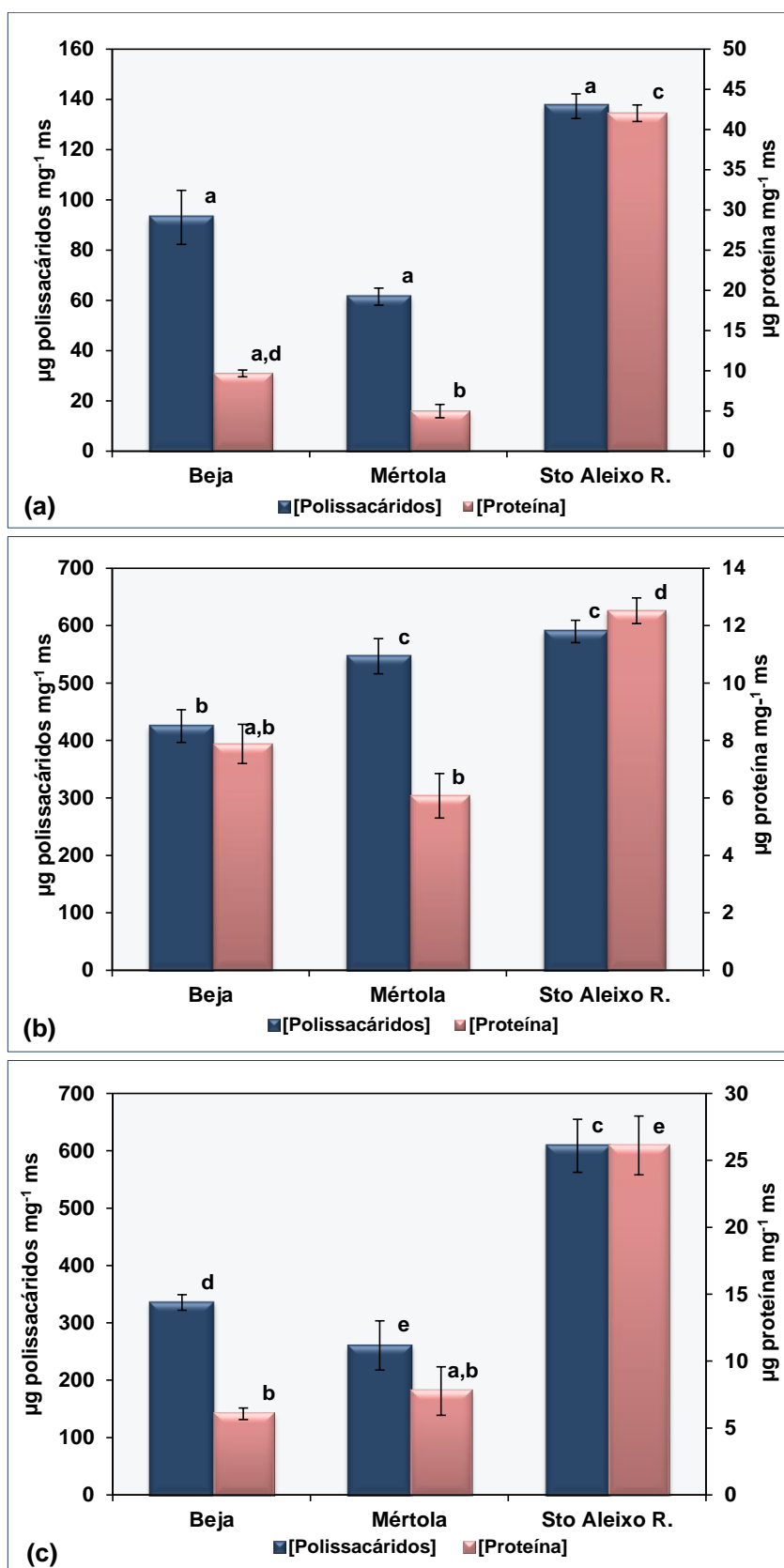


Figura 3.20. Quantificação de polissacáridos e de proteína de extratos obtidos de: (a) corpos de frutificação, (b) micélios e (c) sobrenadantes. Os valores apresentados são a média ± desvio padrão de três réplicas. Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si ($p < 0,05$) para cada um dos parâmetros em análise de conteúdo polissacarídico e proteico.

Quanto à atividade antioxidante nos extratos de complexos PPS extraídos dos corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes, podemos observar pelas Figuras 3.21 e 3.22 que todos apresentaram capacidade antioxidante por ambos os métodos utilizados. Na análise dos resultados de atividade antioxidante obtida nos complexos PPS, pelo método do DPPH, verificou-se uma maior atividade antioxidante nos extratos de micélios e sobrenadantes das culturas, nas estirpes de Beja e S^{to} Aleixo R. Os testes de análise de variância (ANOVA) (Anexo J.II, Tabelas J.II.11 e J.II.12) mostraram os extratos de complexos PPS extraídos dos corpos de frutificação e micélios não foram significativamente diferentes ($p>0,05$). Os complexos extraídos dos sobrenadantes, as estirpes de Beja e Mértola mostraram valores de atividade significativamente inferior às restantes amostras ($p<0,05$), sem diferenças significativas ($p>0,05$) entre si. A atividade antioxidante avaliada pelo método do β -caroteno/ácido linoleico dos extratos de complexos PPS extraídos dos corpos de frutificação e sobrenadantes das culturas líquidas (Figura 3.22), pela análise de variância observou-se uma maior atividade antioxidante nas estirpes de Mértola e S^{to} Aleixo R., com diferenças significativas entre si ($p<0,05$). Nos extratos dos micélios verificou-se uma maior atividade antioxidante na estirpe de Mértola ($p<0,05$). Observa-se ainda que, contrariamente ao que sucede para o método do DPPH, os extratos de complexos PPS extraídos dos sobrenadantes mostram uma tendência para atividade SOD mais elevada ($p<0,05$), destacando-se os extratos de Mértola e S^{to} Aleixo R ($p<0,05$). Comparando os dois métodos de avaliação da capacidade antioxidante, podemos constatar que para todas as amostras em estudo se obtiveram maiores valores de atividade antioxidante, expressos em concentração do mesmo antioxidante natural (μg àc. ascórbico/mg peso seco de extrato), para o método do β -caroteno/ác. linoleico. A atividade antioxidante de compostos polissacáridos avaliada por estes métodos tem sido descrita na bibliografia para outras espécies de *Basidiomycetes*, nomeadamente *P. ostreatus* (Salvador *et al.* 2012; Venkatakrisnan *et al.* 2010) e *C. versicolor* (Arteiro *et al.* 2012).

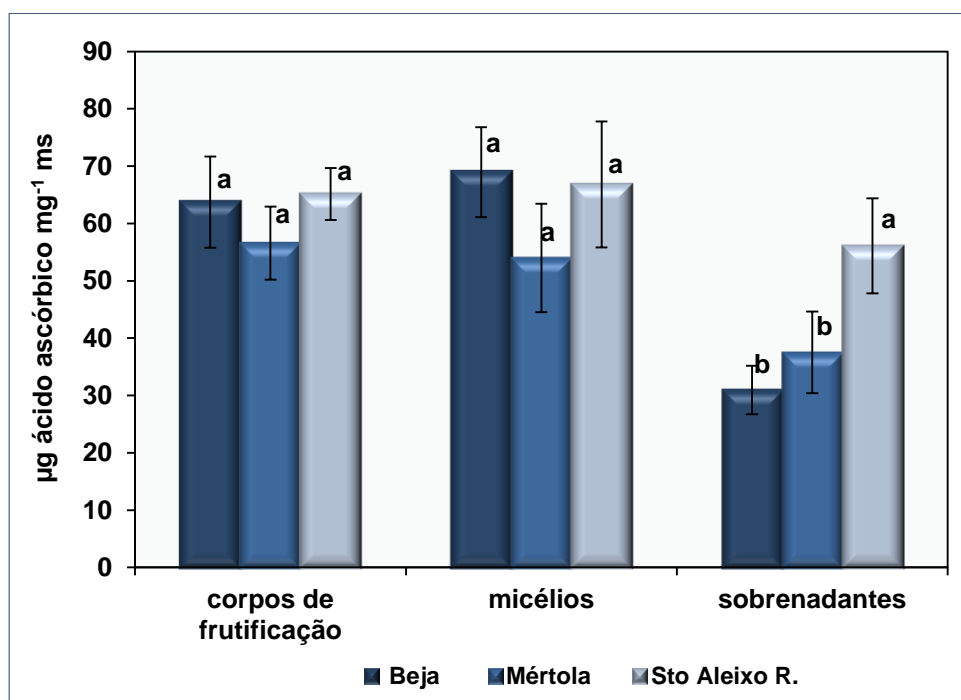


Figura 3.21. Atividade antioxidante presente extratos de complexos proteína-polissacáridos extraídos de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das estirpes de Beja, Mértola e S¹⁰ Aleixo R., avaliada pelo método do radical livre DPPH. Os valores apresentados são a média \pm desvio padrão de seis réplicas. Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

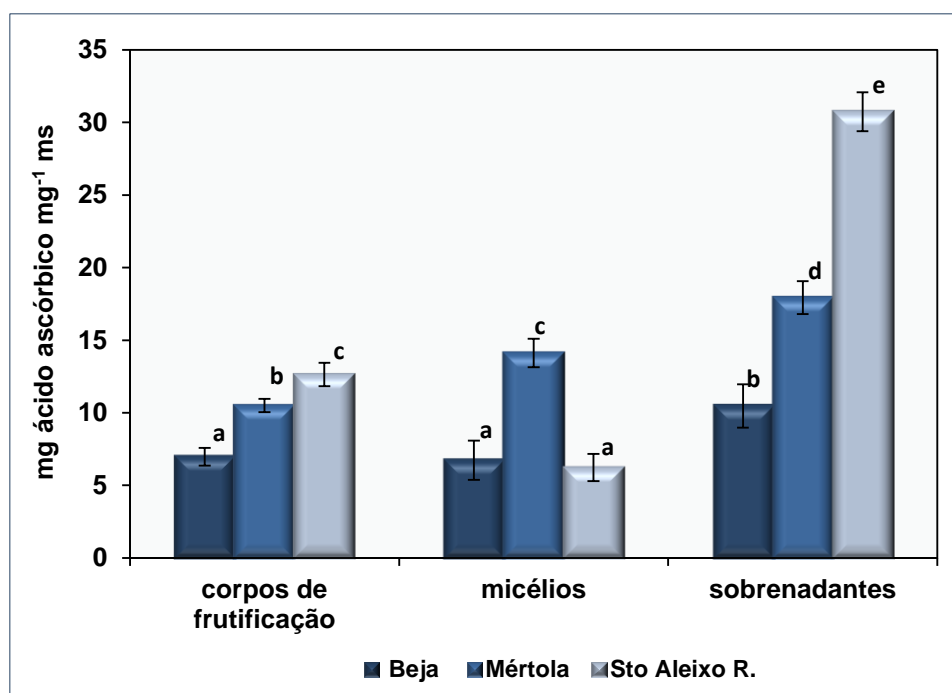


Figura 3.22. Atividade antioxidante determinada pelo método do β -caroteno/ácido linoleico presente nos extratos de complexos proteína-polissacáridos extraídos de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das estirpes de Beja, Mértola e S¹⁰ Aleixo R.. Os valores apresentados são a média \pm desvio padrão de seis réplicas. Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

As Figuras 3.23 e 3.24 mostram os resultados referentes à atividade observada nos extratos de complexos PPS, dos enzimas CAT e SOD, respetivamente, tendo-se observado capacidade para mimetizar a atividade CAT e SOD em todos os extratos de polissacáridos.

Os testes de análise de variância (ANOVA) (Anexo J.II, Tabelas J.II.11 e J.II.12) mostraram que os diferentes extratos apresentaram diferenças significativas para a atividade de ambos os enzimas ($p < 0,05$). Na análise dos resultados da atividade de CAT, observa-se que os extratos de complexos PPS obtidos corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes da estirpe de Mértola apresentaram valores de atividade enzimática significativamente superiores ($p < 0,05$) e os extratos obtidos para a estirpe de Beja foram os que apresentaram valores mais baixo de atividade CAT com diferenças significativas entre si ($p < 0,05$). As estirpes de Mértola e S^{to} Aleixo R. foram as que deram origem aos extratos de complexos PPS com maior atividade CAT ($p < 0,05$).

A atividade SOD foi superior para os extratos de Mértola e S^{to} Aleixo R. do que para a estirpe de Beja ($p < 0,05$). No entanto, observou-se uma tendência dos extratos das culturas (micélios e sobrenadantes) apresentarem maior capacidade de mimetização da atividade SOD do que os extratos dos corpos de frutificação, com diferenças significativas entre as estirpes ($p < 0,05$). Tal como observado nos extratos lipofílicos e fenólicos, também os extratos de complexos PPS, obtidos das amostras de corpos de frutificação e culturas, mostraram uma atividade SOD superior comparativamente com a atividade CAT.

Os resultados obtidos neste estudo, de capacidade de mimetização dos enzimas CAT e SOD das culturas de *A. ponderosa*, corroboram com os estudos realizados anteriormente com culturas de *P. ostreatus* (Salvador *et al.* 2012) e *C. versicolor* (Cui & Chisti 2003).

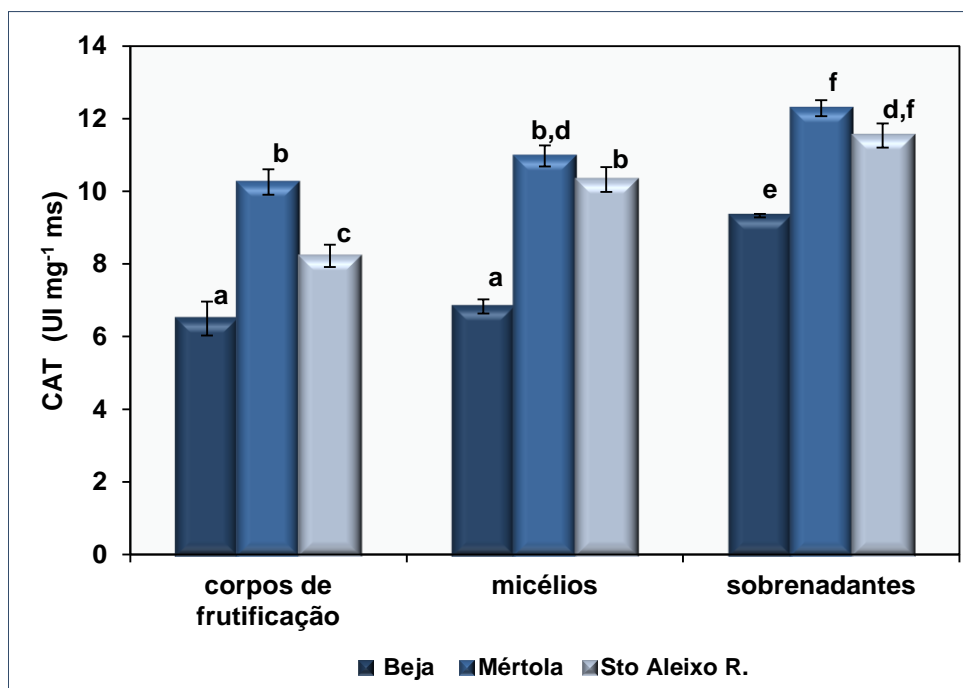


Figura 3.23. Atividade enzimática do enzima catalase avaliada extratos de complexos proteína-polissacáridos extraídos de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das estirpes de Beja, Mértola e S^o Aleixo R.. Os valores apresentados são a média \pm desvio padrão de três réplicas. Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

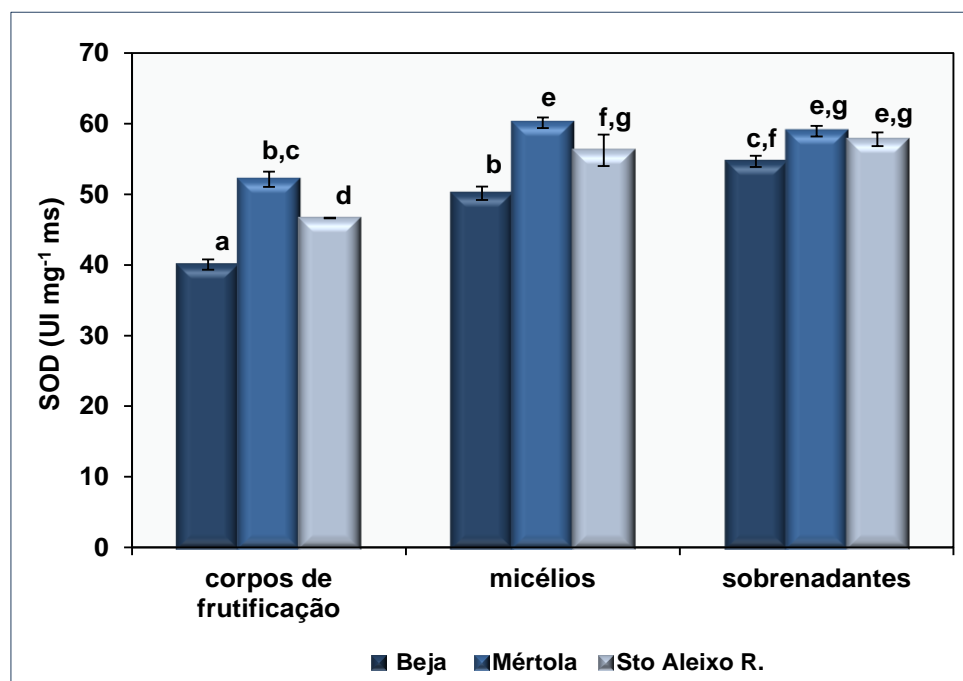


Figura 3.24. Atividade enzimática do enzima superóxido dismutase avaliada extratos de complexos proteína-polissacáridos extraídos de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das estirpes de Beja, Mértola e S^o Aleixo R.. Os valores apresentados são a média \pm desvio padrão de três réplicas. Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

3.3.5 Análise do potencial antiproliferativo das culturas de *A. ponderosa*

O potencial de antiproliferativo das culturas de *A. ponderosa* foi avaliado em culturas de células utilizando a linha celular tumoral mamária humana MDA-MB-231 (Figura 3.25). O perfil de crescimento das células MDA-MB-231, na presença de diferentes concentrações (1-500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de micélios (Figura 3.26 (a)) e sobrenadantes (Figura 3.26 (b)) das culturas de *A. ponderosa* evidencia que estes extratos exibem a capacidade de reduzir a proliferação celular, em função da concentração.

Um aumento da concentração dos extratos de micélios e sobrenadantes das culturas de *A. ponderosa* (30-500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) conduz a uma perda de viabilidade das células MDA-MB-231 (Figura 3.25), evidenciando um efeito inibitório na proliferação celular.

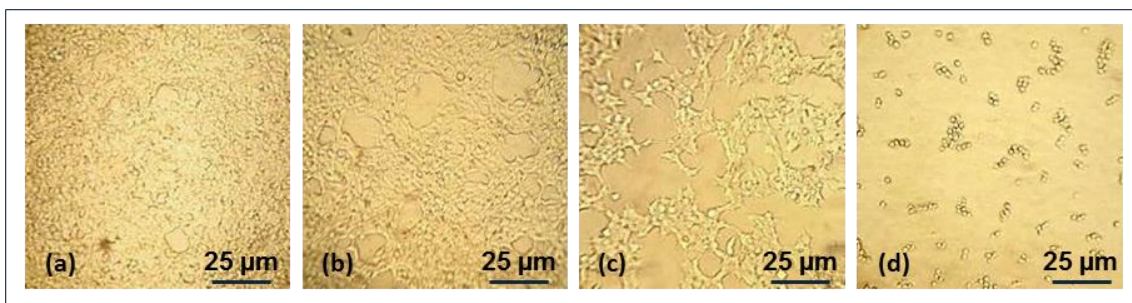


Figura 3.25. Efeito das amostras liofilizadas de sobrenadantes das culturas de *A. ponderosa* na proliferação celular das células MDA-MB-231. As culturas de células MDA-MB-231 foram efetuadas em placas de 96 poços com a concentração de $2,5 \times 10^4$ células em meio DMEM com DMSO (a), sobrenadante das culturas de *A. ponderosa* na concentração de 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (b), 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (c) e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (d).

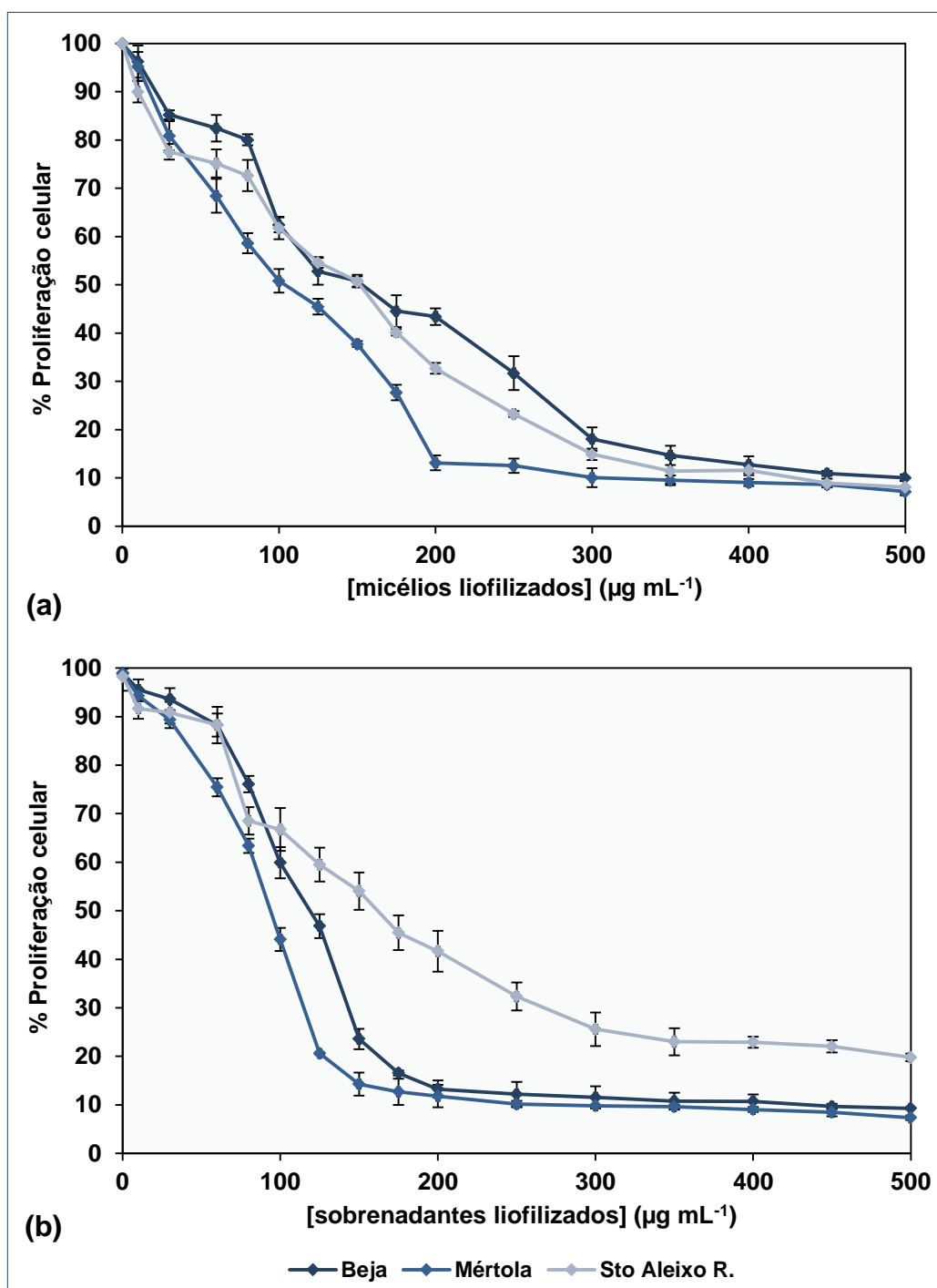


Figura 3.26. Curvas de crescimento da linha celular de cancro mamário humano (MDA-MB-231) incubadas a diferentes concentrações de micélios (a) e sobrenadantes (b) de culturas de *A. ponderosa* das estirpes isoladas de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R..

A proliferação celular foi avaliada em microplaca pela medição da redução do MTT a cristais de formação ($\lambda = 570 \text{ nm}$). Cada determinação representa três ensaios independentes ($n = 3$) efetuados em triplicado e os resultados foram expressos como percentagem de proliferação celular como média \pm DP.

A proliferação celular foi avaliada em microplaca pela medição da redução do MTT a cristais de formazão ($\lambda = 570 \text{ nm}$). Cada determinação representa três ensaios independentes ($n = 3$), cada um efetuado em triplicados. Os resultados foram expressos como percentagem de proliferação celular como média \pm DP.

Os valores de IC_{50} (concentração inibitória de 50% da proliferação celular) foram determinados através dos valores de proliferação celular % obtidos para as diferentes concentrações das amostras (Tabela 3.1) (Anexo E, Figura E.1). Os extratos obtidos de micélios e sobrenadantes das culturas da estirpe de *A. ponderosa* proveniente de Mértola mostraram ser os mais eficientes na redução da capacidade de crescimento das células MDA-MB-231, de acordo com os valores de IC_{50} inferiores obtidos de $96,708 \pm 1,046$ e $88,963 \pm 1,048 \mu\text{g mL}^{-1}$, respetivamente. Os micélios obtidos em culturas de *A. ponderosa* de Beja e S^{to} Aleixo R. foram menos eficientes na redução da capacidade de crescimento desta linha tumoral, apresentando valores de IC_{50} semelhantes ($p > 0,05$) (Anexo J.II, Tabelas J.II.13 e J.II.14). Para o extrato obtido do sobrenadante da cultura da estirpe de *A. ponderosa* de Beja obteve-se um valor de IC_{50} de $113,608 \pm 1,040 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo esta amostra, seguidamente das amostras das culturas da estirpe de Mértola, a mais eficiente na redução da proliferação celular ($p < 0,05$). O extrato de sobrenadante da estirpe de S^{to} Aleixo R. apresentou o valor de IC_{50} mais elevado de $160,641 \pm 1,039 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($p < 0,05$), evidenciando um potencial antiproliferativo inferior comparativamente às restantes amostras. Desta forma observou-se que as culturas de *A. ponderosa* da estirpe recolhida em Mértola são as que apresentam efeito antiproliferativo superior na linha celular utilizada, seguido das culturas da estirpe recolhida em Beja e por último as culturas da estirpe de S^{to} Aleixo R..

Tabela 3.1. Valores de IC₅₀ de proliferação de células humanas MDA-MB-231 obtidos para as amostras de micélios e sobrenadantes de *A. ponderosa*, quando incubadas com diferentes concentrações de extratos por 48 h.

| | Estirpes | IC ₅₀ (µg mL ⁻¹) |
|----------------------------|---------------------------|---|
| Micélios liofilizados | Beja | 147,026 ± 1,039 ^a |
| | Mértola | 96,708 ± 1,046 ^b |
| | S ^{to} Aleixo R. | 150,929 ± 1,058 ^{a,c} |
| Sobrenadantes liofilizados | Beja | 113,608 ± 1,040 ^d |
| | Mértola | 88,963 ± 1,048 ^b |
| | S ^{to} Aleixo R. | 160,641 ± 1,039 ^c |

Cada determinação representa três ensaios independentes (n = 3) efectuados em triplicado (IC₅₀ ± DP). Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si (p < 0,05).

O potencial antiproliferativo das amostras dos micélios das culturas de *A. ponderosa* foi comparado com o fármaco comercial obtido de micélios de *Trametes versicolor* (Coriolus – M.R.L. (ANEID®)). Os resultados mostraram que as amostras de micélios das culturas das três estirpes de *A. ponderosa* apresentam um potencial antiproliferativo maior do que este fármaco comercial apresentando este um valor de IC₅₀ significativamente superior, de 190,881 ± 1.0201 µg mL⁻¹ (p < 0,05).

Existem estudos acerca de outras espécies de cogumelos silvestres comestíveis, como espécies pertencentes ao género *Pleurotus* sp., que mostraram efeitos antitumorais contra alguns tipos de linhas tumorais humanas (Menikpurage *et al.* 2012).

Os cogumelos e culturas (micélios e sobrenadantes) de *A. ponderosa* mostraram importantes atividades antioxidantes e uma capacidade antiproliferativa forte, contribuindo para a diminuição de células tumorais MDA-MB-231 viáveis. As propriedades antioxidantes e potencial antiproliferativo observado sugerem que extratos obtidos de cogumelos e de culturas de *A. ponderosa* podem vir a ser utilizados como uma importante fonte de compostos bioativos com potencial valor medicinal.

Avaliação da atividade toxicológica das
culturas e de extratos bioativos de
A. ponderosa



4.1 Introdução

As doenças hepáticas crônicas são um importante problema de saúde a nível mundial, constituindo uma das principais causa de morte nos países ocidentais e em desenvolvimento. As terapias desenvolvidas, com base nos princípios da medicina, carregam sobretudo o risco de efeitos adversos, e muitas vezes são demasiado caras, tornando bastante atrativo o tratamento de doenças do fígado com compostos derivados de produtos naturais, acessíveis, e que não requerem síntese farmacêutica laboriosa (Saleem *et al.* 2010).

Nos últimos anos têm sido evidenciadas importantes propriedades medicinais em muitas espécies de cogumelos comestíveis, cada vez mais valorizados como alimentos funcionais, devido à presença de muitos compostos bioativos, com potenciais efeitos benéficos para a saúde humana (Guillamón *et al.* 2010).

Alguns estudos referem que alguns cogumelos comestíveis podem ter um importante efeito hepatoprotetor (Nitha *et al.* 2011; Refaie *et al.* 2010; Salvador *et al.* 2012), caracterizado por proteger o fígado submetido a lesões celulares.

Estas lesões hepáticas podem aparecer como consequência da perturbação do fígado, tais como a hepatite viral, a cirrose, assim como as lesões produzidas pelo álcool ou mesmo por medicamentos, como o paracetamol (Nitha *et al.* 2011). A função hepática pode ser monitorizada através da quantificação de alguns parâmetros enzimáticos, designadamente, nas atividades enzimáticas de transaminases, alanina aminotransferases (ALT), aspartato-aminotransferases (ASP), fosfatases alcalinas (ALP) e gama-glutamilttransferases (GGT). Estes enzimas são libertados no sangue em grandes quantidades quando ocorrem lesões na membrana do hepatócito, pelo que têm grande significado na avaliação de doenças hepáticas, apesar de não serem específicos destas patologias.

Neste capítulo procedeu-se à avaliação da toxicidade aguda dos corpos de frutificação, culturas e extratos lipofílicos, fenólicos e complexos PPS, obtidos utilizando dois modelos biológicos, com determinação da letalidade em *Artémia salina* (LC₅₀) e da dose letal murganhos *Swiss* (LD₅₀). Investiga-se também o possível efeito hepatoprotetor dos micélios de *A. ponderosa* em ratos *Wistar*, com administração prolongada das amostras, por via oral, e posterior intoxicação aguda com etanol, com determinação das atividades enzimáticas séricas ALT, AST, ALP e GGT.

4.2 Metodologia

4.2.1 Amostras

As amostras dos corpos de frutificação recolhidas em Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R. foram preparadas como descrito na secção 3.2.1.

As culturas de *A. poderosa* foram preparadas a partir dos isolados de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R., como descrito nas secções 3.2.2 e 3.2.2.1.

Os estratos lipofílicos, obtidos dos corpos de frutificação e micélios das culturas das estirpes isoladas de *A. ponderosa* dos locais acima referidos, foram preparados como descrito na secção 3.2.3.

Os extratos de compostos fenólicos e complexo PPS, obtidos dos corpos de frutificação e culturas (micélios e sobrenadantes) das estirpes isoladas de *A. ponderosa* dos locais referidos, foram preparados como descrito nas secções 3.2.4 e 3.2.5, respetivamente.

4.2.2 Avaliação da letalidade em *Artemia salina*

A letalidade das amostras de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das três estirpes isoladas e dos extratos de compostos lipofílicos, fenólicos e complexos PPS, foi avaliada em *Artemia salina* (*Artoxkit MTM*, *Microbiotest*).

Para avaliação da letalidade das referidas amostras, colocaram-se 900 µL de meio salino (Anexo F, Tabela F.1) e 100 µL de amostra em cada poço. Em cada poço colocaram-se 10 náuplios (no I/II estado larval), previamente reidratadas e desenvolvidas a partir dos cistos, que foram colocados em meio salino, na ausência de luz, a 24°C, durante 48 h (Figura 4.1 (a), (b) e (c)). Procedeu-se à incubação da placa na ausência da luz, a 25°C, durante 24 h. Posteriormente efetuou-se a contagem do número de microcrustáceos imobilizados em cada um dos poços (Figura 4.1 (d)) (Araújo & Nascimento 2000; Hartl & Humpf 2000). As amostras de diferentes extratos

foram testadas na concentração de 1 mg mL^{-1} . Foram efetuadas três réplicas para cada um dos compostos testados.

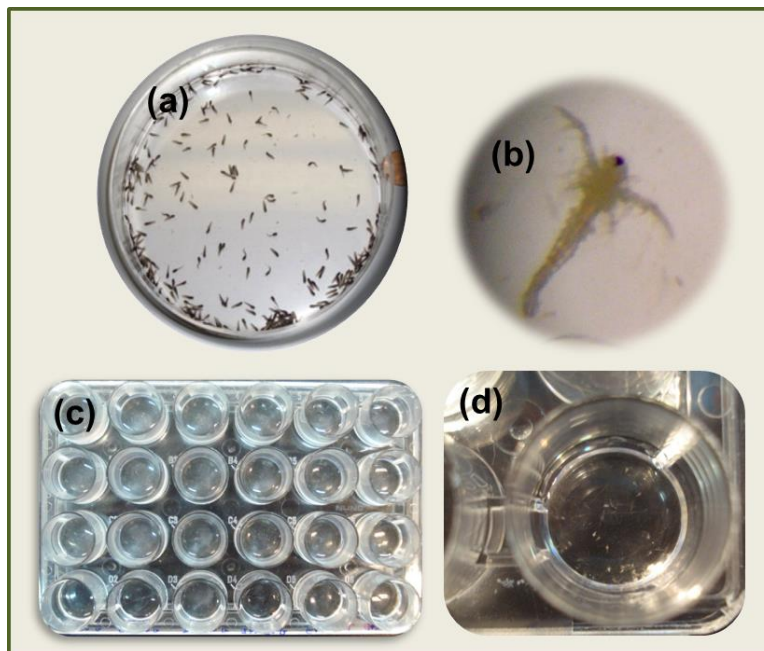


Figura 4.1. Ensaio de toxicidade em *A. salina*: placa com náuplios eclodidos após período de incubação (a), exemplar de náuplio observado à lupa (ampliação de 400x) (b), esquema de placa de ensaio (c), observação de náuplios no poço de ensaio (d).

Utilizou-se o dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) como controlo positivo (10 e 100 mg L^{-1}), com determinação do valor de concentração letal para 50% da população (LC_{50} – *lethal concentration 50%*) (Anexo F, Figura F.1), e uma solução de água do mar como controlo negativo. O valor de LC_{50} para o dicromato de potássio foi determinado usando a correlação dose-resposta, utilizando a seguinte equação:

$$y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{(\log X_0 - X)p}}$$

em que A_2 e A_1 são, respetivamente, as respostas máxima e mínima de *Artemia salina* com uma amostra controlo, p é o parâmetro de declive da curva dose-resposta, X é a concentração usada e $\log X_0$ é a concentração que corresponde a 50 % da toxicidade. Este modelo não linear foi ajustado utilizando o software *Origin Pro 9.0* (*OriginLab*[®] Corporation, 2013).

4.2.3 Estudos em modelos animais

4.2.3.1 Animais

O estudo de toxicidade aguda foi efetuado em murganhos albinos *Swiss* (*Mus musculus*), do sexo masculino, com 8 semanas de idade, de peso médio de 40 ± 5 g.

A avaliação do efeito hepatoprotetor foi efetuada utilizando-se ratos *Wistar* adultos (*Rattus norvegicus*), do sexo masculino, com 12 semanas e peso médio de 180 ± 20 g, após indução da toxicidade com uma dose aguda de etanol.

Os animais foram mantidos nas condições de temperatura controladas ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), com 12h luz/12h escuro, no qual tinham acesso livre a comida e água, sendo apenas mantidos em jejum durante as 24 h anteriores ao sacrifício. Todos os procedimentos envolvendo manuseamento dos animais foram seguidos por um investigador competente, de acordo com as recomendações da Direção Geral de Veterinária (Portaria 1005/92 23 de Outubro) e da FELASA nº020/08 (*Federation of European Laboratory Animal Science Association*).

4.2.3.2 Avaliação da toxicidade aguda em murganhos *Swiss*

A avaliação da toxicidade aguda, das amostras de corpos de frutificação recolhidas em Beja e micélios das culturas das estirpes isoladas de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R., foi realizada utilizando murganhos *Swiss* (Figura 4.2 (a)), com avaliação do *screening* farmacológico e determinação da dose letal de 50% (LD_{50} – *lethal dose 50%*), de acordo com o *up and down*, OCDE 425, estabelecido pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE 2001).

Os animais foram divididos em cinco grupos e deixados em jejum 24h antes do ensaio, com água à descrição (Figura 4.2 (c)). As amostras dos corpos de frutificação secos e micélios liofilizados foram administrados por via oral, com o auxílio de uma sonda gástrica (Figura 4.2 (b)), na concentração de 2000 mg kg^{-1} , utilizando água destilada

como veículo. O grupo 1, controlo negativo, foi administrado com o veículo (água destilada). O grupo 2 foi administrado com amostra de corpos de frutificação recolhidos em Beja. Os grupos 3, 4 e 5 foram administrados com os micélios liofilizados das estirpes de *A. ponderosa* provenientes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo da Restauração, respetivamente.

O comportamento, conduta e atividade basal dos animais no *screening* farmacológico, foi efetuado às 0, 1, 2, 4, 6 e 24 h após administração oral das amostras. Os testes basearam-se em: testes de reflexos (pineal, corneal, postura, ipsolateral anterior e posterior), testes de atividade motora (catalepsia, tração) e observação de conduta (agressividade, passividade e temor) (Figura 4.2 (d), (e) e (f)).

Os animais foram mantidos em observação durante 15 dias (OCDE 2001), e durante esse tempo foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), 12h luz/12h escuro, com livre acesso a comida e água *ad libitum* (Jayakumar *et al.* 2006; Lu *et al.* 2007).

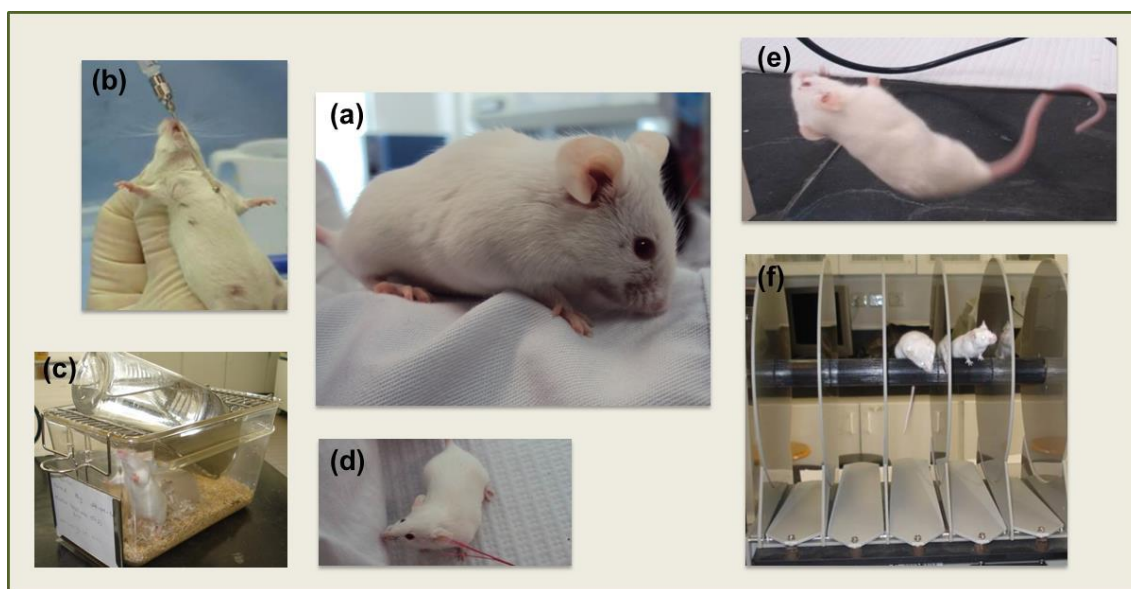


Figura 4.2. Ensaio de toxicidade de murganhos *Swiss*: representação de murganho *Swiss* do ensaio (a), administração oral das amostras (b), gaiola na qual os murganhos foram mantidos durante o ensaio (c), e testes de *screening* farmacológico, nomeadamente reflexo pineal (d), teste de tração (e) e atividade motora (f).

4.2.3.3 Avaliação do efeito hepatoprotetor *in vivo*

O efeito hepatoprotetor das amostras de corpos de frutificação recolhidas em Beja e micélios das culturas das estirpes isoladas de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R., foi avaliado em ratos *Wistar*, após intoxicação induzida por uma dose aguda de etanol.

Foram efetuados onze grupos constituídos por seis animais cada. Os animais foram administrados oralmente com auxílio de sonda gástrica, durante 10 dias (Figura 4.3 (a), (b), (c)). O grupo 1, controlo negativo, recebeu apenas o veículo (água destilada). O grupo 2, controlo positivo, recebeu apenas veículo durante os 10 dias de ensaio e, posteriormente, submetido a intoxicação aguda com etanol. O grupo 3, grupo padrão, foi tratado com o fármaco contendo silimarina (0,2 g Kg⁻¹). Os grupos 4 a 11, grupos teste, foram administrados com uma dose diária de 0,5 g Kg⁻¹ de cada amostra, corpos de frutificação secos e micélios liofilizados, utilizando água destilada como veículo, durante os 10 dias do ensaio. Os grupos 4 e 5 foram administrados com amostra de cogumelo *A. ponderosa* de Beja, os grupos 6 e 7 foram administrados com micélio das culturas da estirpe de Beja, os grupos 8 e 9 foram administrados com micélio da estirpe de Mértola, os grupos 10 e 11 foram administrados com micélio da estirpe de S^{to} Aleixo R.

Os grupos 5, 7, 9 e 11 foram usados como grupos teste-controlo, para cada uma das amostras em estudo, para avaliação da toxicidade dos corpos de frutificação e micélios de *A. ponderosa* após administração prolongada.

Após os 10 dias de ensaio *per os*, foi descontinuada a disponibilidade de comida para todos os grupos. De modo a avaliar o efeito hepatoprotetor das culturas, os animais do grupo 2 (controlo positivo), grupo 3 (grupo padrão) e dos grupos teste (grupos 4, 6, 8 e 10) foram administrados oralmente com uma dose aguda de etanol de 5,0 g Kg⁻¹ diluído em água destilada (6:4 v/v), provocando assim intoxicação aguda (Lu *et al.* 2007; Refaie *et al.* 2010). Os restantes grupos não foram administrados com etanol.

Após 18h de administração da dose aguda de etanol, os animais foram anestesiados e o sangue foi recolhido por punção do *plexus* retro-orbital (Figura 4.3 (d)). O sangue foi

recolhido em tubo seco, incubado 60 min à temperatura ambiente, e o soro foi separado por centrifugação a 2.500 rpm à temperatura ambiente, durante 15 min. Os soros foram separados em alíquotas e conservados a -20°C , para posterior análise dos vários parâmetros bioquímicos (Lu *et al.* 2007).

A concentração sérica dos enzimas alanina-aminotransferase (ALT), aspartato-aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP) e gama-glutamilttransferase (GGT) foram determinadas com kits comerciais (*Sentinel Diagnostics*), por espectrometria utilizando um espectrofotômetro de UV-Vis (*Perkin Elmer Lambda 25*).

Os resultados de atividade enzimática foram expressos em U L^{-1} , sendo U uma unidade de atividade enzimática (concentração de enzima para a qual ocorre a formação de $1 \mu\text{mol}$ de substrato por minuto).

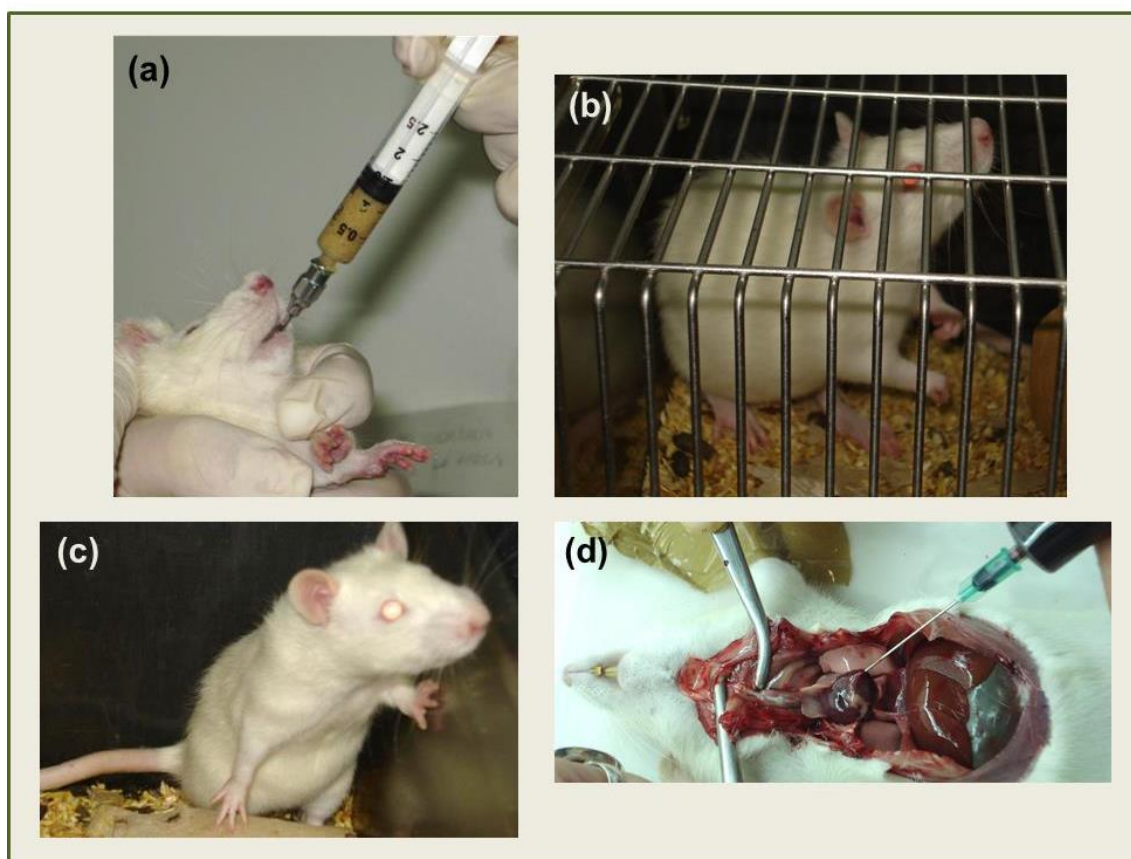
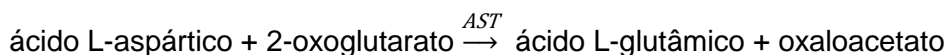


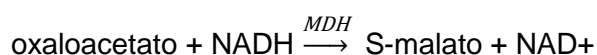
Figura 4.3. Ensaio de avaliação do efeito hepatoprotetor em ratos Wistar: representação de administração oral das amostras por sonda gástrica (a), gaiola na qual os animais foram mantidos durante o tempo de ensaio (b), rato Wistar do ensaio (c) e recolha das amostras de sangue obtidas por punção do *plexus* retro-orbital (d).

4.2.3.3.1 Determinação cinética de aspartato-aminotransferase (AST)

O enzima AST (EC 2.6.1.1) catalisa a reação de transaminação entre o ácido L-aspartico e o 2-oxoglutarato, com a formação de ácido L-glutâmico e oxaloacetato:



A atividade enzimática AST pode ser determinada espectrofotometricamente com base na reação acoplada do oxaloacetato com NADH, na presença de malato-desidrogenase (MDH), de acordo com a seguinte reação:



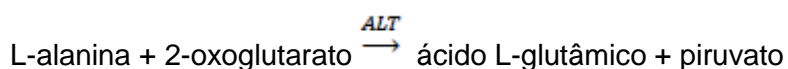
Numa célula de espectrofotômetro adicionou-se 0,10 mL de amostra (soro) a 1,0 mL de uma solução tampão contendo malato desidrogenase (>1 kU/L). Homogeneizou-se e incubou-se durante 1 min, a 37°C e adicionou-se 0,10 mL de uma solução de NADH na concentração de 2,5 mmol L⁻¹. Após homogeneização, a reação foi seguida a 340 nm, durante 5 min. A atividade enzimática AST corresponde a um decréscimo no valor da absorvância, proporcional à velocidade de oxidação do NADH na mistura reacional, tendo sido calculada pela expressão:

$$\text{Atividade Enzimática (U/L)} = \Delta A/\text{min} \times F$$

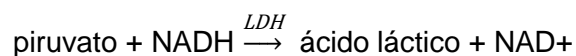
O fator de conversão (F) para 340 nm foi de 1905 (*Sentinel Diagnostics*)

4.2.3.3.2 Determinação cinética de alanina-aminotransferase (ALT)

O enzima ALT (EC 2.6.1.2) promove a transferência de grupos amina entre a L-alanina e o 2-oxoglutarato, com a formação de ácido L-glutâmico e piruvato, de acordo com a seguinte reação:



O piruvato formado, na presença de lactato desidrogenase (LDH), reage com NADH, com formação de ácido láctico e NAD⁺ em quantidades equivalentes.



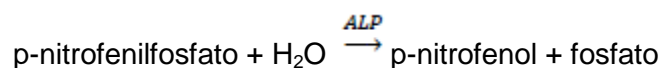
Numa célula de espectrofotômetro adicionou-se 0,10 mL de amostra (soro) a 1,0 mL de uma solução de lactato desidrogenase (6 kU/L). Homogeneizou-se e incubou-se durante 1 min, a 37°C e adicionou-se 0,10 mL de uma solução de NADH na concentração de 2,5 mmol L⁻¹. Após homogeneização, seguiu-se a cinética de degradação do NADH a 340nm, durante 5 min. A atividade enzimática ALT corresponde a um decréscimo no valor da absorvância, sendo esta diminuição proporcional à velocidade de oxidação do NADH na mistura reacional, calculada pela expressão:

$$\text{Atividade Enzimática (U/L)} = \Delta A/\text{min} \times F$$

O fator de conversão (F) para 340 nm foi de 1905 (*Sentinel Diagnostics*)

4.2.3.3.3 Determinação cinética de fosfatase alcalina (ALP)

A atividade enzimática ALP (EC 3.1.3.1) foi determinada espectrofotometricamente pela reação de hidrólise, em meio alcalino, de um monoéster fosfórico, o p-nitrofenilfosfato, com formação de fosfato e de p-nitrofenol:



Numa célula de espectrofotômetro adicionou-se 0,02 mL de amostra (soro) a 1,0 mL de uma solução alcalina (pH 10,0) de cloreto de magnésio 0,5 mmol L⁻¹ e ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹. Homogeneizou-se e incubou-se durante 1 min, a 37°C e adicionou-se 0,25 mL de uma solução de p-nitrofenilfosfato na concentração de 0,05 mmol L⁻¹. Após homogeneização determinou-se a variação da absorvância a 405 nm,

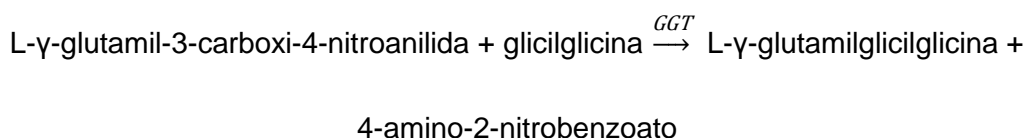
durante 5 min. A atividade enzimática ALP correspondeu a um aumento no valor da absorvância, sendo esta variação proporcional à velocidade de formação de p-nitrofenol na mistura reacional, calculada pela expressão:

$$\text{Atividade Enzimática (U/L)} = \Delta A/\text{min} \times F$$

O fator de conversão (F) para 405 nm foi de 3433 (*Sentinel Diagnostics*)

4.2.3.3.4 Determinação cinética de gama-glutamyltransferase (GGT)

Para quantificar a presença GGT (EC 2.3.2.2) numa amostra biológica promoveu-se a reação entre um derivado da gama-glutamyl-p-nitroanilida com glicilglicina, com formação de um resíduo de 4-amino-2-nitrobenzoato.



Numa célula de espectrofotómetro adicionou-se 0,1 mL de amostra (soro) a 1,0 mL de glicilglicina 0,1 mol L⁻¹. A mistura foi homogeneizada e incubada durante 1 min, a 37°C e adicionaram-se 0,25 mL de uma solução de γ -glutamyl-3-carboxi-4-nitroanilida na concentração de 0,01 mmol L⁻¹. Após homogeneização da mistura, a cinética de formação foi avaliada a 405 nm, durante 8 min. A atividade enzimática GGT correspondeu ao aumento da absorvância por unidade de tempo, o qual foi proporcional à velocidade de formação de 4-amino-2-nitrobenzoato na mistura reacional e calculada pela expressão:

$$\text{Atividade Enzimática (U/L)} = \Delta A/\text{min} \times F$$

O fator de conversão (F) para 405 nm foi de 1421 (*Sentinel Diagnostics*)

4.2.4 Análise estatística

A curva dose resposta e o valor de LC_{50} para o dicromato de potássio foram determinados utilizando o software *OriginPro 9.0* (*OriginLab® Corporation*, 2013).

A comparação dos resultados de atividades enzimáticas, ALT, AST, AL e GGT, foi efetuada por análise descritiva, com determinação da média e desvio padrão e análise de variância (ANOVA - *One way*), usando o programa *SPSS® 21.0* para *Windows Copyright®, Microsoft Corporation*. A homogeneidade das variâncias populacionais foi confirmada pelo teste de *Levene* e a comparação múltiplas de médias foi efetuada pelo teste de *Tukey*. A significância dos valores estabeleceu-se para um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Avaliação da letalidade em *A. salina* dos corpos de frutificação, culturas e extratos bioativos

A toxicidade dos corpos de frutificação, culturas e extratos lipofílicos, fenólicos e complexos PPS foi avaliada em ensaios em *A. salina* (Figuras 4.4 a 4.7). O dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) utilizado como controlo positivo, na concentração de 100 mg L^{-1} causou 87,53% de mortalidade. A curva de dose resposta obtida (Anexo F, Figura F.1) mostra que o valor de concentração correspondente a 50% de viabilidade de *A. salina* (LC_{50}) foi de $51,55 \pm 1,04 \text{ mg L}^{-1}$. No controlo negativo, preparado com água do mar, não se observou mortalidade de *A. salina*, nas mesmas condições de ensaio.

As Figuras 4.4 a 4.7 mostram os resultados obtidos para as referidas amostras. As amostras secas de corpos de frutificação não apresentaram nenhuma toxicidade, com valores de mortalidade inferior a 0,3% (Figura 4.4). Os micélios e sobrenadantes liofilizados das culturas líquidas mostraram uma baixa toxicidade, com valores de mortalidade inferior a 3% e 2%, respetivamente (Figura 4.4).

Os resultados referentes aos extratos lipofílicos estão apresentados na Figura 4.5. Os compostos lipofílicos extraídos dos corpos de frutificação mostraram baixa toxicidade, com valores inferiores a 3% de mortalidade, e os extratos lipofílicos extraídos dos micélios das culturas apresentaram toxicidade ainda mais baixa, sendo inferior a 1,5% de mortalidade.

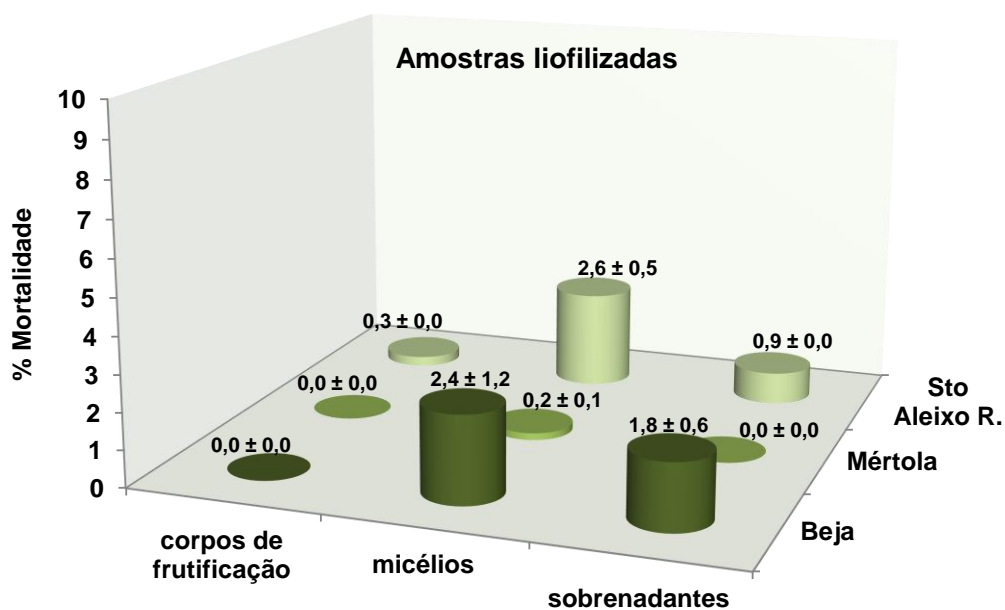


Figura 4.4. Registo da mortalidade em *A. salina* para amostras liofilizadas de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das culturas das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R., com a concentração no poço de 1 mg mL⁻¹. Os valores apresentados são a média ± desvio padrão de três réplicas.

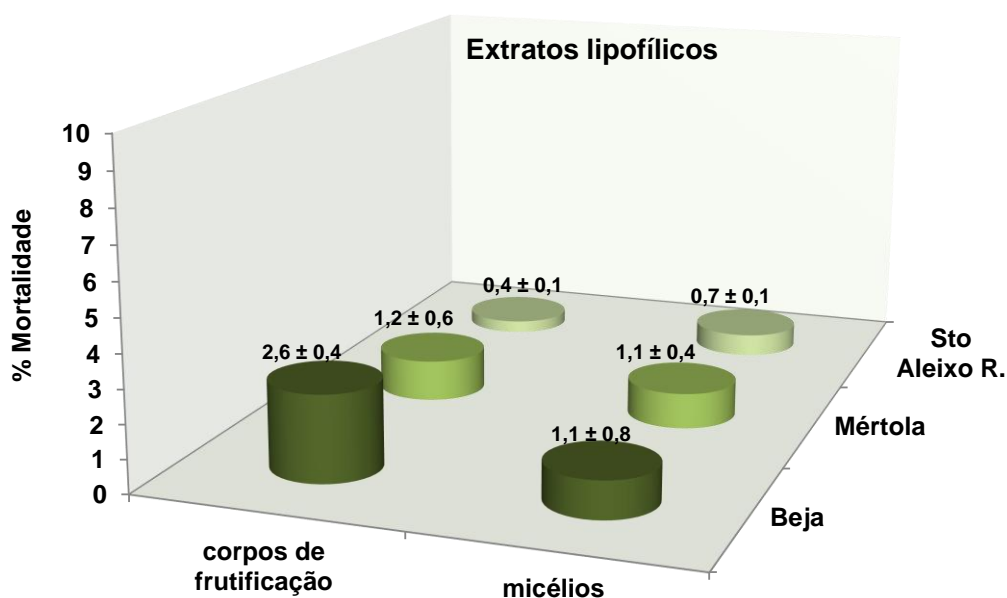


Figura 4.5. Registo da mortalidade em *A. salina* para amostras de extratos de compostos lipofílicos obtidos de corpos de frutificação e micélios das culturas das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R., com a concentração no poço de 1 mg mL⁻¹. Os valores apresentados são a média ± desvio padrão de três réplicas.

Os resultados dos ensaios de avaliação de toxicidade em *A. salina* para os compostos fenólicos totais, extraídos dos corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes de *A. ponderosa*, estão apresentados na Figura 4.6. Os extratos fenólicos totais extraídos dos corpos de frutificação mostraram toxicidade relativamente baixa, com valores inferiores a 6% de mortalidade. Os extratos de compostos fenólicos totais, extraídos dos micélios e sobrenadantes das culturas líquidas, apresentaram toxicidade baixa sendo esta inferior a 3% e 4% de mortalidade, respetivamente.

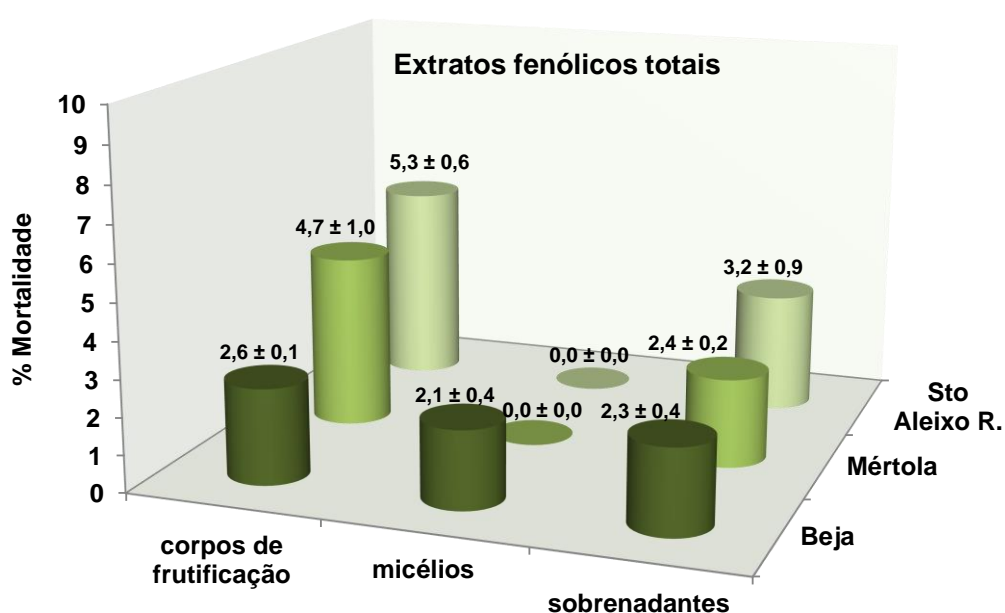


Figura 4.6. Registo da mortalidade em *A. salina* para amostras de extratos de compostos fenólicos totais obtidos de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das culturas das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R., com a concentração no poço de 1 mg mL⁻¹. Os valores apresentados são a média ± desvio padrão de três réplicas.

Os resultados de toxicidade em *A. salina* dos extratos de complexos PPS, extraídos dos corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes de *A. ponderosa*, estão apresentados na Figura 4.7. Observou-se que nos extratos de complexos PPS extraídos das diferentes amostras de corpos de frutificação apresentaram toxicidade

bastante baixa, com valores inferiores a 6% de mortalidade. Os extratos de complexos PPS extraídos dos micélios e sobrenadantes das culturas apresentaram toxicidade ainda mais baixa que os extratos PPS dos corpos de frutificação, obtendo-se valores inferiores a 4% e 5% de mortalidade, respetivamente.

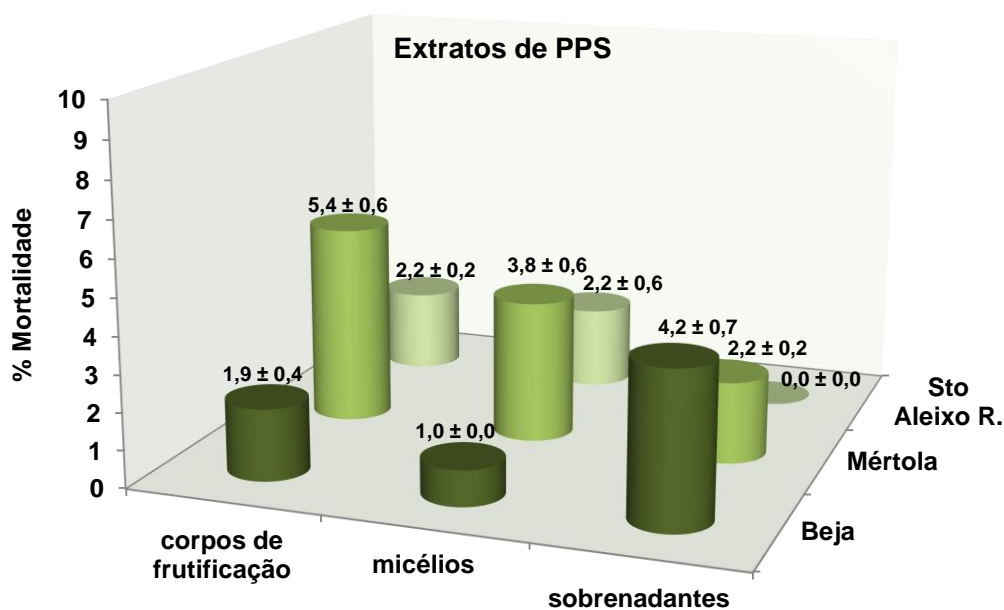


Figura 4.7. Registo da mortalidade em *A. salina* para amostras de extratos de complexos PPS obtidos de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das culturas das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R., com a concentração no poço de 1 mg mL⁻¹. Os valores apresentados são a média ± desvio padrão de três réplicas.

Entre os bioensaios mais utilizados na avaliação prévia de diversos extratos de plantas ou fungos, encontra-se a toxicidade sobre *A. salina*, que se caracteriza por ser de baixo custo, rápido e não exigir técnicas assépticas (Bastos *et al.* 2009; Siqueira *et al.* 1998).

4.3.2 Avaliação da toxicidade aguda dos corpos de frutificação e micélios das culturas em murganhos *Swiss*

A toxicidade dos corpos de frutificação e dos micélios das culturas de *A. ponderosa* foi avaliada em murganhos *Swiss* pelo método *up and down* (OCDE 2001), com vista a estimar o valor de LD₅₀. A administração oral das amostras de corpos de frutificação de *A. ponderosa* de Beja e dos micélios liofilizados das culturas de *A. ponderosa* de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R., na concentração de 2000 mg Kg⁻¹, não apresentou sinais de toxicidade aguda, não se tendo observado morte de nenhum dos murganhos administrados.

No *screening* farmacológico, baseado em testes de reflexos (pineal, corneal, postura, ipsilateral anterior e posterior), testes de atividade motora (catalepsia, tração) e observação de conduta (agressividade, passividade e temor), os animais mostraram um comportamento normal a nível motor, cognitivo e sensorial, durante as primeiras 24h de ensaio, não apresentando sinais de toxicidade. Assim, podemos afirmar que os extratos não apresentaram toxicidade para a dose testada, com valores de LD₅₀ superior a 2000 mg Kg⁻¹.

De acordo com as normas da OCDE deve administrar-se uma dose máxima de 2000 mg Kg⁻¹ ou 5000 mg Kg⁻¹ (OCDE 2001). No entanto, neste estudo, não foi possível administrar a concentração de 5000 mg kg⁻¹, dada a baixa solubilidade das amostras liofilizados em solução aquosa e baixo peso seco, levando a que o volume de amostra necessária seria demasiado elevado e não seria possível dissolver no volume máximo de veículo que o animal pode consumir numa dose.

4.3.3 Avaliação do efeito hepatoprotetor dos corpos de frutificação e micélios das culturas

O efeito hepatoprotetor dos corpos de frutificação e dos micélios de culturas líquidas de *A. ponderosa* ($0,5 \text{ g Kg}^{-1}$), foi avaliado *in vivo* utilizando ratos *Wistar* como modelo animal, por intoxicação aguda com etanol ($5,0 \text{ g Kg}^{-1}$). O grau de toxicidade e possível efeito hepatoprotetor das amostras foram determinados através da avaliação de diversos parâmetros bioquímicos, tais como as transaminases do soro (AST e ALT), a fosfatase alcalina (ALP) e gama-glutamilttransferase (GGT).

Nas Figuras 4.8 a 4.11 estão representados os valores das atividades enzimáticas ALT, AST, ALP e GGT nos soros dos animais em estudo em presença de corpos de frutificação de *A. ponderosa* e micélios das culturas das diferentes estirpes, comparativamente com os controlos positivo (etanol) e negativo (veículo). Os resultados obtidos para os grupos teste foram comparados com o grupo padrão, o fármaco cujo princípio ativo a silimarina possui efeito hepatoprotetor comprovado (Pradhan & Girish 2006). Neste estudo observou-se que os grupos teste apresentaram valores de atividade semelhantes com o grupo padrão, para todos os enzimas analisados. O grupo teste ao qual foi administrado corpos de frutificação, teve também a finalidade de servir como comparação com os grupos teste de micélios, tendo-se observado valores semelhantes de atividade entre estes grupos. Os grupos controlo para cada amostra testada (grupos teste controlo) apresentaram valores de atividade semelhante aos grupos teste, ou em alguns casos ligeiramente mais baixa, e também semelhante à atividade do grupo controlo negativo, permitindo excluir qualquer efeito tóxico da administração prolongada das amostras de corpos de frutificação e micélios de *A. ponderosa*.

A lesão hepática induzida pela administração de etanol causou um aumento significativo nos enzimas séricos AST, ALT, ALP e GGT (Figuras 4.8, 4.9, 4.10 e 4.11). O aumento do nível destes enzimas séricos é um indicador convencional de lesão

hepática. A elevação das atividades ALT, AST, ALP e GGT foi significativamente antagonizada pela administração prévia das amostras de corpos de frutificação e de micélios de *A. ponderosa* de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R. O estudo de análise de variância (ANOVA) (Anexo J.III, Tabelas J.III.1 e J.III.2), com a comparação dos valores de atividade dos enzimas séricos em estudo, foi efetuado de forma a compreender se existe uma variação significativa de médias entre os grupos estudados.

Os enzimas aspartato-aminotransferase (AST) e alanina-aminotransferase (ALT) são enzimas hepáticos, de fase aguda, que se expressam no soro sanguíneo após lesão do hepatócito, ao fim de aproximadamente 18 h. As Figuras 4.8 e 4.9 apresentam os resultados das atividades enzimáticas da AST e ALT, observando-se que os grupos administrados com as amostras de corpos de frutificação e micélios de *A. ponderosa* os valores de atividade não são alterados pela administração do etanol, como se observa também no caso do grupo administrado com silimarina e grupo controlo negativo. Observou-se um aumento das atividades dos enzimas AST e ALT após administração do etanol nos animais do grupo 2 (controlo positivo), apresentando diferenças significativas quando comparado com o grupo 1 (controlo negativo) ($p < 0,05$), com o grupo 3, ao qual foi administrado previamente silimarina ($p < 0,05$), bem como com todos os grupos teste e teste controlo, nos quais os animais foram administrados com corpos de frutificação ou micélios de culturas de *A. ponderosa* ($p < 0,05$). Observou-se ainda uma tendência para a diminuição dos valores de atividade AST e ALT nos animais previamente administrados com as amostras de *A. ponderosa* referidas, comparativamente com o grupo controlo negativo, no entanto, as diferenças observadas não foram significativas ($p > 0,05$).

Relativamente à atividade do enzima AST (Figura 4.8), todos os grupos teste e teste controlo, administrados com amostras, não apresentaram variações significativas quando comparados com o grupo 1 (controlo negativo) ($p > 0,05$) e apresentaram

valores significativamente inferiores que o grupo administrado com silimarina (grupo 3) ou controlo positivo (grupo 2) ($p < 0,05$).

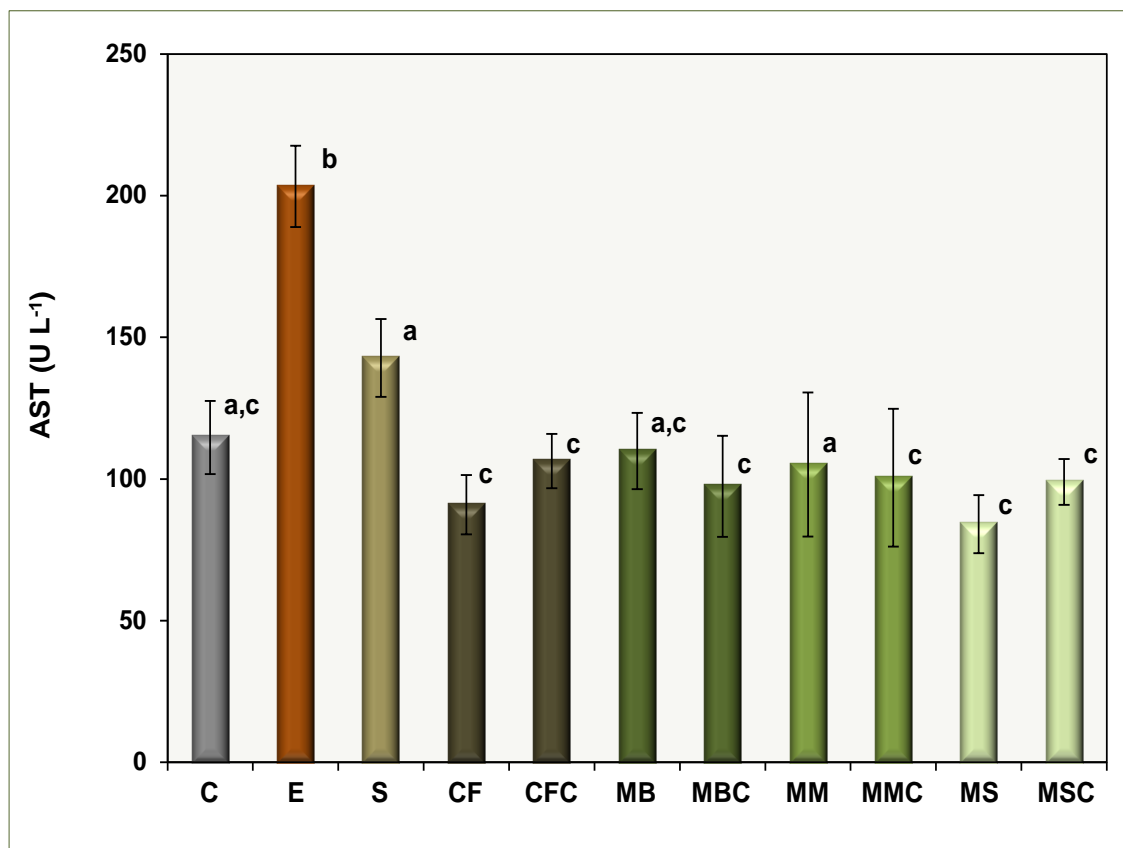


Figura 4.8. Efeito dos extratos liofilizados de *A. ponderosa* na atividade do enzima sérico AST. C – controlo negativo, E – etanol (controlo positivo), S – silimarina ($0,2 \text{ g Kg}^{-1}$) + etanol, CF – corpo de frutificação de *A. ponderosa* ($0,5 \text{ g Kg}^{-1}$) + etanol; CFC – corpo de frutificação de *A. ponderosa* ($0,5 \text{ g Kg}^{-1}$); MB, MM e MS – micélio liofilizado das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R., respetivamente, ($0,5 \text{ g Kg}^{-1}$) + etanol; MBC, MMC e MSC - micélio liofilizado das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R., respetivamente, ($0,5 \text{ g Kg}^{-1}$). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

No caso do enzima ALT (Figura 4.9), observou-se que a redução da atividade foi significativa para os grupos teste controlo administrados com corpos de frutificação, micélios de Beja e S^{to} Aleixo R. (grupos 5, 7 e 11), e do grupo teste administrado com micélio de S^{to} Aleixo R. (grupo 10) ($p < 0,05$), quando comparados com o grupo 1 (controlo negativo). Os valores de atividade dos grupos teste e teste controlo não apresentaram diferenças significativas comparativamente ao grupo padrão ($p > 0,05$).

A relação AST/ALT é um indicador da extensão das lesões hepáticas, dado que a ALT é um enzima citoplasmático, enquanto que, a AST é um enzima citoplasmático e ribossomal. Os valores do quociente AST/ALT obtidos nos grupos teste foram semelhantes aos observados para o controlo negativo e para o grupo padrão administrado com silimarina e bastante inferiores aos observados para o controlo positivo, sugerindo um efeito hepatoprotetor dos cogumelos e micélios das culturas, após intoxicação com o etanol.

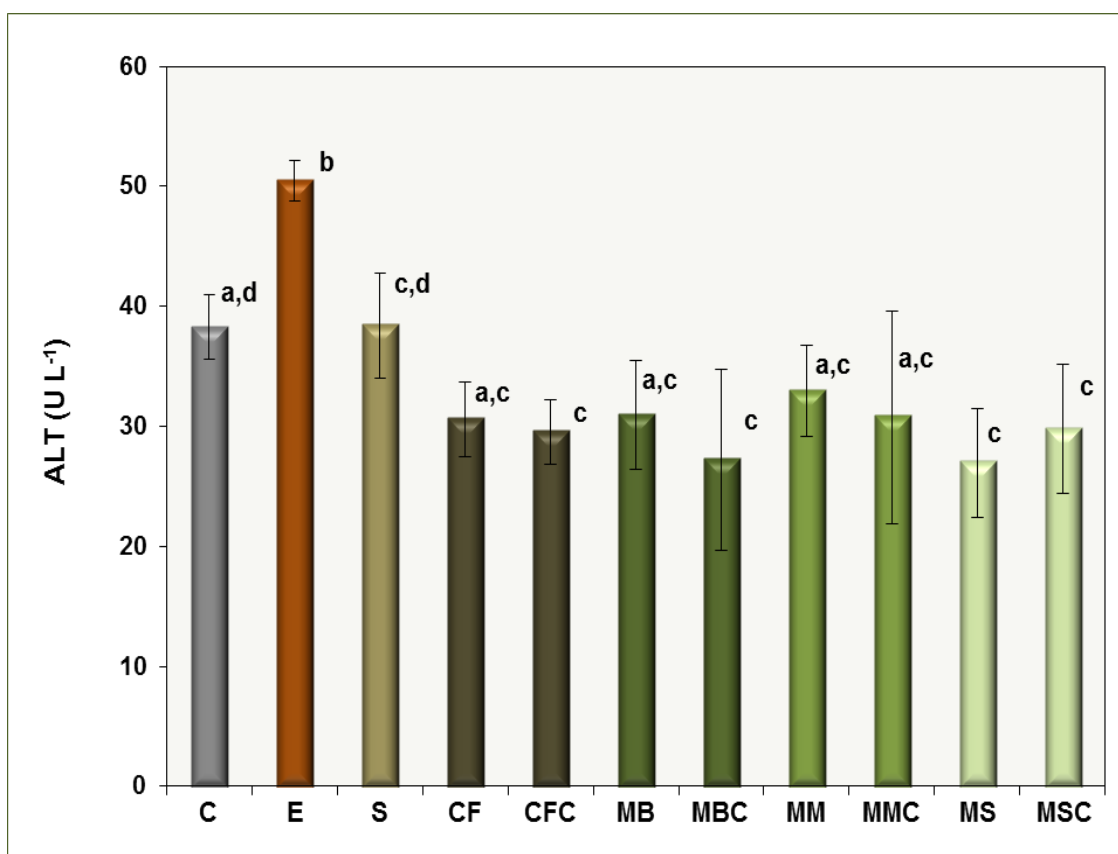


Figura 4.9. Efeito dos extratos liofilizados de *A. ponderosa* na atividade do enzima sérico ALT. C – controlo negativo, E – etanol (controlo positivo), S – silimarina ($0,2 \text{ g Kg}^{-1}$) + etanol, CF – corpo de frutificação de *A. ponderosa* ($0,5 \text{ g Kg}^{-1}$) + etanol; CFC – corpo de frutificação de *A. ponderosa* ($0,5 \text{ g Kg}^{-1}$); MB, MM e MS – micélio liofilizado das estirpes de Beja, Mértola e S¹⁰ Aleixo R., respetivamente, ($0,5 \text{ g Kg}^{-1}$) + etanol; MBC, MMC e MSC - micélio liofilizado das estirpes de Beja, Mértola e S¹⁰ Aleixo R., respetivamente, ($0,5 \text{ g Kg}^{-1}$). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Os valores de atividade dos enzimas fosfatase alcalina (ALP) e gama-glutamilttransferase (GGT) mostraram um aumento significativo de atividade enzimática no controlo positivo ($p < 0,05$), comparativamente aos grupos teste e teste controlo (corpos de frutificação e micélios), padrão silimarina e controlo negativo. De modo análogo ao que se observou para os enzimas ALT e AST, os valores de atividade obtidos para os grupos teste e teste controlo não apresentaram diferenças significativas entre si ($p > 0,05$), nem quando comparados com o padrão silimarina e com o controlo negativo ($p > 0,05$).

No enzima ALP (Figura 4.10) verificou-se que do grupo teste administrado com corpos de frutificação de *A. ponderosa* apresenta valor de atividade estatisticamente superior ($p < 0,05$) ao observado para o grupo do controlo negativo, no entanto, este facto pode-se considerar de menor importância uma vez que este grupo também não apresenta diferenças significativas relativamente ao fármaco padrão silimarina ($p > 0,05$).

Relativamente aos resultados do enzima GGT (Figura 4.11), os grupos teste controlo das amostras de corpos de frutificação e micélio de Mértola apresentam valor de atividade enzimática significativamente inferior comparativamente ao padrão silimarina ($p < 0,05$).

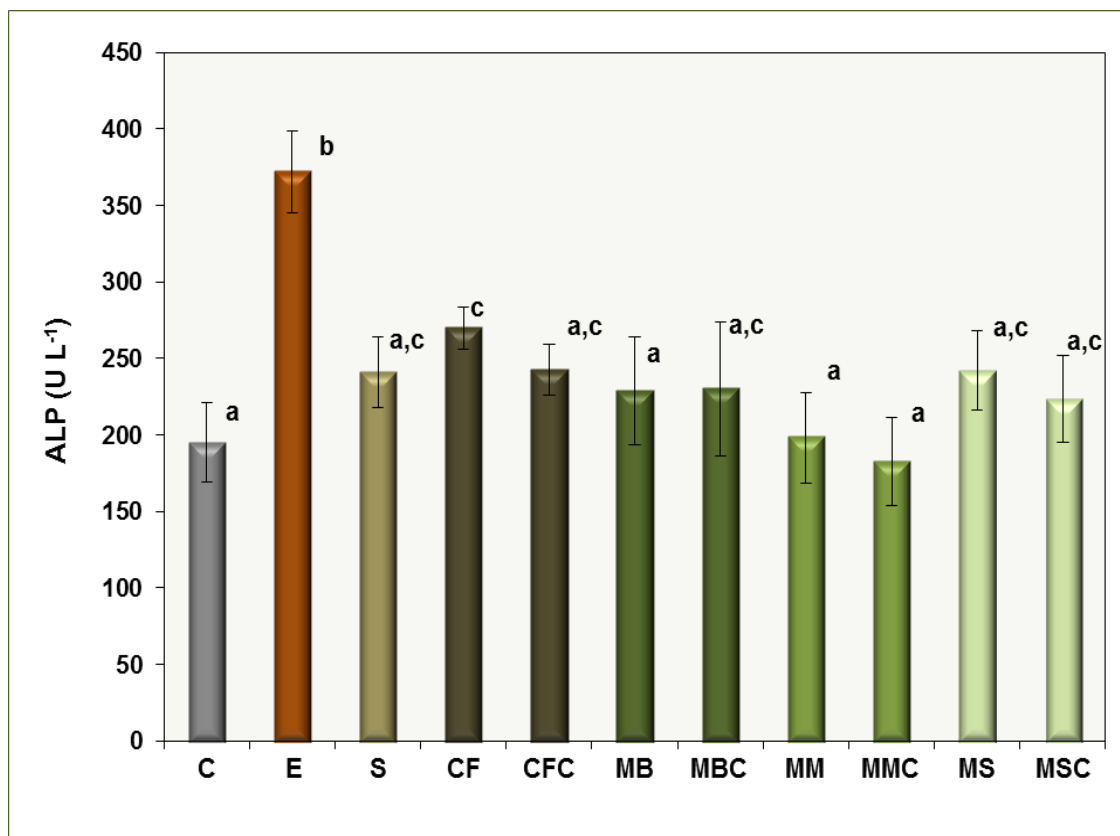


Figura 4.10. Efeito dos extratos liofilizados de *A. ponderosa* na atividade do enzima sérico ALP. C – controlo negativo, E – etanol (controlo positivo), S – silimarina ($0,2 \text{ g Kg}^{-1}$) + etanol, CF – corpo de frutificação de *A. ponderosa* ($0,5 \text{ g Kg}^{-1}$) + etanol; CFC – corpo de frutificação de *A. ponderosa* ($0,5 \text{ g Kg}^{-1}$); MB, MM e MS – micélio liofilizado das estirpes de Beja, Mértola e S¹⁰ Aleixo R., respetivamente, ($0,5 \text{ g Kg}^{-1}$) + etanol; MBC, MMC e MSC - micélio liofilizado das estirpes de Beja, Mértola e S¹⁰ Aleixo R., respetivamente, ($0,5 \text{ g Kg}^{-1}$). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Os enzimas ALP e GGT são enzimas de resposta lenta, normalmente indicando doenças subagudas ou crônicas, não sendo o enzima ALP específico do fígado. No entanto, os resultados sugerem que a administração de uma dose aguda de etanol causa alterações significativas na atividade da ALP e GGT, mas a administração prolongada das amostras de corpos de frutificação e micélios de *A. ponderosa* e de fármacos com o princípio ativo silimarina, contribui para uma redução significativa nos níveis sanguíneos destes enzimas, sugerindo um efeito protetor nas células hepáticas.

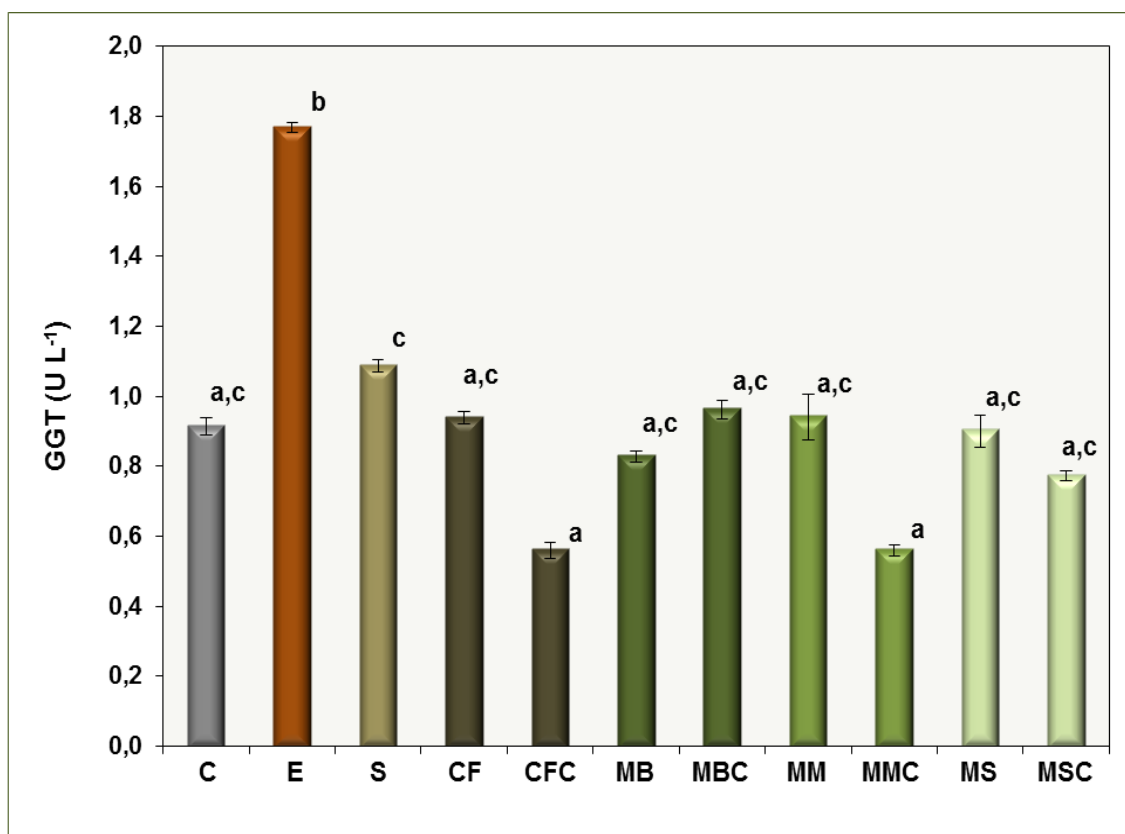


Figura 4.11. Efeito dos extratos liofilizados de *A. ponderosa* na atividade do enzima sérico ALT. C – controlo negativo, E – etanol (controlo positivo), S – silimarina (0,2 g Kg⁻¹) + etanol, CF – corpo de frutificação de *A. ponderosa* (0,5 g Kg⁻¹) + etanol; CFC – corpo de frutificação de *A. ponderosa* (0,5 g Kg⁻¹); MB, MM e MS – micélio liofilizado das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R., respetivamente, (0,5 g Kg⁻¹) + etanol; MBC, MMC e MSC - micélio liofilizado das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R., respetivamente, (0,5 g Kg⁻¹). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Os resultados mostraram que as amostras foram eficazes na redução de danos no fígado, em ratos *Wistar*, induzidas por etanol, apresentando um efeito hepatoprotetor semelhante ao fármaco padrão silimarina.

Os resultados obtidos neste estudo corroboram com estudos realizados com outros *Basidiomycetes*, *Antrodia camphorata* e *Armillariella tabescens*, cujos micélios apresentaram efeito hepatoprotetor *in vivo* (Lu *et al.* 2007). Outros estudos realizados com corpos de frutificação de *Pleurotus ostreatus* também confirmam os resultados obtidos (Jayakumar *et al.* 2006). Também os complexos proteína-polissacárido obtidos

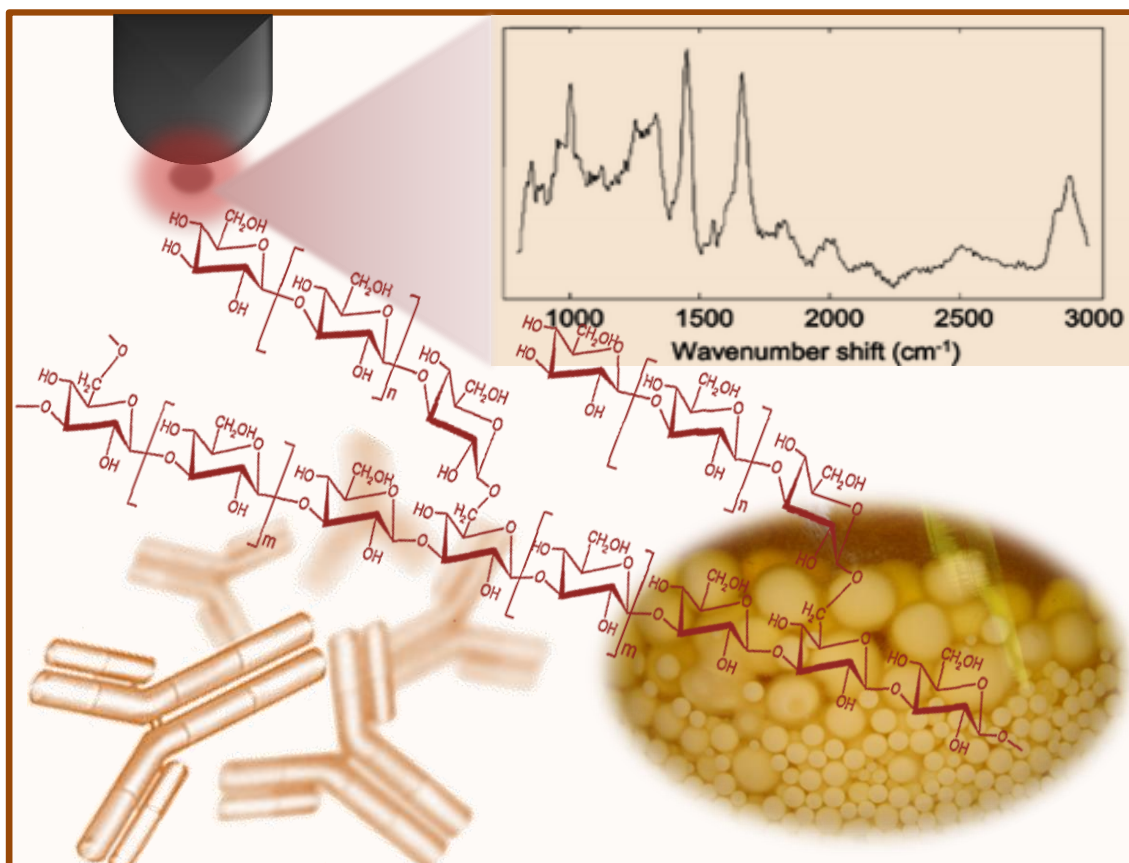
a partir de culturas de *P. ostreatus* apresentaram efeito protetor na prevenção de hepatotoxicidade induzida pelo tetracloreto de carbono (Nada *et al.* 2010), pela tioacetamida (Refaie *et al.* 2010) e pelo etanol (Salvador *et al.* 2012). Mais recentemente, um estudo de atividade gastroprotetora em ratos, de extratos de polissacáridos obtidos de corpos de frutificação de *P. ostreatus*, mostrou que a administração oral dos extratos provocou uma inibição significativa de lesões gástricas induzidas pelo ácido acético (Yang *et al.* 2012).

Apesar do mecanismo de ação pelo qual estes cogumelos exercem o seu efeito hepatoprotetor ou gastroprotetor não ser ainda conhecido, pensa-se que os seus compostos bioativos, entre os quais os polissacáridos, possam constituir futuros agentes terapêuticos no tratamento de lesões hepáticas (Ho *et al.*, 2008).

Os cogumelos e micélios de culturas de *A. ponderosa* não mostraram efeitos tóxicos quando administrados *per os* em murganhos *Swiss* na concentração de 2000 mg kg⁻¹ (LD₅₀ >> 2000 mg kg⁻¹). Adicionalmente a administração oral (durante 10 dias) em ratos *Wistar* revelou um efeito hepatoprotetor.

Assim, os resultados apontam para a possibilidade de utilização destes cogumelos/micélios como suplementos alimentares, nutracêuticos, coadjuvantes no tratamento de doenças hepáticas.

Caracterização e atividade biológica de complexos proteína – polissacárido produzidos em culturas de *A. ponderosa*



5.1 Introdução

Os fungos do filo *Basidiomycota* têm sido alvo de grande interesse, pelo facto de possuírem na sua constituição um elevado número de compostos biologicamente ativos, tais como polissacáridos, glicoproteínas, triterpenos, entre outros (Wasser 2002). Neste sentido os cogumelos têm sido utilizados não só como fontes de alimento mas também como fontes de compostos com propriedade medicinais (Aida *et al.* 2009; Reis *et al.* 2012a).

Como referido anteriormente, alguns cogumelos e/ou os seus extratos, nomeadamente extratos de polissacárido, são comercializados como suplementos alimentares, devido às suas propriedades antitumorais e imunomoduladoras e são usadas como suplementos alimentares ou alimentos funcionais no sentido de promover a melhoria, prevenção ou tratamento de algumas doenças (Synytsya *et al.* 2009; Vaz *et al.* 2011b).

Os polissacáridos representam o principal constituinte que determina a rigidez e as propriedades morfológicas da parede celular fúngica, e, dependendo das condições de cultura estes também podem ser excretados para o meio de cultura (Gern *et al.* 2008).

Tal como mencionado, apesar dos compostos polissacáridos produzidos em cogumelos possuírem uma composição química diferente, a maioria deles pertencentes ao grupo dos glucanos de estrutura linear ou ramificada com diferentes tipos de ligações glicosídicas, tais como (1,3),(1,6)- β -glucanos e (1,3)- α -glucanos, enquanto alguns são heteroglicanos contendo ácido glucurónico, xilose, glucose, galactose, manose, fucose, arabinose ou ribose como componentes principais de cadeia lateral, ou em diferentes combinações (Aida *et al.* 2009; Kozarski *et al.* 2012; Palacios *et al.* 2012; Synytsya *et al.* 2009).

A possibilidade de aplicação destes biopolímeros na saúde humana levou a uma intensa pesquisa acerca da sua caracterização e avaliação (Gern *et al.* 2008). Na bibliografia são atribuídas importantes propriedades bioativas aos β -glucanos ou

complexos proteína-polissacárido produzidos em varias espécies de cogumelos, mas não foram encontrados estudos relativos à produção destes complexos para *Amanita ponderosa*.

Este capítulo foca-se na caracterização de complexos proteína-polissacárido (PPS) produzidos em culturas líquidas de *A. ponderosa*, e no desenvolvimento de uma metodologia de monitorização de produção, utilizando técnicas de microanálise para *screening* dos compostos e técnicas imunológicas para controlo da especificidade de produção.

5.2 Metodologia

5.2.1 Amostras

A estirpe de *A. ponderosa* isolada de corpos de frutificação (secção 2.2.3), de S^{to} Aleixo R, foi utilizada neste estudo, para produção de novas culturas líquidas.

Os extratos de complexos proteína-polissacárido (PPS), obtidos das amostras de corpos de frutificação e culturas (micélios e sobrenadantes) das estirpes isoladas de *A. ponderosa* recolhidos em Beja, Mértola e S^{to} Aleixo da Restauração, foram preparados como descrito na secção 3.2.5.

5.2.2 Culturas líquidas

Para a caracterização dos complexos PPS, foram efetuadas culturas líquidas de 500 mL de acordo com o descrito na secção 3.2.2.

Foram ainda efetuadas culturas em *batch*, as quais foram preparadas em frascos de agitação contendo 100 mL de meio de cultura *malt extract* (Anexo A, Tabela A.5) com 20 g L⁻¹ de glucose. Estas culturas foram efetuadas nas mesmas condições de incubação que as anteriores (28°C, em agitação orbital a 150 rpm, durante 15 dias), tendo sido produzidas apenas para a estirpe de S^{to} Aleixo da Restauração (Figura 5.1). Foram realizadas 30 culturas sendo retiradas 2 culturas a cada dia de incubação, iniciando-se no dia zero até ao dia 15.



Figura 5.1. Crescimento das culturas líquidas de 100 mL da estirpe de *A. ponderosa* de S^{to} Aleixo R.

5.2.2.1 Determinação da biomassa

A separação da biomassa do sobrenadante, obtida nas culturas de *A. ponderosa*, foi efetuada de acordo com o descrito na secção 3.2.2.1. O peso seco da biomassa foi determinado após secagem do micélio a 60°C, durante 48 h, a peso constante. Posteriormente a biomassa e sobrenadante foram liofilizados.

5.2.3 Extração dos complexos PPS dos corpos de frutificação e culturas

A extração dos complexos PPS extra e intracelulares das culturas líquidas das estirpes isoladas de *A. ponderosa* e amostras de corpos de frutificação foi efetuada como descrito anteriormente na secção 3.2.5. Os extratos obtidos foram posteriormente liofilizados.

5.2.3.1 Quantificação de polissacáridos e proteína nos extratos de complexos PPS

A concentração de polissacáridos presentes nos extratos de complexos PPS extra e intracelulares obtidos foi determinada pelo método do fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.* 1956; Salvador *et al.* 2012) tal como descrito na secção 3.2.5.1.

A concentração de proteína presente nos extratos de PPS foi determinada pelo método de *Bradford* que utiliza o corante Azul de *Coomassie* G-250 (Bradford 1976), de acordo com o descrito na secção 3.2.5.2.

5.2.4 Análise dos compostos proteína-polissacárido (PPS)

As amostras liofilizadas de extratos de complexos PPS obtidos de corpos de frutificação e culturas *A. ponderosa* de foram analisadas pelas técnicas microscópicas de FTIR-ATR (*fourier-transform infrared using the attenuated total reflection*) e Raman e cromatográficas de exclusão molecular (SEC), troca iônica (IEC) e SEC-UV-RI-HPLC.

As técnicas microscópicas de ATR e Raman não exigem mais que 2 mm³ de amostra (de forma a cobrir a janela de diamante ATR ou para focar o feixe do laser do Raman). Desta forma, os extratos PPS liofilizados foram suavemente homogeneizados e preparados em lâminas microscópicas de forma a obter finas películas de amostra.

5.2.4.1 Análise por FTIR-ATR

Os espectros de infravermelho de transformação de Fourier (FTIR) (região espectral 4000 – 400 cm⁻¹) das amostras polissacáridos foram obtidos num espectrómetro *BRUKER alfa* utilizando a técnica de medição de reflexão total atenuada (ATR) (Figura 5.2). Todos os espectros foram obtidos do resultado da média de três medições independentes com acumulação de 128 espectros cada, com uma resolução espectral da ordem de 4 cm⁻¹, utilizando o *software OPUS 6.5* (Na *et al.* 2010; Synytsya *et al.* 2009).



Figura 5.2. Módulo de ATR do espectrómetro de FTIR (*BRUKER alfa*).

5.2.4.2 Análise por microscopia Raman

As lâminas contendo as amostras foram colocadas no suporte do microscópio Raman *HORIBA XPlora*, o qual tem capacidade de ampliação até cem vezes. O espectro de Raman foi obtido num espectrômetro de Raman *HORIBA XPlora* equipado com um divisor de feixe de quartzo, e com um detetor CCD (*Charge Coupled Device*) (Figura 5.3). A radiação utilizada foi o laser 638 nm, com filtro de 10 - 100%, aumento este realizado de forma gradual de forma a evitar destruição da amostra.

Os espectros foram obtidos utilizando um sistema de varrimento ($400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$) à temperatura ambiente no escuro com as seguintes condições: a potência do laser foi fixada em 100 mW, a acumulação de 5 espectros com uma resolução espectral da ordem de 5 cm^{-1} e com tempo de aquisição de 10 – 20 s (Na *et al.* 2010; Synytsya *et al.* 2009). Os espectros Raman foram gravados após o tempo de exposição, os dados espectrais foram suavizados e a linha de base corrigida utilizando o *software NGS LabSpec 5* (Copyright 2008).



Figura 5.3. Espectrômetro de Raman (*HORIBA XPlora*).

5.2.4.3 Caracterização dos complexos PPS por SEC-UV-RI-HPLC

Os extratos de complexos PPS obtidos de corpos de frutificação e culturas das estirpes de *A. ponderosa* de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R., assim como as frações purificadas de complexos PPS intracelulares obtidas por SEC e IEC, foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – *high performance liquid chromatography*).

O sistema de HPLC utilizado está equipado com uma bomba (*Masterflex L/S 77200-50*) com um injetor de *loop* de 20 μL , acoplado a um detetor de ultravioleta (*Hitachi L-2400*) a 280 nm e a um detetor de RI (*Hitachi L-2490*) (Figura 5.4). O processo de separação foi efetuado recorrendo a uma coluna de exclusão molecular (SEC) (*shodex OHpak SB-803 HQ*), com limite de fracionamento de 100 kDa.

A eluição das amostras, previamente filtradas em filtros *Millipore HA 0,45 μm* , foi efetuada com uma solução de NaCl 0,05 M em água ultrapura, sendo realizada uma eluição isocrática a um fluxo de 0,6 mL min^{-1} (Arteiro *et al.* 2012; Salvador *et al.* 2012). Para determinação das massas moleculares (MM) dos complexos, procedeu-se à eluição, nas mesmas condições cromatográficas, de padrões de polietilenoglicol (PEG) de 1,5, 3, 6, e 20 kDa (*Sigma*) (Anexo G, Figura G.1), de forma a proceder à construção de uma curva padrão (Anexo G, Figura G.2).



Figura 5.4. Sistema de SEC-UV-RI-HPLC.

5.2.4.4 Separação dos complexos PPS intracelulares por cromatografia de exclusão molecular (SEC)

A separação dos extratos de complexos PPS intracelulares das culturas de *A. ponderosa* de S^{to} Aleixo R foi realizada por cromatografia de exclusão molecular (SEC), utilizando como fase estacionária uma resina *Sephacryl S-300* (*GE Healthcare*) (Figura 5.5).

Nesta técnica cromatográfica as moléculas são separadas com base no seu raio hidrodinâmico. A resina utilizada possui um intervalo de fracionamento entre 10 - 1500 kDa (Josic *et al.* 1998; Lee *et al.* 2012).

Procedeu-se, previamente, à preparação do sistema cromatográfico, constituído por uma coluna de vidro, com um volume total de 85 mL (1 m de comprimento e 1 cm de diâmetro interno), à qual foi adaptada uma bomba peristáltica de fluxo variável. A coluna foi empacotada com uma resina de exclusão molecular *Sephacryl S-300* (*GE Healthcare*), durante um primeiro ciclo de duas h, a um fluxo de 1 mL min⁻¹ e um segundo ciclo de 2 h com um fluxo de 2,3 mL min⁻¹. Foi aplicado 1 mL de amostra, correspondente a 50 mL de cultura e as frações foram eluídas com tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7, a um fluxo de 0,2 mL min⁻¹. Recolheram-se frações de 1 mL e procedeu-se à leitura do valor de absorvância das mesmas a 280 nm.



Para caracterização do sistema cromatográfico procedeu-se à eluição das proteínas urease (480 kDa), ovalbumina (45 kDa) e citocromo C (12,3 kDa), numa mistura contendo azul de dextrano (2,000 kDa) para determinação do volume de exclusão da coluna, utilizando as mesmas condições cromatográficas. (Anexo G, Figura G.3) e de forma a proceder à construção de uma curva padrão (Anexo G, Figura G.4).

Figura 5.5. Sistema cromatográfico utilizado para separação dos extratos de PPS por SEC.

5.2.4.5 Separação dos complexos PPS por cromatografia de troca iônica (IEC)

Os extratos de complexos PPS intracelulares das culturas de *A. ponderosa* de S¹⁰ Aleixo R foram purificados por de cromatografia de troca iônica (IEC). Esta técnica utiliza resinas de troca iônica para separar iões atômicos ou moleculares com base na sua interação com a matriz, polímero que contém grupos ligados carregados, sendo a separação dos analitos efetuada de forma isocrática ou por aplicação de um gradiente. A vantagem desta técnica prende-se com a simplificação da determinação de espécies iônicas. Permite analisar ácidos orgânicos alifáticos e ácidos sulfúricos orgânicos, espécies bioquímicas como glúcidos: mono, dissacáridos e alguns oligossacáridos; aminoácidos e proteínas (Colombini & Modugno 2004; Guélat *et al.* 2012).

Utilizou-se como fase estacionária a resina DEAE (dietilaminoetanol) *Sepharose fast flow* (GE Healthcare), que promove a troca de espécies aniônicas (Figura 5.6), e como fase móvel tampão fosfato 50 mM, pH 7. A eluição da amostra na fase inicial de lavagem da coluna foi efetuada a um caudal de 0,5 mL min⁻¹, tendo sido recolhidas 22 frações com um volume de 2 mL sendo a absorvância monitorizada a 280 nm até se atingir um valor de 0,05 nm, o que corresponde à eluição das proteínas não ligadas à coluna.

De forma a eluir as proteínas presentes na amostra, que ficaram retidas na resina de troca iônica a coluna foi sujeita a um gradiente de cloreto de potássio (KCl) de 0 a 1M com um caudal de 2 mL min⁻¹. Foi aplicado 100 mL de KCl 1M e posteriormente KCl 2M com objetivo de confirmar a total eluição das amostras proteicas retidas na coluna.



Figura 5.6. Esquema representativo do processo de cromatografia de troca iônica

5.2.5 Avaliação do efeito dos extratos PPS de *A. ponderosa* em células MDA-MB231

5.2.5.1 Cultura celular e manuseamento

O estudo do potencial antiproliferativo dos extratos de complexos PPS foi efetuado na linha celular de cancro da mama MDA-MB-231, sendo o procedimento experimental semelhante ao descrito na secção 3.2.7.1.

5.2.5.2 Proliferação celular

O efeito dos extratos de PPS obtidos das culturas (micélios e sobrenadantes) de *A. ponderosa* na proliferação celular foi determinado pelo ensaio do MTT (*Calbiochem*). (Lü *et al.* 2012; Mota *et al.* 2012; Wang *et al.* 2011), tal como descrito na secção 3.2.7.2.

Para estes ensaios foram efetuadas culturas de células MDA-MB-231 em placas de 96 poços na concentração de 2×10^4 células/poço, e após as 24 h, as células foram incubadas com crescentes concentrações de extratos liofilizados de PPS extraídos dos micélios e sobrenadantes das culturas de *A. ponderosa* das estirpes referidas (0,01, 1, 10, 25, 50, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, e $500 \mu\text{g mL}^{-1}$), dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO, *cell culture grade*, *Sigma-Aldrich*) e os controlos foram efetuados com DMSO.

A percentagem de proliferação e determinação dos valores IC_{50} para as amostras testadas foram determinados tal como descrito na mesma secção 3.2.7.2.

Todos os resultados experimentais foram efetuados em triplicado ($n = 3$) para cada amostra e os valores foram apresentados com valores médios \pm desvio padrão (SD).

5.2.6 Reconhecimento de complexos PPS por anticorpos específicos

Para a análise do reconhecimento de compostos PPS nos extratos de *A. ponderosa* utilizaram-se anticorpos específicos obtidos pela técnica de tecnologia de hibridomas, por Martins et al. 2005. Os anticorpos 2.58, 3H8-3H7, 1E6-1E8 e 1E6-1E8-B3, produzidos após imunização *in vivo* de murganhos *Balb/c*, com compostos PPS de culturas de *Basidiomycetes*, foram gentilmente cedidos para este trabalho.

5.2.6.1 *Screening* de deteção de complexos PPS pelos anticorpos produzidos através método *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

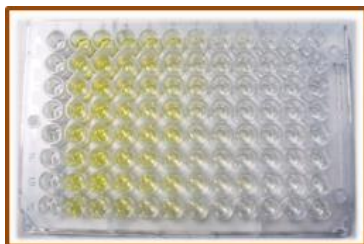
A análise da deteção dos complexos PPS presentes nos extratos obtidos dos corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das culturas de *A. ponderosa* das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R., foi realizada através de um *screening* pelo método de ELISA, utilizando os diferentes anticorpos obtidos. Desta forma revestiu-se a placa de ELISA com 100 µL do antigénio (extratos de PPS), na concentração de 200 µg mL⁻¹ diluídos em tampão fosfato salino 1X (PBS – *phosphate buffered saline*), (137 mM NaCl, 10 mM fosfato (10,1 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄), 2,7 mM KCl, pH 7,4). Efetuaram-se brancos do ensaio aos quais foi adicionado apenas PBS 1X. Foram também revestidos poços com cada uma das amostras que serviram de brancos para anticorpo específico, para o anticorpo conjugado e para o substrato. A placa de ELISA foi incubada *overnight* a 4°C no escuro. Depois da incubação a placa foi lavada três vezes com 150 µL/poço de PBS 1X, bloquearam-se os poços com 100 µL de uma solução de albumina do soro bovino (BSA – *bovine serum albumin*) a 1% em PBS 1X e incubou-se a placa durante 30 min à temperatura ambiente. Este passo permite a remoção de anticorpos não ligados pela ligação da BSA a locais de ligação não-específicos. O conteúdo da placa foi excluído e não se procedeu à lavagem dos poços. Posteriormente adicionou-se 50 µL/poço do anticorpo específico (1^o anticorpo) diluído em PBS com BSA 0,1% e incubou-se 1 h a 37°C. Antes de se adicionar o anticorpo conjugado procedeu-se a três lavagens com 150 µL/poço com uma solução

de PBS-*Tween* 20 a 0,05%, e posteriormente adicionou-se 50 µL/poço do anticorpo conjugado (2º anticorpo), Anti-Mouse IgM (*p-chain specific – Alkaline phosphatase antibody produced in goat*) diluído de 1:5000 e Anti-Mouse IgG (*whole molecule – alkaline phosphatase, antibody produced in rabbit*) diluído de 1:1000 em PBS-*Tween* com BSA 0,1%. Incubou-se mais 1 h a 37°C e lavou-se a placa três vezes com 150 µL/poço da solução de PBS-*Tween*, uma vez com H₂O e uma vez com tampão glicina (0,1 M pH 10,4 com 1 mM MgCl₂ e 1 mM ZnCl₂). Por fim adicionou-se 50 µL/poço de uma solução de substrato enzimático p-nitrofenilfosfato (p-NPP) (*Sigma-Aldrich*) na concentração de 1 mg mL⁻¹ (dissolvido em tampão glicina) incubou-se 30 min a 37°C. A placa foi lida a 415 nm num leitor de microplacas (*ELX800G model, Biotek Instruments Inc., Gen 51.5 software, Biotek*) (Karmali & Oliveira 1999; Libjaková *et al.* 2007). Os resultados foram expressos em unidades de anticorpo por mL, sendo uma unidade de anticorpo definida como a quantidade de anticorpo necessária para produzir o aumento de uma unidade de absorvância a 405 nm após 30 min de reação do anticorpo conjugado Anti-Mouse IgM com o substrato p-NPP (Martins *et al.* 2005; Martins *et al.* 2011).

5.2.6.2 Detecção dos complexos PPS produzidos nas culturas e nas frações obtidas por análise cromatográfica

A análise do reconhecimento de complexos PPS presentes nos extratos obtidos nas culturas de *A. ponderosa* foi efetuada para os extratos obtidos nos micélios das culturas dos diferentes dias de crescimento. Foi também analisado o reconhecimento dos complexos presentes nas frações purificadas por cromatografia de exclusão molecular e cromatografia de troca iônica. Os ensaios foram efetuados pela técnica de ELISA de acordo com o descrito no ponto 5.2.8.1 mas apenas utilizando o anticorpo que apresentou melhores resultados de reconhecimento e com IgM como 2º anticorpo. Efetuou-se ainda uma curva de calibração de reconhecimento de complexos PPS para o anticorpo (Figura 5.7). Para tal utilizaram-se diferentes concentrações (50, 100, 200,

400, 600, 800, 1000 e 1500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de extratos polissacáridos obtidos das culturas de *A. ponderosa*. (Anexo H, Figura H.1). Os resultados de reconhecimento de complexos



PPS pelo anticorpo foram expressos em μg polissacáridos por mg de massa seca.

Figura 5.7. Placa de ELISA mostrando os resultados obtidos para o reconhecimento de complexos PPS a diferentes concentrações para a construção da curva de calibração.

5.2.6.3 Análise do tipo de competição antigénica por ELISA

Na análise do tipo de competição antigénica para o anticorpo selecionado utilizou-se a técnica de ELISA descrita no ponto 5.2.8.1 com algumas modificações. O anticorpo foi previamente pré-incubado com concentrações crescentes de diferentes antígenos competidores. Foram utilizados como possíveis antígenos competidores amido, celulose, quitosano, pectina, xilano, e extratos de complexos PPS obtidos dos micélios e sobrenadantes de culturas de *Coriolus versicolor* e *Pleurotus ostreatus*. Para tal as diferentes concentrações de antígenos competidores (0, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foram incubadas com o anticorpo (100 μL de anticorpo + 100 μl de antígeno competidor a cada concentração) à temperatura ambiente, durante 1 h e posteriormente adicionados na placa de ELISA em vez de se efetuar a adição apenas do anticorpo. Neste ensaio para além dos controlos sem anticorpo, sem 2º Anticorpo e sem substrato foram efetuados controlos sem antígeno original (controlo do PBS) para cada um dos competidores à concentração máxima.

Se a absorvância a 405 nm for baixa à concentração máxima do competidor, significa que o anticorpo reconhece o determinante antigénico nesse competidor e a relação Abs 405 nm versus concentração do antígeno competidor deve ser inversamente proporcional. Se não houver competição significa que o determinante antigénico está ausente ou inacessível. Competição intermédia indica uma quantidade reduzida do determinante ou acessibilidade reduzida dos determinantes na molécula do antígeno competidor.

5.2.7 Confirmação da especificidade do anticorpo por *Western blotting*

A especificidade do anticorpo foi determinada por *Western blotting* utilizando como antigénio a amostra inicial de extrato de complexos PPS e as frações purificadas obtidas por cromatografia de exclusão molecular (SEC) e troca iónica (IEC) (Karmali & Oliveira 1999; Martins *et al.* 2005).

Para a técnica de *Western blotting* os antigénios solúveis foram previamente separados por eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições nativas (PAGE-Nativa). Cada gel foi dividido em dois sendo uma metade corada com a prata e a outra metade do gel foi usado para a transferência para membrana de nitrocelulose.

5.2.7.1 Análise dos extratos de complexos PPS e frações purificadas por eletroforese PAGE-Nativa

A análise dos extratos de complexos PPS e frações purificadas obtidos dos micélios das culturas de *A. ponderosa*, foi realizada em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes (Martins *et al.* 2005), utilizando géis de gradiente de 1–10% em acrilamida, construídos com o auxílio de um sistema de vasos comunicantes. As soluções para construção dos géis de poliacrilamida foram constituídas de: 1 mL ou 0,1 mL de solução de acrilamida: bisacrilamida (30:0,8) para a solução a 10% e 1% respetivamente, 0,3 mL de tampão TBE 10X (tris-borato 0,89 M com EDTA 20 mM a pH 8,3), 1µL de TEMED, e 0,063 mL de persulfato de amónio a 1,5% (o qual só se adicionou à mistura imediatamente antes da aplicação do gel entre as placas) e 2,538 mL ou 1,647 mL de H₂O para a solução a 10% e 1% respetivamente, perfazendo um volume final de 3 mL para cada solução. Após a colocação do gel nos vidros de eletroforese foi introduzido de seguida o pente e posteriormente retirado após a polimerização do gel. A eletroforese foi preparada usando o equipamento *mini-protean Bio-Rad* (Figura 5.8). Colocaram-se os géis no suporte da tina de eletroforese com os

poços voltados para o interior, e de seguida o tampão de eletroforese TBE 1X (diluição de 1:10 do tampão TBE 10X) sem deixar que o tampão entre os géis e fora contacte, aplicando-se de seguida as amostras nos poços dos géis. Como marcadores moleculares utilizaram-se as proteínas urease (480 kDa), albumina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa) e citocromo c (12,3 kDa). No primeiro poço foi aplicado 20 μL da solução de marcadores moleculares (10 μL de padrões com 10 μL de solução de aplicação de azul de bromofenol 0,02 mg mL^{-1} em TBE 1X) e nos restantes poços aplicaram-se 20 μL de cada amostra (10 μL de amostra com 10 μL de solução de aplicação de sacarose a 2 M). A corrida eletroforética efetuou-se durante cerca de 2h e 30 min com uma diferença de potencial de 100 V.

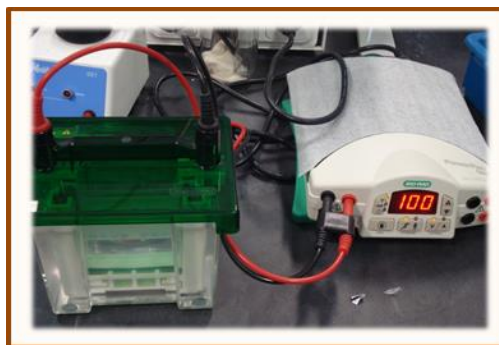


Figura 5.8. Sistema de eletroforese para PAGE-Nativa.

5.2.7.2 Coloração com nitrato de prata

Os géis de poliacrilamida foram corados com solução de nitrato de prata. Para tal os géis foram colocados numa tina e adicionaram-se 50 mL de solução de fixação de formaldeído (40 mL de metanol, 50 μL de formaldeído a 37% para um volume final de 100 mL em H_2O destilada), deixando em agitação durante 10 min à temperatura ambiente, sendo de seguida lavados (2X) com H_2O destilada durante 5 min em agitação. Posteriormente foi adicionado 50 mL de solução de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 0,2 g L^{-1}), mantendo em agitação durante 1 min e os géis foram novamente lavados (2X, 20 s) com H_2O destilada. De seguida, procedeu-se à reação com a prata, colocando-se os géis em 50 mL de uma solução de nitrato de prata (AgNO_3 , 0,1% (m/v)), mantendo em agitação durante 10 min e procedeu-se a nova

lavagem (2X, 1 min) com H₂O destilada. Os géis foram colocados na solução de desenvolvimento de tiosulfato (7,5 g de Na₂CO₃, 50 µL de solução stock de Na₂S₂O₃.5H₂O a 2 g L⁻¹, 125 µL de formaldeído a 37%, para um volume total de 250 mL de H₂O destilada), em agitação suave, durante 2 a 5 min, observando-se numa câmara de UV (Bio-Rad) o aparecimento das bandas até adquirirem intensidade adequada (Bloom *et al.* 1987; Wray *et al.* 1981). Após a revelação das bandas, os géis foram colocados em 100 mL solução de desenvolvimento de tiosulfato acidificada (solução de desenvolvimento de tiosulfato com 5 mL de ácido cítrico 2,3 M) durante 10 min, de forma a parar a reação, sendo lavados (3X, 5 min) com H₂O destilada. Por último, os géis foram preservados (10 min) numa solução de preservação (ácido acético 10% v/v e glicerol 10% v/v).

5.2.7.3 Transferência das amostras do gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose

A membrana de nitrocelulose possui grupos nitro ligados à celulose, produzindo, desta forma, um suporte com alta afinidade por proteínas, fazendo com que estas permaneçam presas à sua superfície. Para transferir o antígeno do gel de eletroforese para a membrana utiliza-se um campo elétrico, e no final da eletrotransferência essa membrana servirá como suporte para o ensaio imunoenzimático (Imunoblot).

Para a transferência o gel foi lavado com tampão de transferência (tris 25 mM com glicina 192 mM pH 8,3) várias vezes durante 15 min mudando a solução. A membrana de nitrocelulose foi cortada de acordo com as dimensões do gel, e foi mergulhada em tampão de transferência durante 15 a 30 min, tendo o cuidado de evitar bolhas de ar. A tina foi cheia com tampão de transferência e cortaram-se várias folhas de papel de filtro de acordo com as dimensões do gel e foram colocadas, tal como as esponjas, a embeber em tampão de transferência. Para a montagem do processo de transferência seguiu-se o seguinte a sequência: em primeiro lugar colocou-se a placa com o disco preto (Cátodo (-)), em seguida uma esponja e duas folhas de papel de filtro, depois o

gel de acrilamida e a membrana de nitrocelulose, novamente duas folhas de papel de filtro e uma esponja e por fim a placa com o disco vermelha (Ânodo (+)). Fechou-se o sistema, colocou-se o suporte na tina com o lado do Cátodo (-) para o mesmo lado do polo negativo da tina. De cada vez que se colocou as folhas de papel de filtro, o gel ou a membrana removeram-se as bolhas de ar e o excesso de líquido com o auxílio de uma pipeta. A transferência foi efetuada à temperatura de 4°C, a 100 mA, durante 3 h, sob agitação constante.

5.2.7.4 Análise por ELISA da especificidade do anticorpo para o antigénio transferido em membrana de nitrocelulose

Após a transferência as membranas foram sujeitas à técnica de ELISA para avaliação do reconhecimento das bandas das amostras de polissacáridos transferidas pelo anticorpo produzido. A membrana foi colocada na solução fixadora contendo 2% BSA e 0,1% de azida de sódio em TTBS (*Tween Tris buffered saline*: tris-HCl 20 mM pH 7,5 com NaCl 0,15 mM e *Tween 20* 0,05% (v/v)) e foi mantida *overnight* com agitação. A membrana foi lavada 3X com TTBS durante 5 min e incubou-se com o 1º anticorpo durante 3 h sob agitação. Efetuaram-se novamente 3 lavagens, 5 min cada, com TTBS (de forma a retirar o anticorpo ligado não especificamente) e adicionou-se o 2º anticorpo conjugado (IgM com diluição 1: 5000) em TTBS, permanecendo em agitação durante 1h. Posteriormente foram efetuadas 5 lavagens com TTBS (5 min cada) e a membrana foi embebida rapidamente na solução de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) (no escuro e com a concentração de 1mg 10 ml⁻¹ em tampão tris 100 mM contendo NaCl 100 mM e MgCl₂ 5 mM pH 9,55). A reação enzimática foi parada quando apareceram as bandas azul violeta, sendo a membrana lavada com água milliQ e mantendo a membrana no escuro para secar.

5.2.8 Análise estatística

Os valores de IC_{50} de percentagem de proliferação celular nos diferentes extratos foram apresentados como valores médios \pm desvio padrão (SD). As diferenças entre médias foram avaliadas estatisticamente usando o software *SPSS*[®] 21.0 para *Windows Copyright*[®] (*Microsoft Corporation*), por parâmetros de análise descritiva e ANOVA *One-way*. A homogeneidade das variâncias populacionais foi confirmada pelo teste de *Levene*. e as comparações múltiplas de médias foram avaliadas pelo teste de *Tukey*. A significância dos valores estabeleceu-se para um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Produção e isolamento de complexos proteína-polissacárido em culturas de *A. ponderosa*

As culturas puras de *A. ponderosa*, isoladas a partir da remoção de pequenos fragmentos do interior dos chapéus dos corpos de frutificação jovens, foram realizadas em meio líquido de forma a proceder à produção e obtenção de extratos de compostos proteína-polissacáridos (PPS) por isolamento nos micélios e sobrenadantes.

Foi possível obter extratos PPS de corpos de frutificação de *A. ponderosa* das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R. e dos micélios e sobrenadantes das culturas efetuadas com isolados das referidas estirpes. Os resultados de conteúdo em polissacáridos e proteína referentes aos extratos PPS obtidos das diferentes estirpes ao décimo quinto dia de cultura estão apresentados na Tabela 5.1.

Os resultados obtidos mostraram que existe um aumento de conteúdo em polissacárido e também em proteínas nos corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes da estirpe de S^{to} Aleixo R. relativamente às restantes estirpes.

Tabela 5.1. Conteúdo em polissacáridos e proteína nos extratos de complexos PPS obtidos nos corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes de *A. ponderosa* das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R..

| Extratos PPS | Estirpe | [polissacáridos] μg mg ⁻¹ ms extrato PPS | [proteína] μg mg ⁻¹ ms extrato PPS |
|------------------------|---------------------------|--|--|
| Corpos de frutificação | Beja | 93,081 ± 10,767 | 9,670 ± 0,429 |
| | Mértola | 61,527 ± 3,376 | 4,972 ± 0,827 |
| | S ^{to} Aleixo R. | 137,279 ± 4,905 | 42,041 ± 1,038 |
| Micélios | Beja | 425,135 ± 28,475 | 7,878 ± 0,682 |
| | Mértola | 546,599 ± 30,624 | 6,074 ± 0,773 |
| | S ^{to} Aleixo | 589,977 ± 19,505 | 12,517 ± 0,446 |
| Sobrenadantes | Beja | 335,676 ± 13,665 | 6,062 ± 0,425 |
| | Mértola | 260,563 ± 42,809 | 7,763 ± 1,817 |
| | S ^{to} Aleixo R. | 608,761 ± 46,274 | 26,113 ± 2,192 |

Os valores apresentados são a média ± desvio padrão de três réplicas.

5.3.2 Detecção de compostos PPS por FTIR-ATR e Raman

Os extratos de complexos PPS obtidos dos corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das culturas das diferentes estirpes de *A. ponderosa* foram analisados por duas técnicas espectroscópicas de microanálise de forma a confirmar a presença destes compostos nos extratos obtidos. Os espectros de FTIR-ATR e Raman dos extratos de complexos PPS são mostrados nas Figuras 5.9 e 5.10.

Pela análise dos espectros de FTIR-ATR obtidos (Figura 5.9), podem ser observadas bandas de infravermelho (IR – *infrared*) intensas entre 3000–3500 cm^{-1} que sugerem vibrações de alongamento dos grupos OH dos hidroxilos presentes nos polissacáridos (Gonzaga *et al.* 2005). A banda observada em 2930 cm^{-1} deve-se a vibração dos grupos CH_2 presentes em lípidos, revelando que uma pequena quantidade seja extraída durante o processo de obtenção dos complexos PPS (Li *et al.* 2008; Synytsya *et al.* 2009). Bandas moderadas de IR próximas de 1400 e 1600 cm^{-1} são características de grupos carboxilatos (Na *et al.* 2010) e as bandas intensas observadas na região entre 900–1200 cm^{-1} são características de glúcidos e podem ser atribuídas ao alongamento acoplado de grupos CO e CC e vibrações de flexão em grupos COH presentes nos polissacáridos (Cheung *et al.* 2012; Karmali *et al.* 2004a; Synytsya *et al.* 2009). Foram observadas também bandas entre 1150–1160 cm^{-1} associadas ao alongamento de COC nas ligações glicosídicas. A banda próxima de 894 cm^{-1} obtida é específica de ligações β -glicosídicas e indica a presença de β -glucanos. Observa-se ainda a existência de outras bandas características de β -glucanos, próximas de 1376, 1317, 1162, 1100, 1080, 1040 e 990 cm^{-1} (Synytsya *et al.* 2009) e de α -(1,3)-glucanos próximas de 1367, 930, 853, 822, 548 e 454 cm^{-1} (Li *et al.* 2008; Synytsya *et al.* 2009). As bandas obtidas em 1650 e 1540 cm^{-1} são características de vibrações dos grupos amida I e amida II das componentes proteicas presentes nos complexos PPS (Gonzaga *et al.* 2005; Karmali *et al.* 2004b; Synytsya *et al.* 2009; Yuen *et al.* 2009). Relativamente à análise Raman (Figura 5.10), foram

obtidas, nos espectros das diferentes amostras de extratos PPS, bandas na região entre 900–1200 cm^{-1} sendo características da presença de glúcidos e correspondem ao alongamento acoplado das ligações dos grupos CO e CC e vibrações de flexão dos grupos COH presentes nos compostos polissacáridos. Foram detetadas também bandas próximas de 1400–1450, 1330–1350, 1220–1250, 1100–1120, e 1000–1040 cm^{-1} indicando a presença de polissacáridos. As bandas de Raman encontradas a 850–890 cm^{-1} são sensíveis a estruturas anoméricas em torno das ligações glicosídicas dos polissacáridos. Foram observadas bandas próximas de 450 cm^{-1} indicativas da presença de β -(1,3)-glucanos e bandas encontradas perto de 950 e 550 cm^{-1} podem ser devidas à presença de α -(1,3)-glucanos. Por último foram ainda detetadas bandas próximo de 1650 cm^{-1} , sendo indicativo da presença de proteínas nas amostras de extratos PPS (Cheung *et al.* 2012; Na *et al.* 2010; Synytsya *et al.* 2009; Yang & Zhang 2009; Yuen *et al.* 2009). Muitos destes glicopolissacáridos produzidos em fungos contêm ligações glicosídicas α -(1,4) e β -(1,3) nas partes polissacarídicas e D-glicose, ramnose e arabinose são os principais monossacáridos presentes, encontrando-se também presentes outro como galactose, manose, fucose e xilose (Cui & Chisti 2003; Synytsya *et al.* 2009).

As técnicas espectroscópicas utilizadas neste trabalho são relativamente simples e de rápida execução, sem a necessidade de recorrer ao uso de químicos tóxicos e requerem apenas pequenas quantidades de amostra (Yuen *et al.* 2009). A maior vantagem do uso combinado destas duas técnicas é o aumento significativo de exatidão das análises (Pereira *et al.* 2009). Estas técnicas espectroscópicas têm sido usadas como ferramentas quantitativas em alguns compostos nativos (Yuen *et al.* 2009) e podem também ser utilizadas no desenvolvimento e implementação de estratégias para o seu uso na monitorização da produção de vários tipos de compostos biológicos com potencial industrial (Pereira *et al.* 2009). Estas abordagens de microscopia e microanálise podem ser usadas para efetuar um monitoramento de forma rápida e *in situ*, na produção de compostos PPS sem uma extração prévia e laboriosa das amostras.

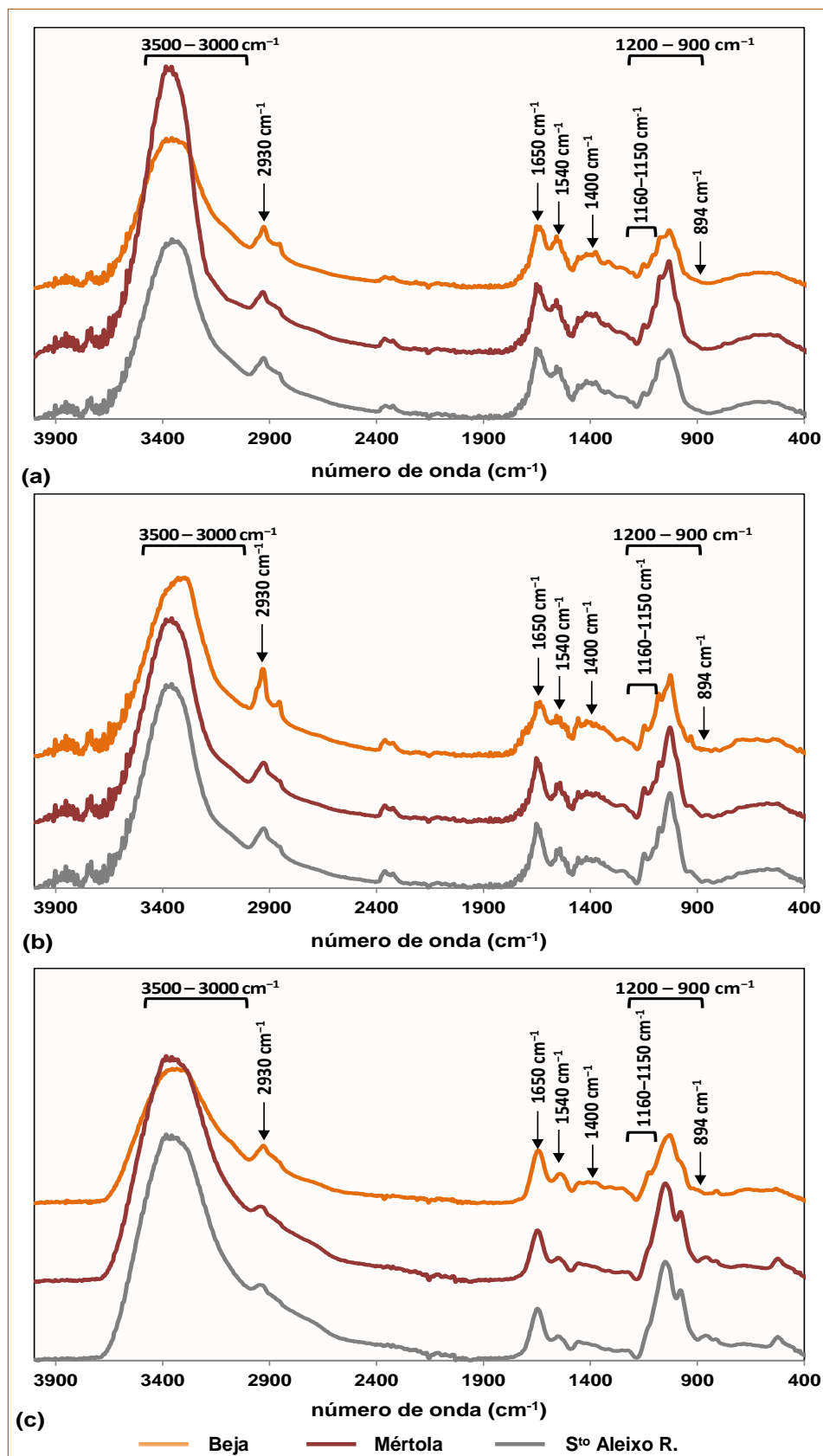


Figura 5.9. Espectros de FITR-ATR referentes aos diferentes extratos de complexos PPS obtidos de corpos de frutificação de *A. ponderosa* (a), micélios (b) e sobrenadantes das culturas (c). Os espectros apresentados são a média de três medições independentes.

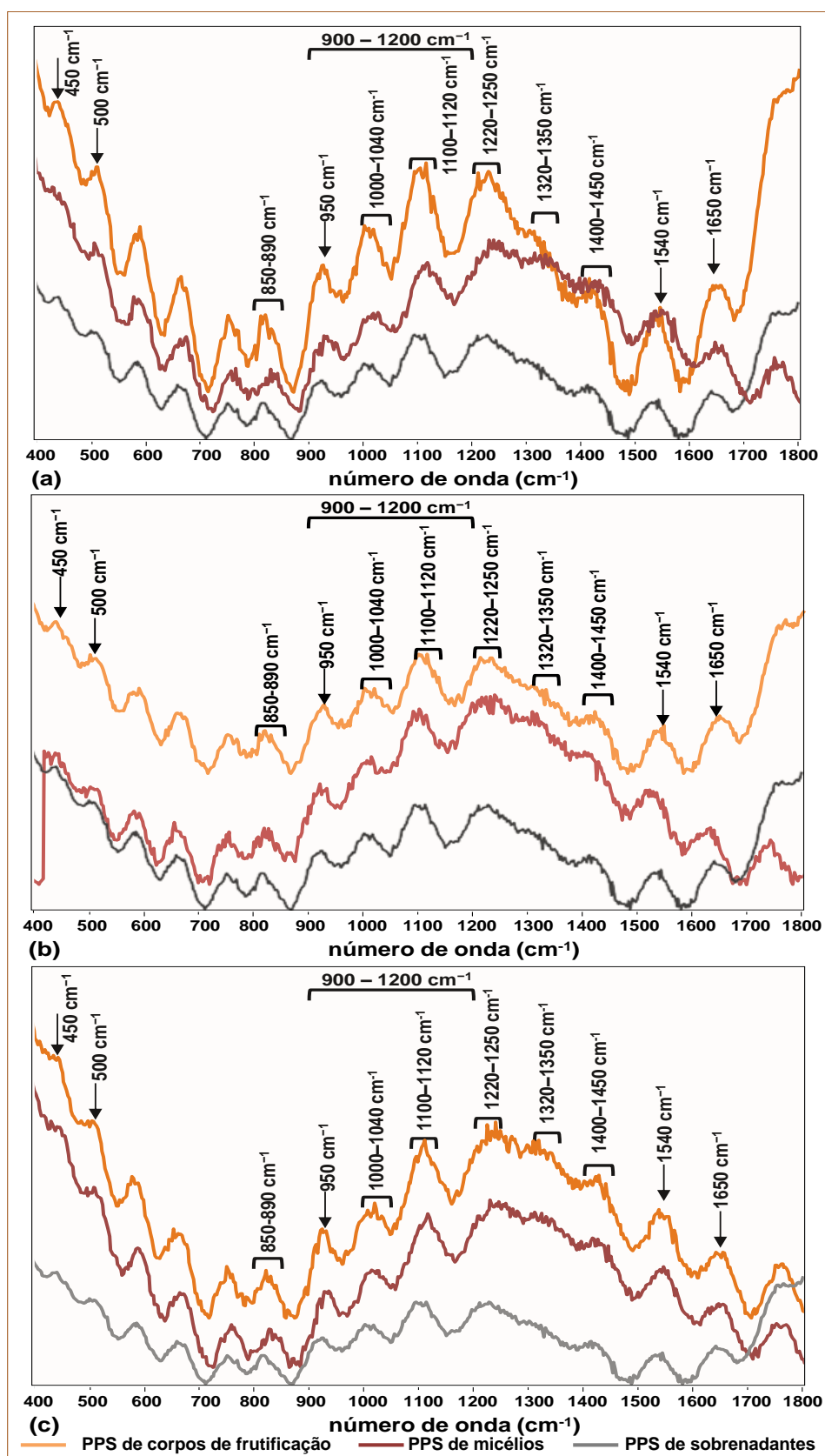


Figura 5.10. Espectros de Raman referentes aos diferentes extratos de complexos PPS obtidos de corpos de frutificação de *A. ponderosa* (a), micélios (b) e sobrenadantes das culturas (c). Os espectros apresentados são a média de três medições independentes.

5.3.3 Separação dos compostos PPS por SEC-UV-RI-HPLC

Os compostos de PPS extraídos dos corpos de frutificação e produzidos nas culturas de *A. ponderosa* foram analisados por cromatografia de exclusão molecular através do sistema de HPLC. As frações proteicas e glucídicas presentes nos extratos de PPS foram avaliadas com monitorização simultânea através de detetores de ultravioleta (UV) e índice de refração (RI). Os cromatogramas obtidos para as amostras de extratos de PPS de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes, para as três estirpes em estudo estão apresentados nas Figuras 5.11, 5.12 e 5.13, respetivamente. Os valores de massa molecular (MM) dos complexos PPS maioritários presentes nas diferentes amostras estão resumidos na Tabela 5.2, tendo sido obtidos por análise comparativa com soluções padrão de polietilenoglicol (PEG) de diferentes massas moleculares, com os quais se procedeu à construção de uma curva de calibração (Anexo G, Figuras G.1 e G.2).

Os extratos obtidos nos corpos de frutificação apresentaram três complexos PPS maioritários, um com MM próximas para os três extratos entre 6,091 e 6,606 kDa, um complexo com MM acima de 20 kDa e um complexo com MM inferiores a 1,5 kDa. Os extratos obtidos de micélios e sobrenadantes das culturas apresentaram quatro complexos PPS maioritários com perfis cromatográficos semelhantes e massas moleculares próximas. No entanto massa molecular equivalente não implica estrutura e conformação molecular semelhantes. Os complexos PPS possíveis de quantificar apresentaram valores de MM entre 10,454 a 11,985 kDa e 1,818 a 1,969 kDa. Os restantes complexos obtidos para estes extratos apresentaram massas moleculares superiores a 20 kDa ou inferiores a 1,5 kDa.

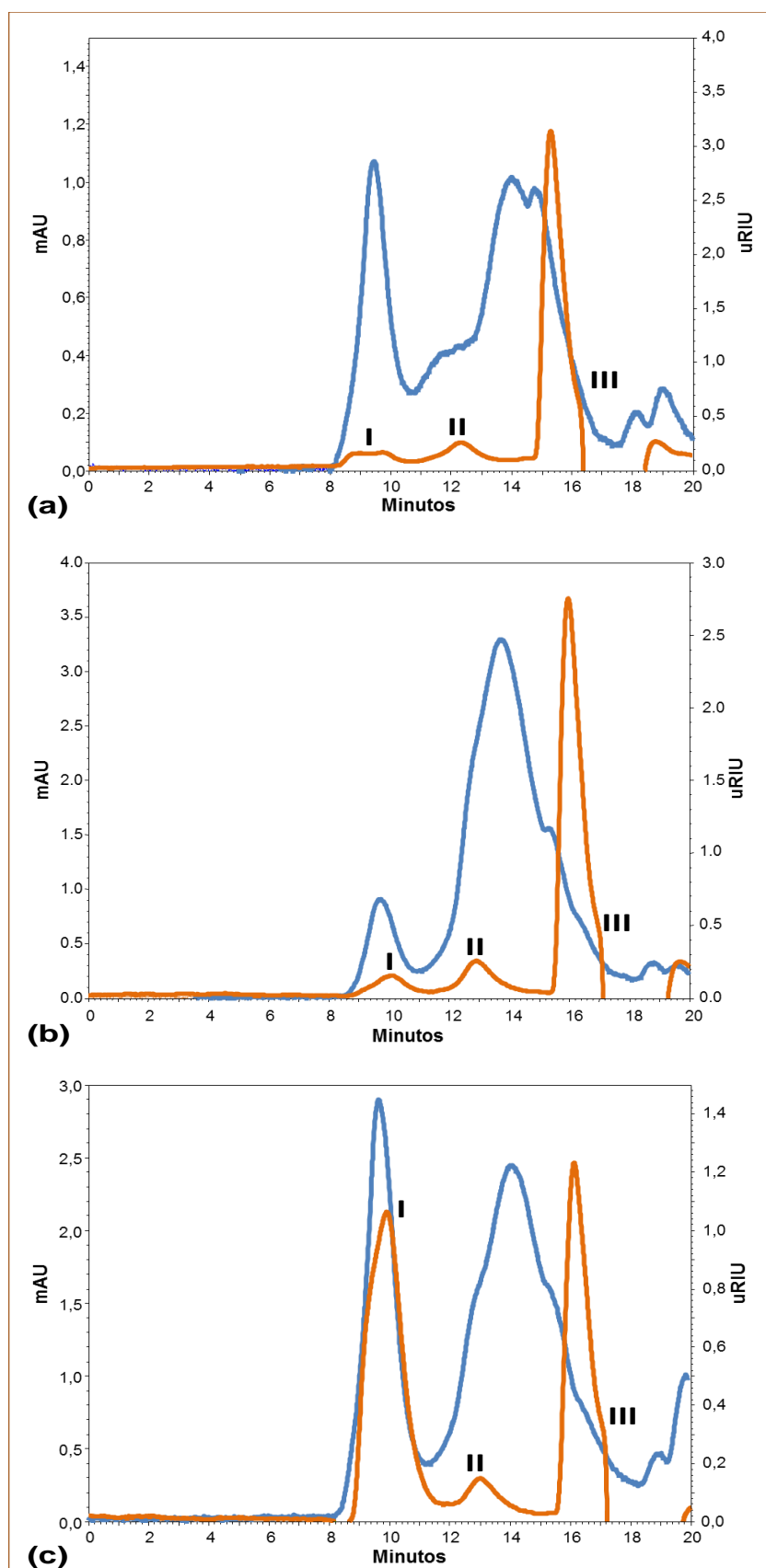


Figura 5.11. Perfil cromatográfico obtido por HPLC, com sinal de RI (laranja) e sinal de UV (azul) registados em função do tempo de retenção para os extratos PPS obtidos dos corpos de frutificação de *A. ponderosa* das estirpes de Beja: (a), Mértola (b) e S¹⁰ Aleixo R. (c).

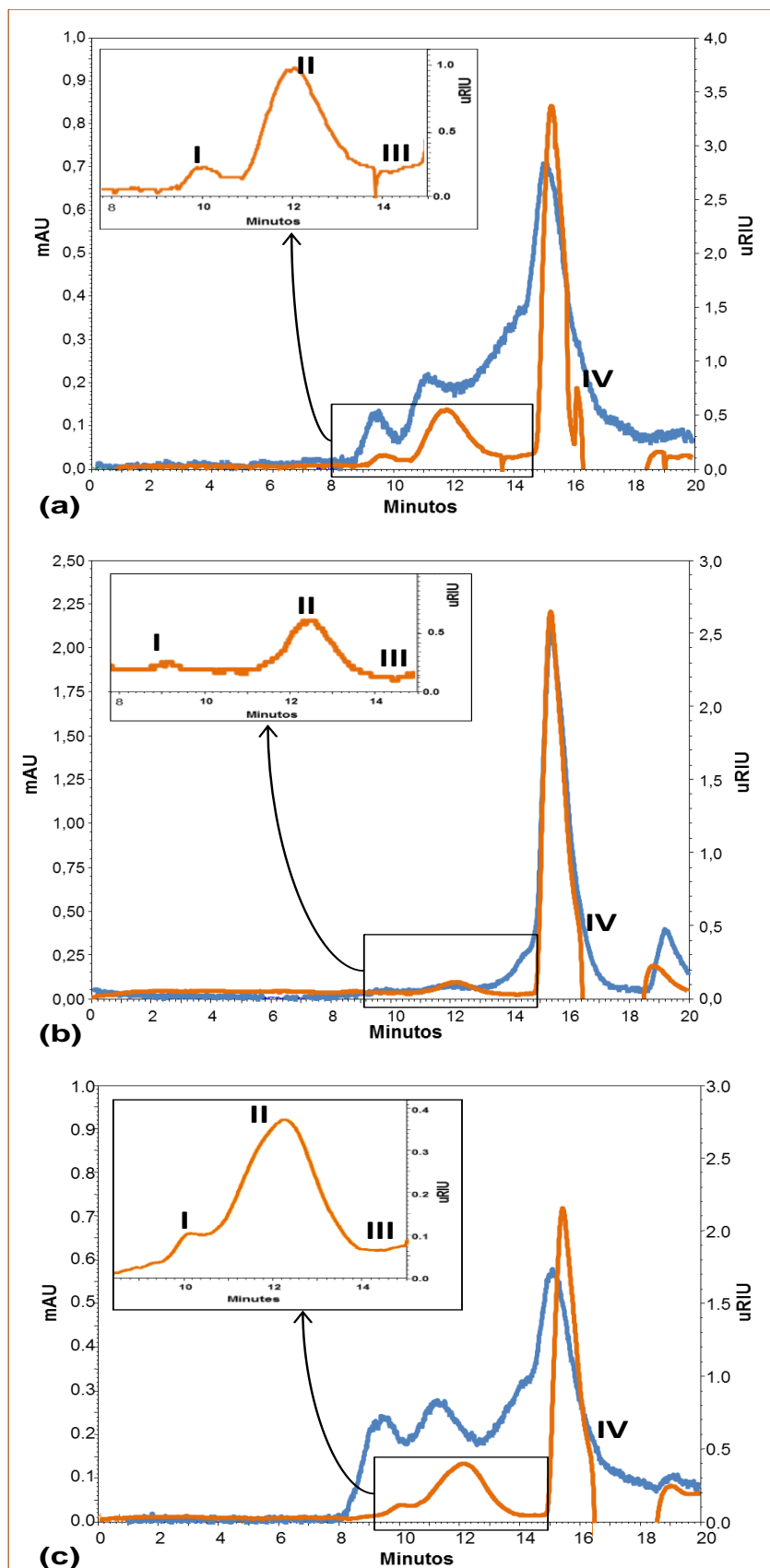


Figura 5.12. Perfil cromatográfico obtido por HPLC, com sinal de RI (laranja) e sinal de UV (azul) registados em função do tempo de retenção para os extratos PPS obtidos dos micélios das culturas de *A. ponderosa* das estirpes de Beja: (a), Mértola (b) e S¹⁰ Aleixo R. (c).

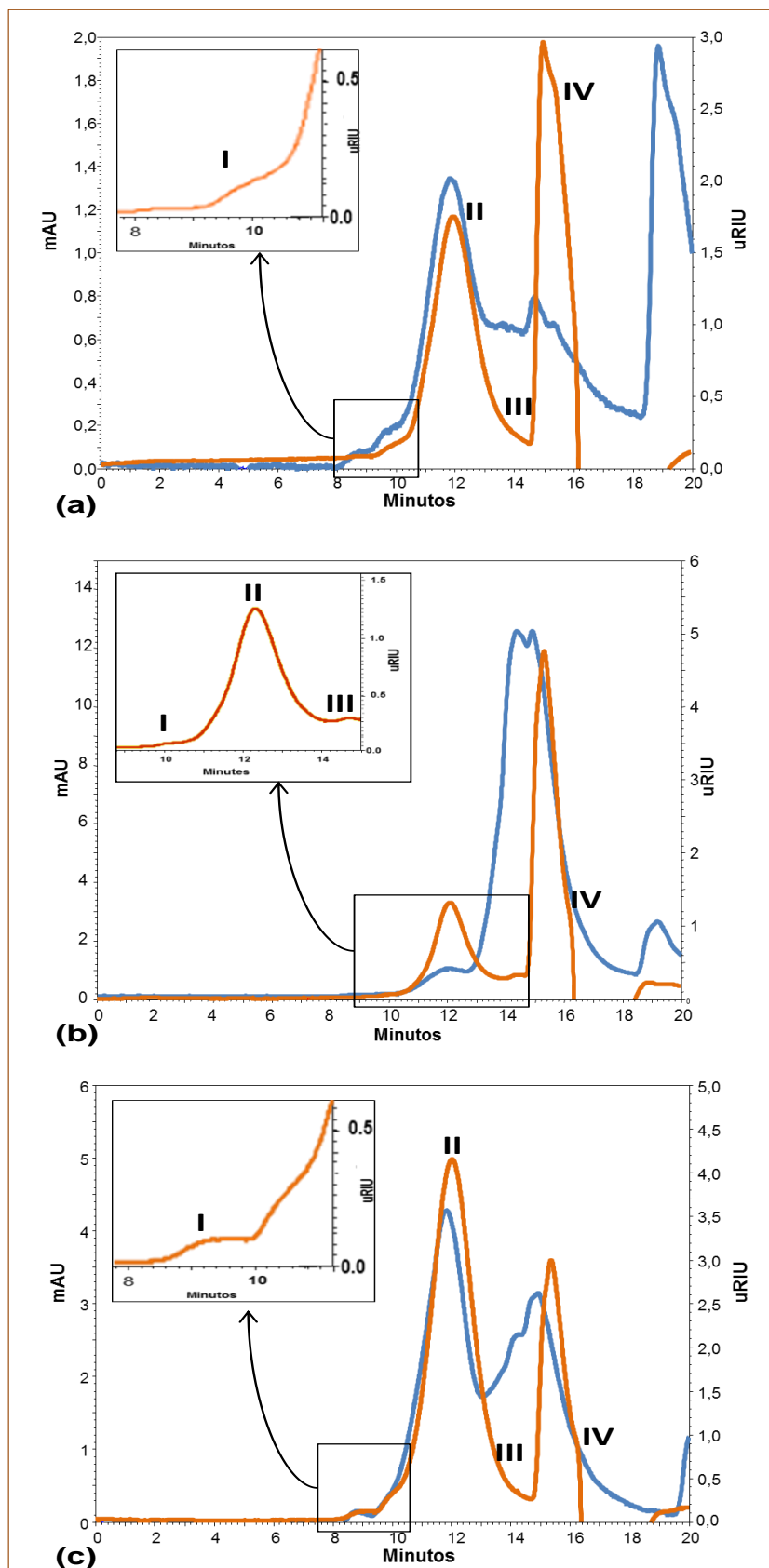


Figura 5.13. Perfil cromatográfico obtido por HPLC, com sinal de RI (laranja) e sinal de UV (azul) registados em função do tempo de retenção para os extratos PPS obtidos dos sobrenadantes das culturas de *A. ponderosa* das estirpes de Beja: (a), Mértola (b) e S^{to} Aleixo R. (c).

Tabela 5.2. Massas moleculares médias dos compostos PPS presentes nos extratos de *A. ponderosa* obtidas por cromatografia de exclusão molecular em sistema de HPLC.

| Extratos PPS | Estirpe | Pico | | | |
|------------------------|---------------------------|-----------------------|--------|-------|------|
| | | Massa molecular (kDa) | | | |
| | | I | II | III | IV |
| Corpos de frutificação | Beja | >20 | 6,606 | <1,5 | -- |
| | Mértola | >20 | 6,091 | <1,5 | -- |
| | S ^{to} Aleixo R. | >20 | 6,423 | <1,5 | -- |
| Micélios | Beja | >20 | 10,454 | 1,958 | <1,5 |
| | Mértola | >20 | 11,252 | 1,952 | <1,5 |
| | S ^{to} Aleixo | >20 | 11,189 | 1,947 | <1,5 |
| Sobrenadantes | Beja | >20 | 11,666 | 1,818 | <1,5 |
| | Mértola | >20 | 11,414 | 1,969 | <1,5 |
| | S ^{to} Aleixo R. | >20 | 11,985 | 1,846 | <1,5 |

Os valores de massa molecular obtidos são resultantes da média de três medições independentes.

Os resultados de MM dos complexos PPS obtidos de extratos de micélios e sobrenadantes das culturas de *A. ponderosa* estão de acordo com os valores de MM de complexos PPS isolados de culturas de outros fungos *Basidiomycetes* como *Coriolus (Trametes) versicolor* (Arteiro *et al.* 2012; Cui *et al.* 2007; Wang *et al.* 1996) e *Pleurotus ostreatus* (Salvador *et al.* 2012). Dois complexos extracelulares e um intracelular, isolados de *T. versicolor*, apresentaram MM de 3,5, 15 kDa e 28 kDa, respetivamente (Wang *et al.* 1996) e, noutro estudo com *T. versicolor*, isolaram-se três frações de PPS extracelulares com MM de 2300, 26 e 3 kDa e três frações de PPS intracelulares de 2300, 150 e 12 kDa (Cui *et al.* 2007). Num estudo mais recente com culturas de *T. versicolor* com diferentes fontes de carbono foi possível isolar entre três a quatro complexos PPS intra e extracelulares com MM entre 26 kDa e inferiores a 1 kDa (Arteiro *et al.* 2012). Outro estudo que relata a extração de complexos PPS de *P. ostreatus* foram isolados três complexos PPS intracelulares e quatro extracelulares com MM a variar entre > 20 kDa e 6,37 kDa (Salvador *et al.* 2012). Ainda em outro estudo com extratos de exopolímeros de *Cordyceps sphecocephala*, após fracionamento por exclusão molecular, obtiveram-se três complexos PPS, com MM de 1831, 27 e 2,2 kDa (Oh *et al.* 2007).

5.3.4 Análise do potencial antiproliferativo dos complexos PPS produzidos em culturas de *A. ponderosa*

O potencial antiproliferativo dos complexos PPS extraídos em micélios e sobrenadantes das culturas de *A. ponderosa* foi avaliado em culturas de células utilizando a linha celular de carcinoma mamário humano MDA-MB-231. O perfil de crescimento das células MDA-MB-231, na presença de diferentes concentrações (0,01-500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de extratos de complexos PPS obtidos de micélios (Figura 5.14 (a)) e sobrenadantes (Figura 5.14 (b)) das culturas evidencia que estes extratos exibem um importante potencial antiproliferativo.

Na Tabela 5.3 estão apresentados os valores de IC_{50} (concentração inibitória de 50% da proliferação celular), determinados através dos valores obtidos para as diferentes concentrações de extratos de complexos PPS (Anexo E, Figura E.2).

Os extratos de complexos PPS de micélios das culturas foram menos eficientes na redução da capacidade de crescimento da linha tumoral, apresentando valores de IC_{50} superiores aos obtidos para os extratos de complexos PPS de sobrenadantes. Os extratos obtidos dos micélios e sobrenadantes das culturas da estirpe de *A. ponderosa* proveniente de Mértola mostraram ser os mais eficientes na redução da proliferação celular, de acordo com os valores inferiores obtidos de IC_{50} de $188,694 \pm 1,061$ e $37,772 \pm 1,068 \mu\text{g mL}^{-1}$, respetivamente. Os resultados estão de acordo com os apresentados para extratos de micélios e sobrenadantes liofilizados das mesmas culturas, discutidos no capítulo 3 ponto 3.3.1, onde também a estirpe de Mértola foi a que mostrou a maior capacidade de redução da proliferação celular. Os extratos de complexos PPS obtidos em micélios das culturas das estirpes de Beja e S^{to} Aleixo R. foram menos eficientes na inibição da proliferação da linha celular do que os extratos de Mértola, não apresentando diferenças significativas nos valores de IC_{50} ($p > 0,05$) (Anexo J.II, Tabelas J.II.15 e J.II.16).

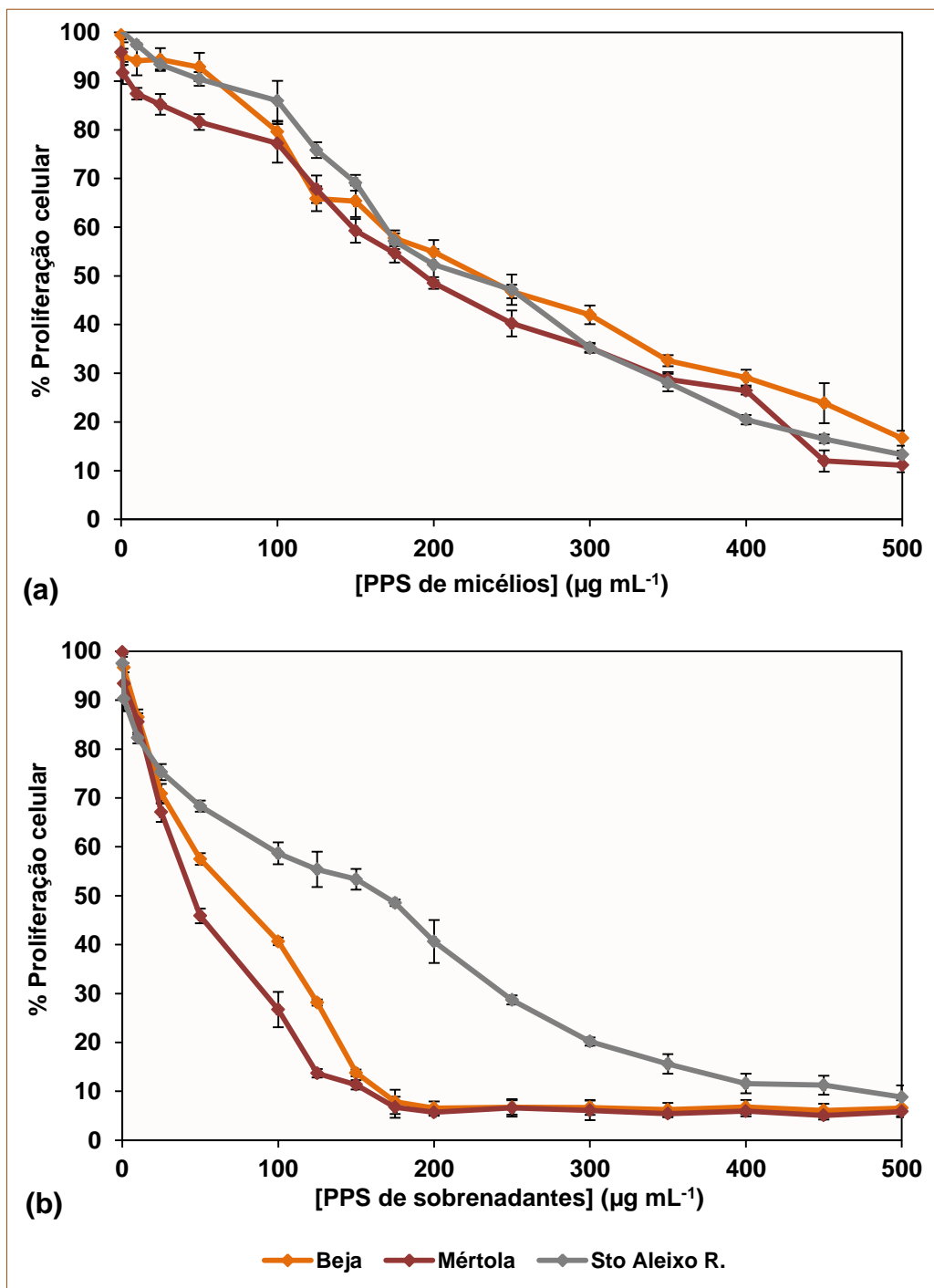


Figura 5.14. Curvas de crescimento da linha celular de cancro mamário humano (MDA-MB-231) incubadas a diferentes concentrações de extratos de PPS obtido de micélios (a) e de sobrenadantes (b) de culturas de *A. ponderosa* das estirpes isoladas de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R.. A proliferação celular foi avaliada em microplaca pela medição da redução do MTT a cristais de formazão ($\lambda = 570 \text{ nm}$). Cada determinação representa três ensaios independentes ($n = 3$) efetuados em triplicado e os resultados foram expressos como percentagem de proliferação celular como média \pm DP.

Para os extratos obtidos dos sobrenadantes das culturas observam-se resultados bastante promissores para a estirpe de Mértola com valor de IC_{50} de $37,772 \pm 1,068 \mu\text{g mL}^{-1}$ seguidamente dos extratos de sobrenadante da estirpe de Beja, com valor de IC_{50} de $59,987 \pm 1,113 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($p < 0,05$). O extrato complexos PPS de sobrenadante da estirpe de S^{to} Aleixo R. evidenciou um potencial antiproliferativo inferior, com um valor de IC_{50} mais elevado de $170,000 \pm 1,085 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($p < 0,05$).

De forma similar ao que foi observado para as amostras de extratos liofilizados de micélio e sobrenadantes, os extratos de complexos PPS extraídos dos micélios e sobrenadantes das culturas da estirpe recolhida em Mértola são as que apresentam efeito antiproliferativo superior nesta linha celular tumoral humana, seguido das culturas da estirpe recolhida em Beja e por último as culturas da estirpe de S^{to} Aleixo R..

Tabela 5.3. Valores de IC_{50} de proliferação de células humanas MDA-MB-231 obtidos para as amostras de PPS de micélios e sobrenadantes de *A. ponderosa*, quando incubadas com diferentes concentrações de extratos por 48 h.

| | Estirpes | IC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) |
|----------------------|---------------------------|-------------------------------------|
| PPS de micélios | Beja | $232,035 \pm 1,038$ ^a |
| | Mértola | $188,694 \pm 1,061$ ^b |
| | S ^{to} Aleixo R. | $222,813 \pm 1,029$ ^a |
| PPS de sobrenadantes | Beja | $59,987 \pm 1,113$ ^c |
| | Mértola | $37,772 \pm 1,068$ ^d |
| | S ^{to} Aleixo R. | $170,000 \pm 1,085$ ^e |

Cada determinação representa três ensaios independentes ($n = 3$) efetuados em triplicado ($IC_{50} \pm DP$). Letras diferentes correspondem a amostras que diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

Algumas espécies de cogumelos comestíveis têm sido alvo de estudos acerca dos efeitos antitumorais de extratos polissacáridos, em alguns tipos de linhas tumorais humanas. Estudos efetuados com extratos de polissacáridos de *Coriolus versicolor* mostraram capacidade destes compostos em inibir a progressão de células tumorais pulmonares (Tsang *et al.* 2003), a síntese de DNA em células tumorais mamárias (MCF-7) e a proliferação de células tumorais hepáticas (HEPG2) (Cui & Chisti 2003).

Extratos de polissacáridos de outra espécie de cogumelos, *Pleurotus ostreatus*, mostraram que alguns dos compostos produzidos revelaram capacidade de estimular a proliferação celular de esplenócitos e tímócitos (Cui *et al.* 2007; Maity *et al.* 2011) e exibiram efeito citotóxico contra células cancerígenas leucémicas (HL-60) (Venkatakrisnan *et al.* 2010).

A linha celular de cancro da mama utilizada neste estudo, MDA-MB-231, tem sido utilizada em diversos estudos de análise do efeito antiproliferativo presente em extratos de polissacáridos obtidos de algumas espécies de cogumelos silvestres como *Ganoderma lucidum* (Zhao *et al.* 2010).

Estes estudos demonstraram que o potencial antitumoral observada em extratos de compostos polisacáridicos produzidos por cogumelos comestíveis, não é apenas causada pelo efeito citotóxico direto. Estes compostos apresentam atividade imunomoduladora, potenciando o sistema imunitário em múltiplas vias, incluindo o facto de promoverem o efeito proliferativo e resposta pinocítica em macrófagos (Cui & Chisti 2003; Zhao *et al.* 2010).

5.3.5 Reconhecimento de complexos PPS de extratos de corpos de frutificação e culturas por anticorpos específicos

As amostras de extratos de complexos PPS extraídos de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das culturas de *A. ponderosa* das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R. foram utilizadas no ensaio *screening* de análise do reconhecimento destes compostos por diferentes anticorpos específicos produzidos por tecnologia de hibridomas. Foram testados os anticorpos 2.58, 3H8-3H7, 1E6-1E8 e 1E6-1E8-B3 utilizando como anticorpo conjugado IgG e IgM, sendo avaliado o nível de reconhecimento dos complexos PPS (Anexo H, Tabela H.1).

Os resultados obtidos mostraram um reconhecimento moderado, com valores de atividade de anticorpos entre 4,730 e 16,950 U anticorpo mL⁻¹, para as amostras de extratos de complexos PPS extraídos de corpos de frutificação das diferentes estirpes no caso dos anticorpos 2.58, 3H8-3H7 e 1E6-1E8-B3, com reconhecimento dirigido a IgM. As amostras de Extratos de complexos PPS produzidos em micélios das culturas da estirpe de S^{to} Aleixo R. apresentaram um reconhecimento moderado para o anticorpo 3H8-3H7, dirigido para IgM, com valor de atividade de anticorpo de 12,510 U anticorpo mL⁻¹, e um reconhecimento bastante elevado para os anticorpos 2.58 e 1E6-1E8-B3, dirigido para IgM, apresentando valores de atividade de anticorpo de 20,830 e 23,800 U anticorpo mL⁻¹, respetivamente. Com base nos resultados obtidos selecionou-se o anticorpo 1E6-1E8-B3 para reconhecimentos dos complexos PPS produzidos.

5.3.6 Análise do perfil de produção de complexos PPS em culturas de *A. ponderosa*

Foram efetuadas culturas de *A. ponderosa* isoladas a partir da estirpe de S¹⁰ Aleixo R. que permitiram uma análise mais detalhada dos perfis de produção de biomassa e complexos PPS (Figura 5.15). O perfil de produção de biomassa mostra um crescimento exponencial a partir do segundo dia até ao sexto dia de cultura, com uma taxa específica de crescimento de $0,542 \text{ dia}^{-1}$ (Anexo I, Figura I.1 (a)) e uma taxa volumétrica de crescimento de $1,482 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (Anexo I, Figura I.1 (b)). Do sexto ao décimo primeiro dia, observou-se uma desaceleração de crescimento devido à ação de reagentes limitantes na cultura, como a glucose e oxigénio, e a partir daí, a cultura entra em fase estacionária. Obteve-se um valor de biomassa máximo de $931 \pm 1,414 \text{ mg /100 mL}$, sendo mais elevado do que o obtido em outros estudo de culturas de *T. versicolor* (Arteiro *et al.* 2012) e *P. ostreatus* (Gern *et al.* 2008; Salvador *et al.* 2012).

A produção de complexos PPS intracelulares extraídos de micélios de culturas está representada na Figura 5.15. A taxa de específica de produção de complexos PPS intracelulares observada entre o segundo e décimo dia foi de $10,616 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1} \text{ ms dia}^{-1}$, com um rendimento de produção para 29,252 g de PPS por grama de biomassa. Entre o décimo primeiro e décimo quarto dia obteve-se uma taxa específica de produção de complexos PPS mais elevada, $183,072 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1} \text{ ms dia}^{-1}$, e um maior rendimento de produção com um valor de 77,429 de PPS por grama de biomassa (Anexo I, Figura I.1 (b)).

O perfil de produção de complexos PPS foi acompanhado pela variação da concentração de proteína presente nos complexos, demonstrando a presença de complexos proteína-polissacárido intracelulares. Os complexos PPS produzidos apresentaram uma maior concentração no décimo quarto dia ($999,006 \pm 29,437 \text{ } \mu\text{g polissacáridos mg}^{-1} \text{ extrato PPS}$) apresentando um conteúdo em proteína de $17,764 \pm 0,087 \text{ } \mu\text{g proteína mg}^{-1} \text{ extrato PPS}$.

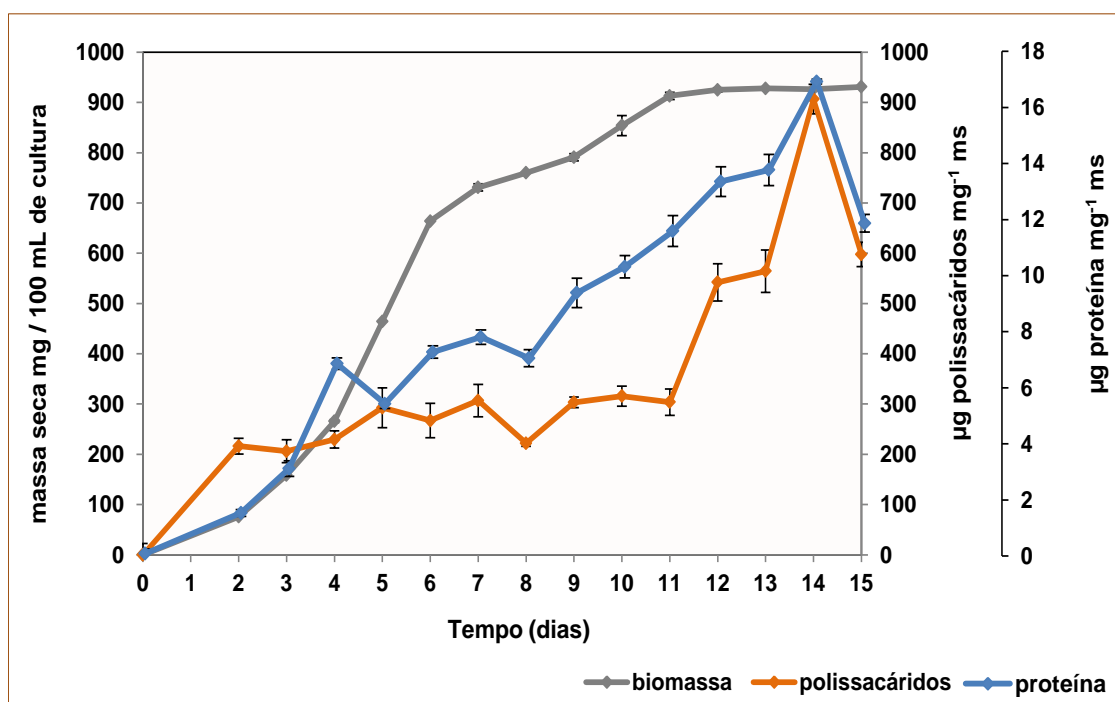


Figura 5.15. Perfil de produção de biomassa e cinética de produção de complexos proteína-polissacárido nas culturas de *A. ponderosa* da estirpe de S¹⁰ Aleixo R. Os valores apresentados são a média \pm desvio-padrão de três réplicas.

Os resultados mostraram que a produção dos complexos proteína-polissacáridos não está totalmente associada com o crescimento do microrganismo, ocorrendo uma maior produção destes compostos durante o período de desaceleração celular.

Estudos semelhantes também foram efetuados com outros *Basidiomycetes*, nomeadamente *T. versicolor*, *P. ostreatus* e *Antrodia cinnamomea*, apresentando valores de produção de complexos PPS inferiores aos obtidos neste estudo para culturas de *A. ponderosa* (Arteiro *et al.* 2012; Lin & Sung 2006; Salvador *et al.* 2012).

5.3.7 Purificação dos extratos de complexos PPS por cromatografia de exclusão molecular (SEC) e troca iónica (IEC)

O fracionamento do extrato de complexos PPS obtido do micélio das culturas de *A. ponderosa* da estirpe de S^{to} Aleixo R., extraído décimo quarto dia de produção (máximo de produção), foi efetuado por cromatografia de exclusão molecular (SEC), utilizando *Sephacryl S-300* (GE Healthcare) como fase estacionária, e cromatografia de troca iónica (IEC), utilizando como fase estacionária a resina DEAE *Sepharose fast flow* (GE Healthcare).

A Figura 5.16 mostra o perfil cromatográfico e conteúdo proteico e polisacárido obtido por SEC. Os resultados obtidos para a separação de compostos polissacáridos neste extrato revelaram a possível presença de sete complexos proteína-polissacárido intracelulares maioritários (Tabela 5.4). Foi possível determinar a massa molecular de quatro complexos obtidos, com 329,989, 131,220, 52,180 e 15,258 kDa, de acordo com a análise efetuada com os padrões proteicos (Anexo G, Figura G.3 e G.4). Observa-se também a possível presença de um compostos PPS com massas moleculares ente 480 e 1500 kDa. Apesar de não se conseguir determinar a MM deste complexo por apresentar volume de eluição inferior ao padrão de MM mais elevada utilizado, a urease (480 kDa), sabe-se no entanto que se encontra dentro do intervalo de fracionamento da coluna (10-1500 kDa), uma vez que é eluído após o volume de exclusão determinado pelo azul de dextrano (2000 kDa). Podemos observar ainda a possível presença de dois compostos PPS com massa molecular inferior a 12,3 kDa, não sendo possível determinar a sua MM exata uma vez que apresentam volume de eluição superior ao padrão de MM inferior utilizado (citocromo C). Após o processo de purificação do extrato de complexos PPS intracelular foi possível obter um rendimento de purificação de 91% em conteúdo polisacárido e de 83% em conteúdo proteico.

Estes resultados de fracionamento apresentam complexos PPS com massas moleculares próximas das encontradas na análise por SEC-UV-RI-HPLC de extratos

totais de complexos PPS obtidos dos micélios das culturas da estirpe de S^{to} Aleixo R (Figura 5.12 (c)), para as frações IV, V, VI e VII sendo no entanto detetados mais três complexos PPS por este fracionamento correspondentes às frações I, II e III.

Alguns estudos que referem a análise de complexos PPS isolados de micélios de culturas de *T. versicolor* mostraram a presença de compostos com massas moleculares entre 1 a 100 kDa (Cui *et al.*, 2007; Tavares *et al.*, 2005).

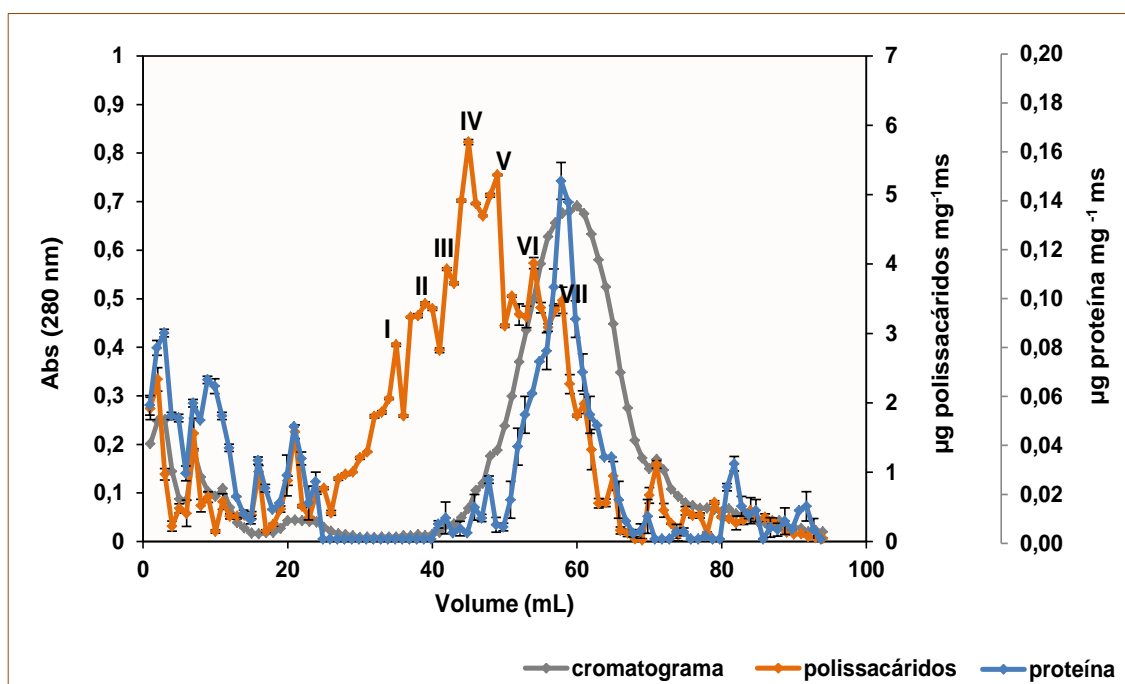


Figura 5.16. Perfil de fracionamento do extrato de PPS dos micélios das culturas de *A. ponderosa* da estirpe de S^{to} Aleixo R. ao 14^o dia de crescimento, obtido por cromatografia de exclusão molecular. Os valores apresentados são a média \pm desvio-padrão de três réplicas.

Tabela 5.4. Massas moleculares dos compostos PPS, presentes nos extratos dos micélios das culturas de *A. ponderosa* da estirpe de S^{to} aleixo R.; obtidas por cromatografia de exclusão molecular.

| Frações | Massa molecular (kDa) |
|---------|-----------------------|
| I | >480 <1500 |
| II | 329,989 |
| III | 131,220 |
| IV | 52,180 |
| V | 15,258 |
| VI | <12,3 |
| VII | <12,3 |

A Figura 5.17 mostra o perfil cromatográfico e o conteúdo em polissacáridos e proteína obtidos por cromatografia de troca iônica (IEC) referente à amostra de extrato de complexos PPS intracelular. A eluição da amostra retida na coluna foi efetuada por um gradiente de KCl entre 0 e 1M. Com este processo de purificação obtiveram-se três frações de compostos PPS com diferentes cargas iônicas negativas assinalados na Figura 5.17. Observa-se que logo após o início da aplicação do gradiente de KCl são eluídos grande parte dos complexos PPS retidos na resina (fração I), com elevada concentração proteica. Esta fração parece corresponder à fração mais pura do complexo PPS de carga negativa que ficou retido na coluna de troca iônica. Posteriormente são eluídos complexos PPS, em duas frações diferentes, com possível carga aniônica mais elevada e sem presença de conteúdo proteico, podendo corresponder a diferentes complexos PPS, ou simplesmente a parte do mesmo complexo que demorou mais a eluir. Após este processo de purificação do extrato de complexos PPS intracelulares foi possível obter um rendimento de purificação de aproximadamente 95% em conteúdo polisacarídico e de 91% em conteúdo proteico.

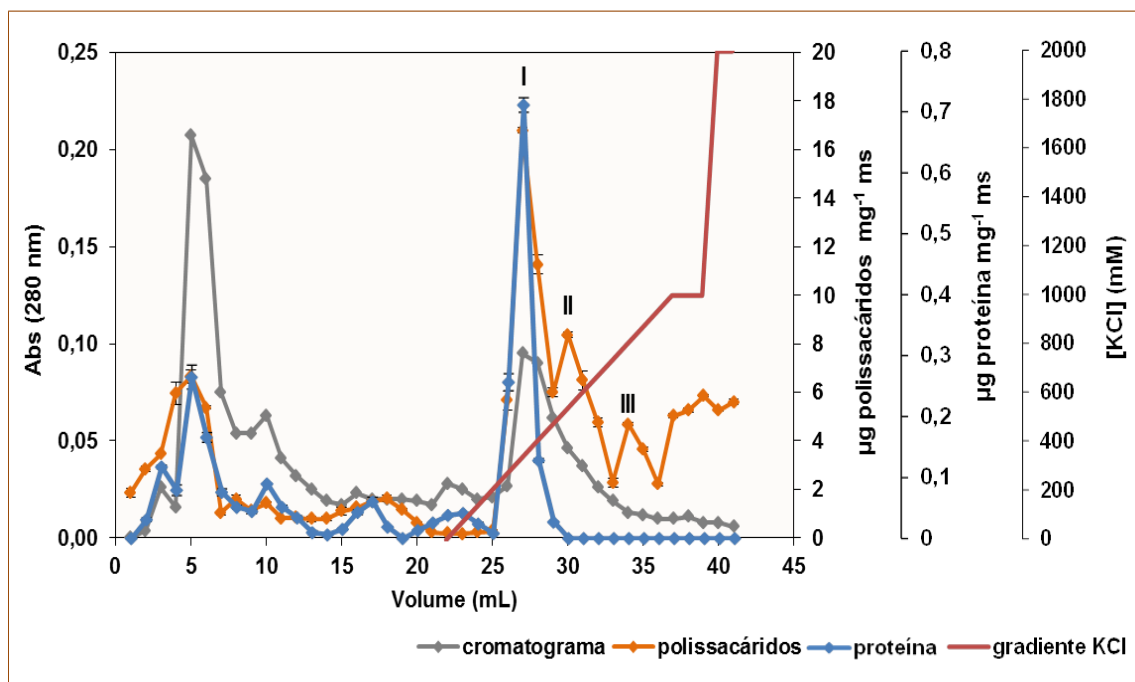


Figura 5.17. Perfil cromatográfico do extrato de PPS dos micélios das culturas de *A. ponderosa* da estirpe de S^{to} Aleixo R. ao 14^o dia de crescimento, obtido por cromatografia de troca iônica em gradiente de KCl. Os valores apresentados são a média \pm desvio-padrão de três réplicas.

As frações purificadas obtidas por SEC e IEC foram analisadas por FTIR-ATR e SEC-UV-RI-HPLC. Relativamente aos resultados de FTIR-ATR (Figura 5.18 (a) e (b)) foram detetadas bandas intensas de IR a perto de 1650 cm^{-1} sendo características de grupos carboxilatos e de vibrações das componentes proteicas presentes nos complexos PPS (Synytsya *et al.* 2009; Yuen *et al.* 2009). Foram detetadas bandas moderadas observadas na região entre $900\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ características de glúcidos, atribuídas ao alongamento das ligações glicosídicas presentes nos polissacáridos (Cheung *et al.* 2012; Synytsya *et al.* 2009). Observa-se ainda a existência de bandas características de β -glucanos, próximas de 1080 , 1040 e 990 cm^{-1} (Synytsya *et al.* 2009). Nos espetros obtidos observam-se ainda, tanto para as frações de SEC como de IEC, bandas bastante intensas na região de $3000\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ características de vibrações de alongamento dos grupos OH dos hidroxilos presentes nos polissacáridos e na água, o que é explicado pelo facto destas frações se encontrarem sem solvente aquoso, potenciando visivelmente a presença destas bandas.

Em relação aos espetros obtidos por SEC-UV-RI-HPLC das frações obtidas e SEC (Figura 5.19 (a)), observa-se que foi possível separar cinco complexos PPS, apresentando MM entre >20 e $<1,5\text{ kDa}$. As frações IV, V, VI e VII apresentam compostos PPS com MM semelhante às encontradas nos espetros de extratos totais de complexos PPS obtidos dos micélios das culturas da estirpe de S^{to} Aleixo R (Figura 5.12 (c)). As frações I, II e III apresentam massa molecular muito semelhante ($> 20\text{ kDa}$), o que pode ser explicado pelo facto do limite de fracionamento desta coluna ser de 100 kDa , e desta forma não é sendo possível comparar com as MM obtidas por SEC. Os espetros obtidos por SEC-UV-RI-HPLC das frações de IEC I, II e III (Figura 5.19 (b)) apresentaram a presença de dois complexos PPS com massas moleculares inferiores a $1,5\text{ kDa}$. Estas frações resultantes de um processo de fracionamento pelas diferentes cargas iónicas foram sujeitas a análise por separação por massas moleculares observando-se que as diferentes frações são compostas pelos mesmos dois complexos PPS.

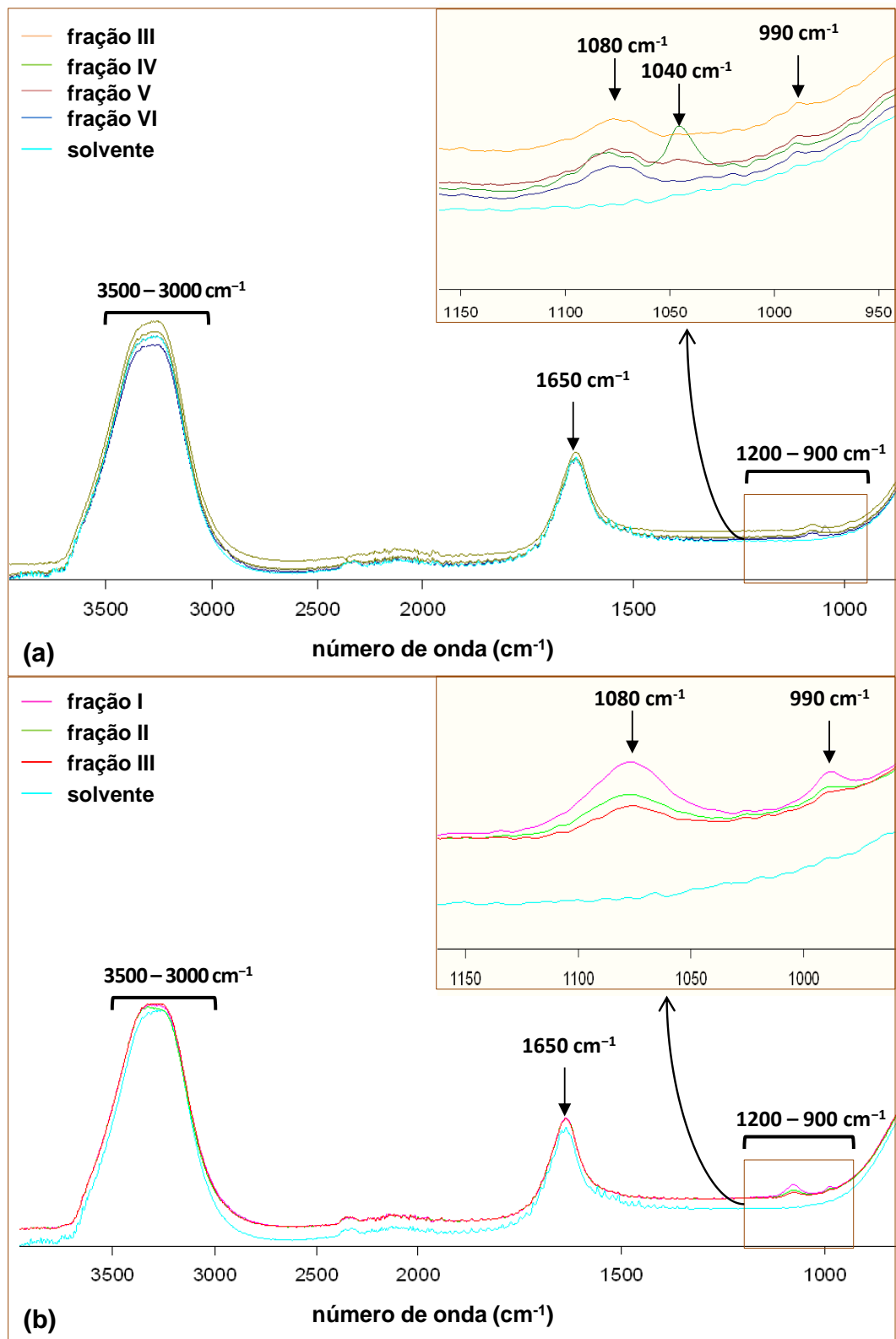


Figura 5.18. Espectros de FITR-ATR referentes às frações obtidas por SEC (a) e IEC (b), dos extratos de complexos PPS intracelulares das culturas de *A. ponderosa* da estirpe de S^{to} Aleixo R.. Os espectros apresentados são a média de três medições independentes.

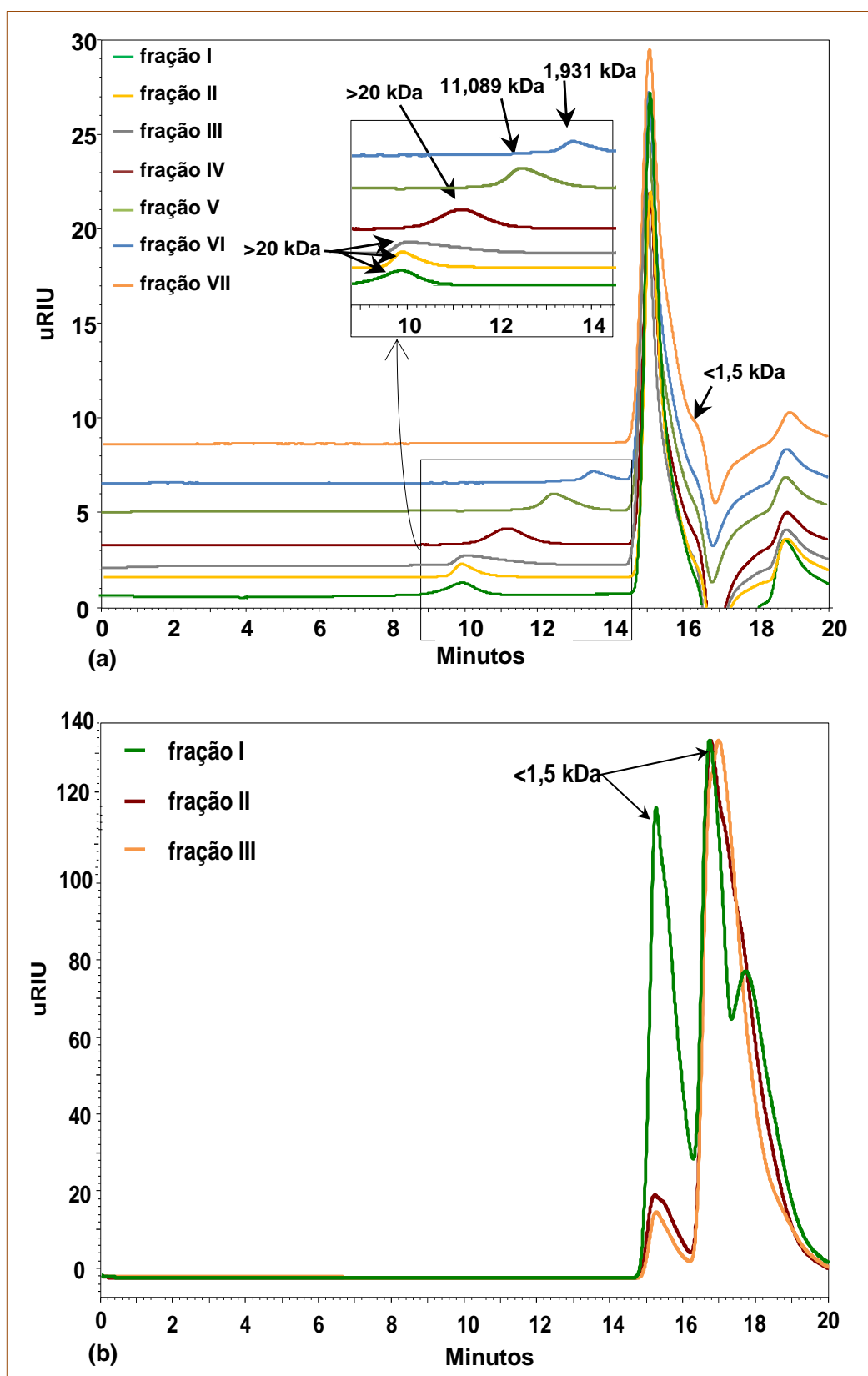


Figura 5.19. Perfil cromatográfico obtido por HPLC, com sinal de RI registados em função do tempo de retenção para as frações obtidas por SEC (a) e IEC (b), dos extratos de complexos PPS intracelulares das culturas de *A. ponderosa* da estirpe de S¹⁰ Aleixo R..

5.3.8 Reconhecimento dos extratos de complexos PPS e frações purificadas por anticorpo específico

Os extratos de complexos PPS das culturas de *A. ponderosa* da estirpe de S^{to} Aleixo R. obtidos ao longo de 15 dias de cultura foram analisados quanto ao reconhecimento pelo anticorpo específico selecionado anteriormente, 1E6-1E8-B3. Os resultados de detecção dos extratos de complexos PPS estão apresentados na Figura 5.20. A atividade do anticorpo no reconhecimento dos complexos PPS foi expressa em μg de polissacárido por mg de massa seca de extrato, de acordo com a curva padrão obtida para estes complexos produzidos (Anexo H, Figura H.1).

Os resultados obtidos mostraram que o anticorpo 1E6-1E8-B3 apresentou atividade de reconhecimento para todos os extratos de complexos PPS obtidos nos diferentes dias de cultura. O perfil de reconhecimento acompanha o perfil de concentração de polissacáridos presente nos diferentes extratos, sendo a concentração de polissacárido detetada pela atividade de anticorpo um pouco mais baixa que a obtida por quantificação.

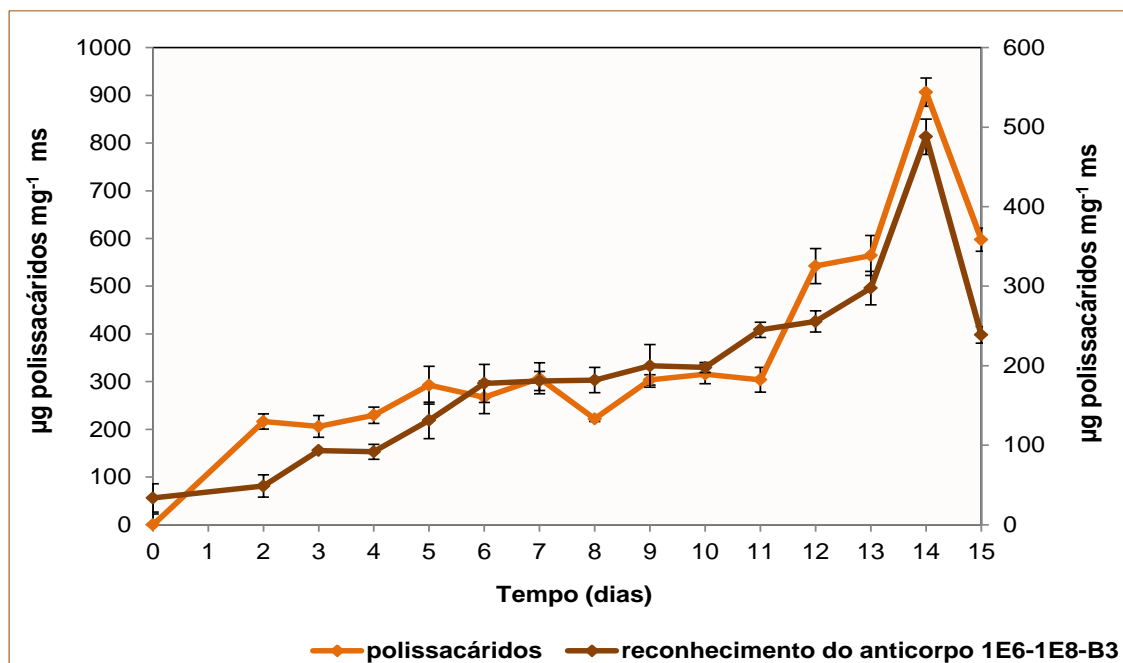


Figura 5.20. Perfil de reconhecimento dos compostos PPS, pelo anticorpo 1E6-1E8-B3, produzidos nas culturas de *A. ponderosa* da estirpe de S^{to} Aleixo R. Os valores apresentados são a média \pm desvio-padrão de três réplicas.

As frações obtidas por cromatografia de exclusão molecular (SEC) e cromatografia de troca iónica (IEC), referentes ao extrato de complexos PPS obtido ao décimo quarto dia de cultura, foram também analisadas quanto ao seu reconhecimento pelo anticorpo 1E6-1E8-B3, estando os resultados apresentados nas Figuras 5.21 e 5.22, respetivamente.

No que respeita às frações purificadas por SEC (Figura 5.21) observa-se um reconhecimento pelo anticorpo 1E6-1E8-B3 dirigido a IgM para todas as frações obtidas. As frações purificadas identificadas por III, IV e V foram as que apresentaram atividade de anticorpo mais elevada, correspondendo a valores de concentração em polissacáridos também mais elevados. No entanto também as frações I, II, VI e VII apresentaram elevado reconhecimento pelo anticorpo.

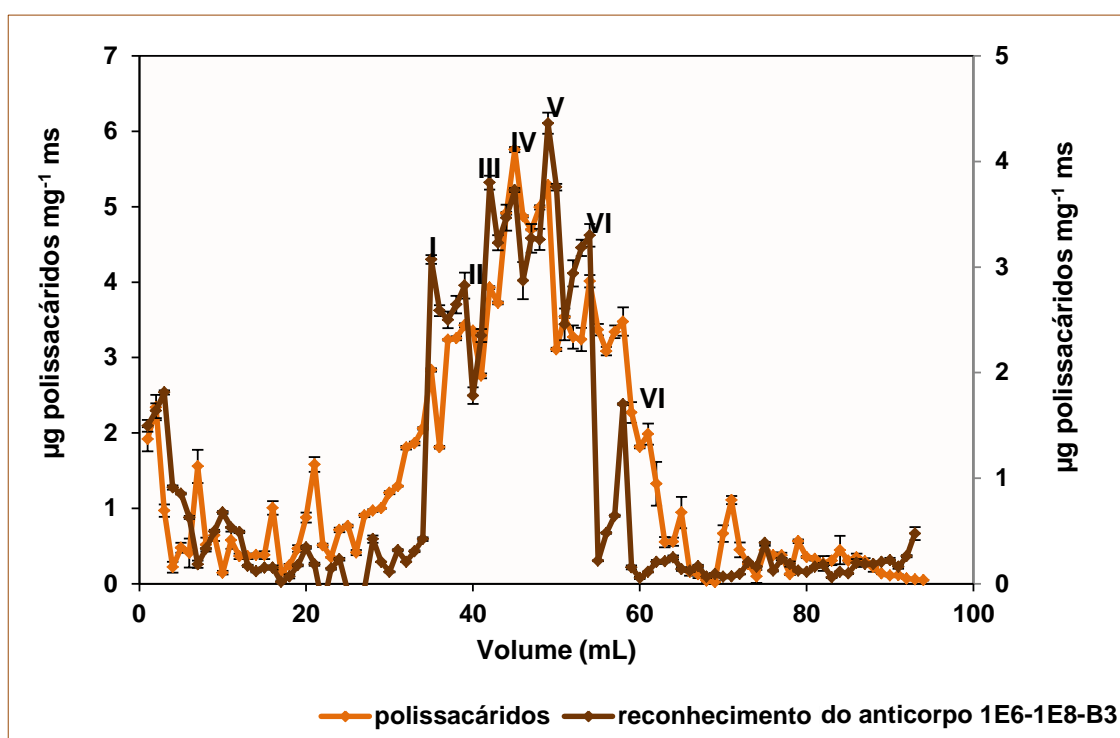


Figura 5.21. Perfil de reconhecimento dos compostos PPS, pelo anticorpo 1E6-1E8-B3, presentes nas frações de SEC. Os valores apresentados são a média \pm desvio-padrão de três réplicas.

Relativamente às frações purificadas por IEC (Figura 5.22), observou-se uma atividade de anticorpo mais elevada para a fração purificada identificada por I enquanto as frações purificadas II e III apresentaram um reconhecimento mais baixo pelo anticorpo. Existe ainda um elevado reconhecimento para as primeiras frações eluídas durante a fase de lavagem da coluna, que contem complexos PPS que não ficaram retidos na resina e desta forma de carga iónica positiva.

Mais uma vez o perfil de concentração obtido pela atividade de anticorpo acompanha o perfil de concentração em polissacáridos quantificadas nas diferentes frações.

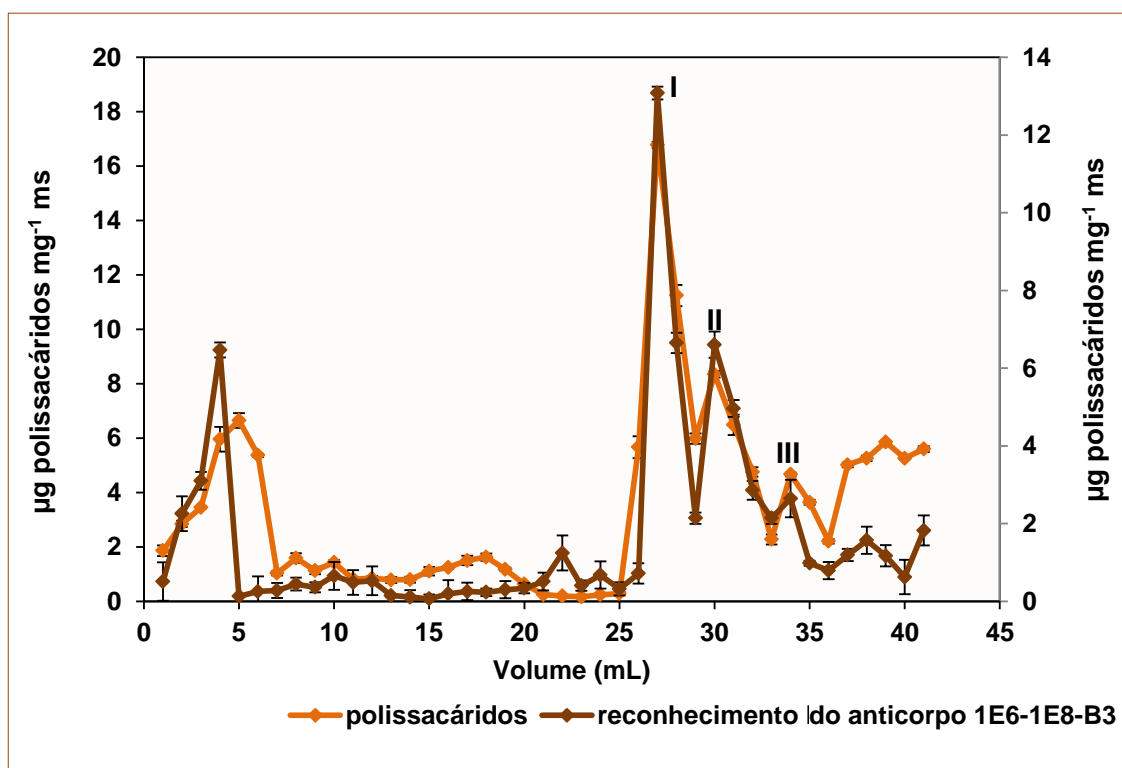


Figura 5.22. Perfil de reconhecimento dos compostos PPS, pelo anticorpo 1E6-1E8-B3, presentes nas frações de IEC. Os valores apresentados são a média ± desvio-padrão de três réplicas.

5.3.9 Análise da competitividade antigénica para os complexos PPS produzidos em culturas de *A. ponderosa*

O anticorpo 1E6-1E8-B3 foi testado quanto ao seu reconhecimento a outros antígenos polisacáridicos comerciais, nomeadamente amido, celulose, pectina, quitosano e xilano e complexos PPS produzidos em culturas líquidas de estirpes fúngicas de cogumelos comestíveis, nomeadamente *Pleurotus ostreatus* e *Coriolus versicolor*. Desta forma foi avaliado por ELISA o reconhecimento da espécie antigénica em estudo, complexos PPS de *A. ponderosa* da estirpe de S^{to} Aleixo R., pelo anticorpo previamente colocado em contato com os restantes antígenos, possíveis competidores. Os resultados de reconhecimento estão apresentados na Figura 5.23, expresso em atividade de anticorpo por unidade de volume de amostra. Pelos resultados obtidos, pode-se concluir o anticorpo 1E6-1E8-B3 não apresentou afinidade para qualquer um dos antígenos competidores testados, uma vez que os valores atividade de anticorpo se mantiveram praticamente constantes, entre 10 a 14 U mL⁻¹, para todas as concentrações de antígenos testadas. Desta forma depreende-se que o anticorpo 1E6-1E8-B3 não reconhece os epítomos ou determinantes antigénicos específicos dos antígenos competidores testados e assim permanece com os seus locais de ligação a antígenos, extremidade variável amino-terminal, livres para reagir com o antígeno inicial (o que revestiu a placa de ELISA), os complexos PPS de *A. ponderosa*.

No ensaio de controlo positivo efetuado, no qual o anticorpo foi incubado com o próprio extrato de complexos PPS de *A. ponderosa*, observa-se uma diminuição de atividade anticorpo com o aumento da concentração de extrato com o qual foi incubado. Este resultado foi de encontro ao esperado, permitindo também a validação do ensaio quanto às concentrações de competidores estudadas, uma vez que permitiu perceber que a gama de concentrações utilizadas seria suficiente para este estudo.

Neste caso o anticorpo reconheceu os epítomos dos complexos PPS de *A. ponderosa* durante a sua incubação com este extrato, ficando com um menor número de extremidades de ligação disponíveis para reagir com o antígeno inicial (o mesmo extrato de complexos PPS que revestiu a placa de ELISA) e desta forma observando-se uma diminuição da atividade de anticorpo pelo aumento da concentração do antígeno em estudo.

Neste ensaio pretendeu-se ainda provar que os antígenos competidores testados não são reconhecidos pelo anticorpo 1E6-1E8-B3 em ELISA direto, ou seja utilizando estes compostos polisacáridicos como antígenos primários. Nestes ensaios, considerados de controlos negativos do ensaio, não se observou atividade de anticorpo para qualquer um dos compostos antigénicos, permitindo mais uma vez concluir a não afinidade do anticorpo para estes antígenos testados.

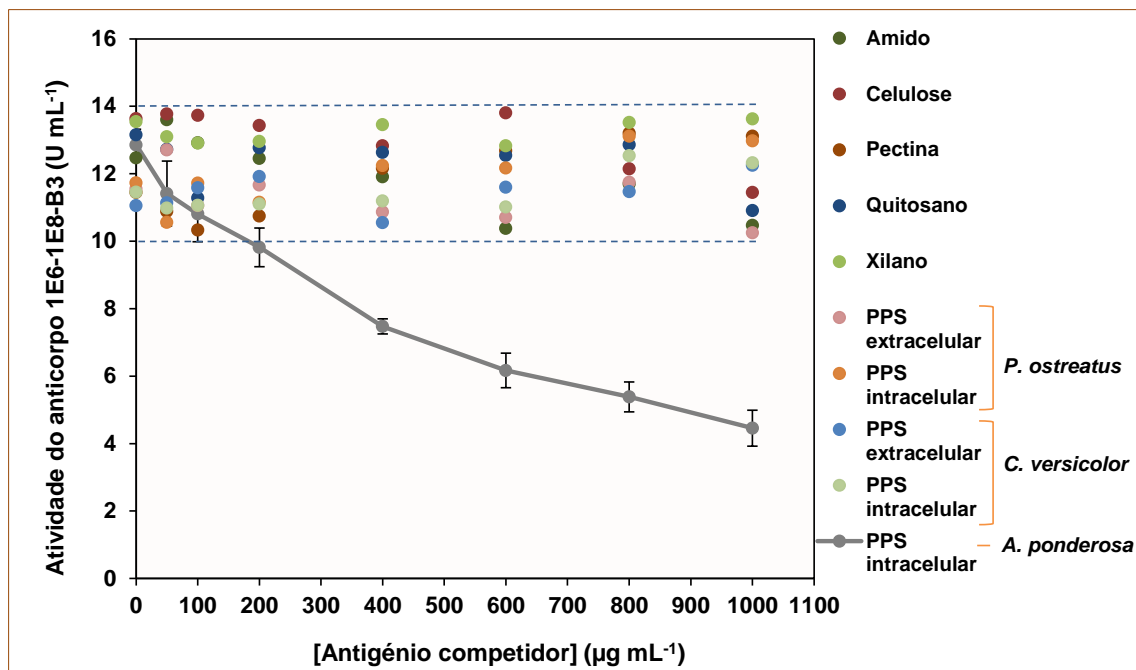


Figura 5.23. Avaliação da competitividade antigénica para os extratos de complexos PPS intracelulares das culturas de *A. ponderosa* da estirpe de S¹⁰ Aleixo R., utilizando diferentes competidores antigénicos. Os valores apresentados são a média \pm desvio-padrão de três réplicas.

5.3.10 Análise da especificidade do anticorpo para os complexos PPS produzidos em culturas de *A. ponderosa*

Para uma análise da especificidade do anticorpo 1E6-1E8-B3 para o antigénio em estudo foi efetuado um ensaio de *Western blotting* no qual o antigénio solúvel foi previamente separado por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas. A Figura 5.24 apresenta os géis de gradiente de poliacrilamida usados na análise eletroforética. Foram analisadas as frações purificadas por SEC (Figura 5.24 (a)) que apresentaram um maior reconhecimento pelo anticorpo e as frações de IEC (Figura 5.24 (b)) obtidas após a aplicação de gradiente de KCl. O perfil eletroforético das frações purificadas foi comparado com a amostra total de extrato de complexos PPS das culturas de *A. ponderosa* da estirpe de S¹⁰ Aleixo R. obtida ao décimo quarto dia de produção.

Pela análise do perfil eletroforético obtido para a amostra total, comparativamente ao perfil dos padrões proteicos com massa molecular conhecida, observa-se a existência de quatro bandas. Uma banda (i) com MM superior a 480 kDa, a segunda (ii) com MM entre 198 e 480 kDa, a terceira (iii) com MM pouco acima de 66 kDa e a quarta (iv) com MM um pouco inferior a 12 kDa.

As frações purificadas de SEC (Figura 5.24 (a)), identificadas de III, IV e V, apresentaram um perfil como uma única banda. A fração III apresentou uma banda com MM entre 198 e 480 kDa com MM semelhante à banda ii presente no extrato total. A fração IV apresenta uma banda com MM próxima da banda iii do extrato total, perto de 66 kDa. A fração V apresenta uma banda com MM perto de 12 kDa, semelhante ao que sucede com a banda iv observada no perfil do extrato total. As bandas observadas nos perfis eletroforéticos para as frações III, IV e V apresentam MM semelhantes aos quantificados por SEC.

Relativamente às frações purificadas por IEC, (Figura 5.24 (b)), identificadas de I, II e III apresentaram um perfil constituído por duas bandas. Uma banda com MM

semelhante à banda ii do extrato total, entre 198 e 480 kDa e outra com MM semelhante à banda iv do extrato total, próximo de 12 kDa.

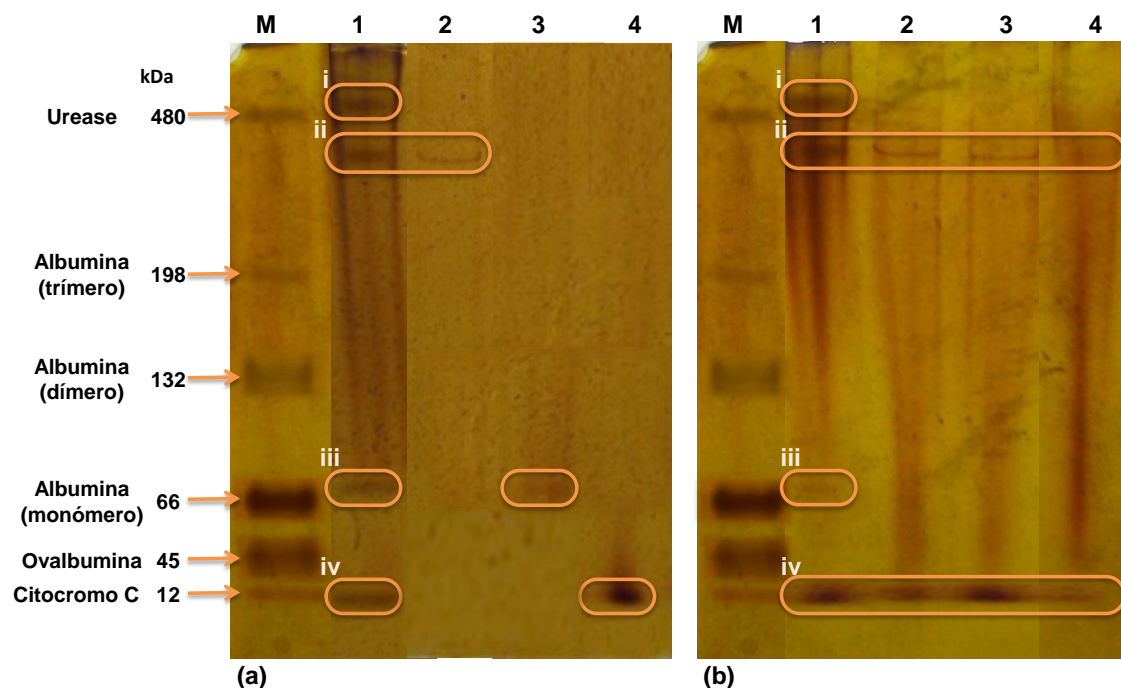


Figura 5.24. Análise eletroforética por PAGE-Nativa do extrato de complexos PPS das culturas *A. ponderosa* e frações purificadas por SEC (a) e IEC (b). M – marcador de massas moleculares, 1 – extrato de complexos PPS, 2,3 e 4 – frações III, IV e V de SEC (a), frações I, II e III de IEC (b).

Após a eletroforese, e a transferência do antígeno, complexos PPS do extrato total e frações purificadas, para a membrana de nitrocelulose, o anticorpo é usado para detectar presença de antígenos específicos.

Na Figura 5.25 encontram-se as membranas de nitrocelulose com os resultados de reconhecimento do anticorpo 1E6-1E8-B3 para a amostra de extrato total e frações purificadas. O extrato total de complexos PPS de *A. ponderosa* apresenta um reconhecimento pelo anticorpo nas bandas ii e iv, mostrando uma banda de reconhecimento mais intensa referente à banda ii.

As frações purificadas obtidas por SEC (Figura 5.25 (a)) apenas duas foram reconhecidas pelo anticorpo. A fração III foi a que apresentou um reconhecimento

mais forte do anticorpo, e a fração V apresentou um reconhecimento mais fraco, enquanto a fração IV não foi detetada pelo anticorpo. Estes resultados estão de acordo com os obtidos anteriormente para reconhecimento pelo anticorpo apresentado na Figura 5.21, que mostra que as frações III e V são as que apresentam reconhecimento mais elevado no anticorpo.

Relativamente às frações purificadas obtidas por IEC (Figura 5.25 (b)) observa-se um reconhecimento para ambas as bandas detetadas no perfil eletroforético em PAGE-Nativa. A banda ii apresenta no entanto um reconhecimento mais forte que a banda iv. Pode ainda observar-se que as frações I e II apresentam bandas de reconhecimento mais fortes que a fração III. Estes resultados estão de acordo com a análise de reconhecimento por atividade do anticorpo apresentada na Figura 5.22, que mostra também um maior reconhecimento da fração I.

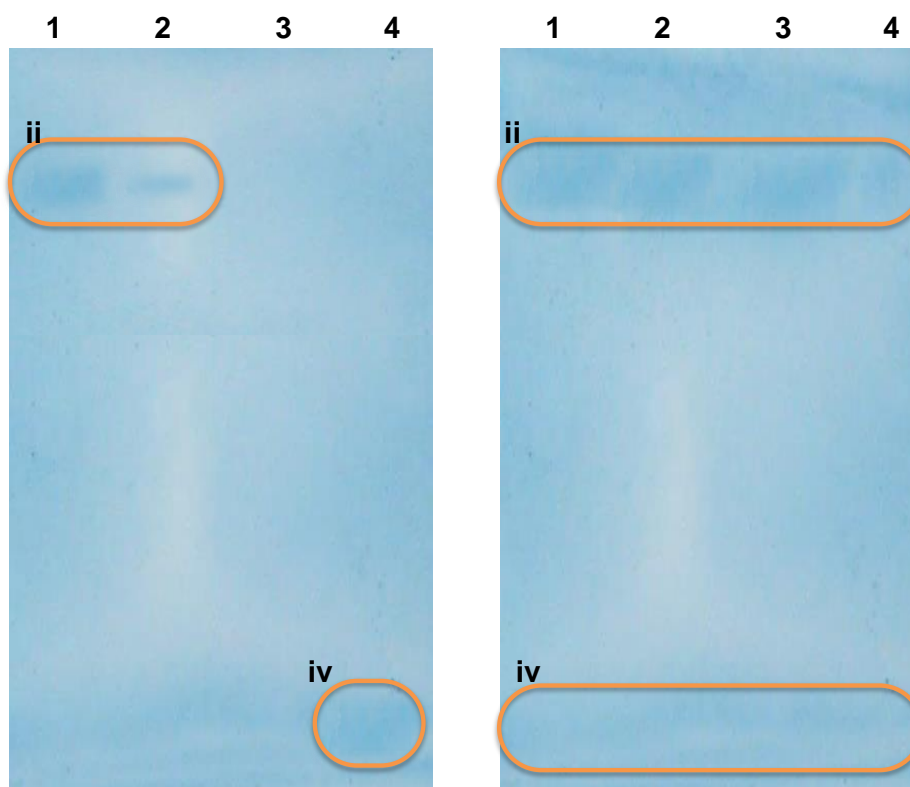


Figura 5.25. Membranas de nitrocelulose de análise da especificidade do anticorpo 1E6-1E8-B3 para o extrato de complexos PPS das culturas *A. ponderosa* e frações purificadas por SEC (a) e IEC (b).

1 – extrato de complexos PPS, 2,3 e 4 – frações III, IV e V de SEC (a), frações I, II e III de IEC (b).

O estudo descrito neste capítulo permitiu-nos caracterizar os extratos de complexos PPS obtidos de cogumelos e culturas de *A. ponderosa*. No *screening* de monitorização da produção destes compostos, pelas técnicas de microanálise, obtiveram-se perfis de bandas espectrais característicos deste tipo de compostos. Pela análise cromatográfica de exclusão molecular foi possível confirmar a presença de complexos, estimar o número de compostos presentes nos extratos e determinar o seu peso molecular. Foi possível conhecer o perfil de produção dos complexos em cultura líquida e purificar os extratos recorrendo a técnicas cromatográficas.

A análise de reconhecimento por anticorpos específicos mostrou elevada especificidade do anticorpo 1E6-1E8-B3 para algumas frações maioritárias de complexos PPS.

Conclusões e perspectivas futuras

A utilização de cogumelos silvestres na produção de compostos biologicamente ativos com aplicações terapêuticas, tem sido alvo de inúmeras pesquisas, revelando importância no desenvolvimento de novos compostos com propriedades medicinais.

O presente estudo mostrou uma abordagem inovadora para esta espécie de cogumelos comestíveis, *A. ponderosa*, com a produção e valorização de metabolitos ativos.

Com base nos estudos descritos nos capítulos anteriores, foi possível retirar algumas conclusões gerais, que a seguir se descrevem.

Os estudos de caracterização inorgânica dos corpos de frutificação de *A. ponderosa* recolhidos nos diferentes locais mostraram que:

- ✓ os corpos de frutificação apresentaram na sua constituição um elevado conteúdo em água, correspondendo a cerca de 90 - 93% da sua massa;
- ✓ as amostras recolhidas nos diferentes locais apresentaram valores médios de massa seca semelhantes, variando entre 6,9 a 9,7%, com conteúdos médios de matéria orgânica entre 6,2 a 9% e de minerais entre 0,5 e 0,9%;
- ✓ a análise inorgânica permitiu inferir que o consumo de 100 g de matéria edível de *A. ponderosa* corresponde a um máximo de 9 g de macronutrientes (incluindo glúcidos e proteínas), e um valor inferior a 1 g de minerais;
- ✓ as amostras de corpos de frutificação de *A. ponderosa* dos diferentes locais apresentaram elevado conteúdo em macroelementos, nomeadamente: potássio cálcio, fósforo, magnésio, e sódio, podendo ser uma importante fonte destes nutrientes essenciais;
- ✓ O potássio foi o elemento presente em concentrações mais elevadas em todas as amostras de *A. ponderosa* analisadas;

- ✓ os oligoelementos cobre, crómio, ferro, manganês e zinco, microelementos essenciais nos sistemas biológicos, também podem ser encontrados em corpos de frutificação de *A. ponderosa*, dentro dos limites de DDR.
- ✓ a presença de metais pesados, tais como: alumínio, bário, cádmio, chumbo e prata foi bastante baixa, dentro dos limites de DDR, não constituindo risco para a saúde humana;
- ✓ a análise inorgânica mostrou que a variação da composição mineral dos cogumelos consoante o local de colheita foi semelhante à observada para as respetivas amostras de solo, podendo indicar a influência das características dos substratos na composição das amostras recolhidas nos diferentes locais.

O estudo de isolamento, seleção e identificação de estirpes fúngicas mostrou que:

- ✓ foi possível isolar diferentes estirpes de *A. ponderosa* a partir das amostras de corpos de frutificação recolhidos nos diferentes locais;
- ✓ durante o processo de isolamento das estirpes de *A. ponderosa*, foram isoladas diferentes estirpes fúngicas que vivem em associação com estes *Basidiomycetes* no seu *habitat* natural;
- ✓ as estirpes fúngicas predominantes da microbiota de *A. ponderosa*, que foi possível isolar, pertencem aos géneros *Aspergillus*, *Cladobotryum*, *Mucor* e *Penicillium*.

Os estudos de análise molecular das amostras de *A. ponderosa* e isolados fúngicos mostraram que:

- ✓ a técnica de M13-PCR *fingerprinting* permitiu identificar e caracterizar o perfil molecular de cogumelos da espécie *A. ponderosa*;
- ✓ os diferentes perfis moleculares obtidos possibilitaram distinguir os cogumelos da espécie *A. ponderosa* de outras espécies de fungos que com eles coabitam, assim como de outros cogumelos comestíveis;
- ✓ a abordagem molecular por M13-PCR permitiu diferenciar, de modo rápido e reprodutível, as diferentes estirpes fúngicas testadas, com graus de proximidade suficientes possibilitando agrupá-las de acordo com o género a que pertencem e o local de colheita;
- ✓ a análise por M13-PCR mostrou ser uma ferramenta importante para o desenvolvimento de uma estratégia para o processo de certificação da espécie *A. ponderosa*.

A pesquisa de compostos bioativos produzidos por *A. ponderosa* mostrou que:

- ✓ foi possível produzir culturas líquidas a partir das estirpes isoladas de corpos de frutificação de *A. ponderosa* dos diferentes locais;
- ✓ foi possível obter diferentes extratos de compostos bioativos, nomeadamente extratos lipofílicos, fenólicos e complexos PPS, a partir dos corpos de frutificação e culturas de *A. ponderosa*;
- ✓ as amostras de corpos de frutificação, culturas e extratos lipofílicos, fenólicos e complexos PPS apresentaram importantes propriedades antioxidantes, com

atividade pelos métodos do DPPH e β -caroteno/ácido linoleico e capacidade de mimetização das atividades CAT e SOD;

- ✓ as amostras de micélios e sobrenadantes das culturas apresentaram atividade antiproliferativa em células tumorais MDA-MB-231;
- ✓ as importantes propriedades biológicas observadas, designadamente as propriedades antioxidantes e efeito antiproliferativo sugerem que os cogumelos/extratos obtidos de *A. ponderosa* podem ser uma importante fonte de compostos bioativos com potencial valor nutracêutico e medicinal.

A análise dos efeitos toxicológicos das amostras de corpos de frutificação e culturas de *A. ponderosa* mostraram que:

- ✓ as amostras de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das culturas de *A. ponderosa* das estirpes recolhidas nos diferentes locais, não apresentaram toxicidade em *A. salina*, com valores de mortalidade inferiores a 3%;
- ✓ os extratos lipofílicos, fenólicos totais e complexos PPS, obtidos de corpos de frutificação e culturas de *A. ponderosa* apresentaram baixa toxicidade em *A. salina*, com valores de mortalidade inferiores a 3, 6 e 6%, respetivamente;
- ✓ as amostras de corpos de frutificação e micélios das culturas administrados em doses elevadas (2000 mg kg^{-1}) a murganhos Swiss, não apresentaram efeitos tóxicos, não se observando morte de nenhum dos murganhos administrados, pelo que o valor de LD_{50} estimado será muito superior a 2000 mg Kg^{-1} ;
- ✓ no *screening* farmacológico, amostras testadas não induziram sinais de toxicidade aos animais, os quais mostraram um comportamento normal a nível motor, cognitivo e sensorial, durante as primeiras 24 h de ensaio;

- ✓ as amostras foram eficazes na redução de lesões no fígado induzidas por etanol, apresentando um efeito hepatoprotetor semelhante ao fármaco padrão silimarina;
- ✓ a elevação das atividades ALT, AST, ALP e GGT, no soro de ratos *Wistar*, foi significativamente antagonizada pela administração prévia das amostras de corpos de frutificação e micélios de *A. ponderosa*;
- ✓ os resultados apontam para a possibilidade de utilização destes cogumelos/micélios como suplementos alimentares, nutracêuticos, coadjuvantes no tratamento de doenças hepáticas.

A análise do perfil de produção de complexos PPS em culturas líquidas de *A. ponderosa* mostrou que:

- ✓ a produção de biomassa, mostrou um crescimento exponencial a partir do segundo até ao sexto dia de cultura, entrando num período de desaceleração do crescimento até ao décimo primeiro dia, devido à ação de reagentes limitantes, e partir daí passou a estar em fase estacionária até ao final da cultura;
- ✓ a produção de complexos PPS iniciou-se com o crescimento da biomassa, mas apresentou uma maior expressividade a partir do décimo primeiro dia de cultura, apresentando um máximo de concentração no décimo quarto dia;
- ✓ o perfil de produção de polissacáridos foi acompanhado pela produção de proteína, demonstrando a presença de complexos PPS intracelulares;
- ✓ os resultados mostraram que a produção dos complexos PPS não está totalmente associada com o crescimento do microrganismo, pois a maior produção destes metabolitos ocorre durante o período de desaceleração do crescimento celular.

O estudo de caracterização dos extratos bioativos de complexos PPS mostrou que:

- ✓ a análise espectral das amostras de complexos PPS, obtidos em corpos de frutificação e culturas de *A. ponderosa*, efetuadas por técnicas espectroscópicas de microanálise mostraram um perfil característico de bandas compatível com este tipo de compostos;
- ✓ as abordagens de microscopia e microanálise por FTIR-ATR e Raman podem ser usadas para efetuar uma monitorização de forma rápida e *in situ*, na produção de compostos PPS, não necessitando de uma extração prévia e laboriosa das amostras;
- ✓ foi possível separar os diferentes complexos PPS presentes nos extratos por análise SEC-UV-RI-HPLC, apresentando perfis cromatográficos semelhantes;
- ✓ os extratos de complexos PPS obtidos dos corpos de frutificação e culturas apresentaram três e quatro complexos PPS majoritários, respetivamente, com MM entre >20 <1,5 kDa;
- ✓ foi possível purificar os extratos de complexos PPS intracelulares (obtidos de micélios da culturas), por técnicas cromatográficas, obtendo-se sete complexos PPS majoritários, com diferentes massas moleculares por análise SEC e três frações purificadas de complexos com carga iónica negativa por análise IEC;
- ✓ as frações purificadas apresentaram bandas de infravermelho nas regiões espectrais referentes a componentes proteicas e glucídicas, consistentes com os perfis observados para os extratos totais de complexos PPS;
- ✓ as frações purificadas obtidas por SEC apresentaram ainda massas moleculares diferentes quando analisadas por SEC-UV-RI-HPLC, com resultado consistentes aos observados na análise dos extratos totais de complexos PPS;

- ✓ as frações purificadas por IEC mostraram a presença de dois complexos PPS, por posterior análise SEC-UV-RI-HPLC, com massas moleculares inferiores a 1,5 kDa.

Os estudos de atividade antiproliferativa dos extratos de complexos PPS mostraram que:

- ✓ os extratos de complexos PPS de micélios e sobrenadantes das culturas de *A. ponderosa* apresentaram um importante potencial antiproliferativo em células tumorais MDA-MB-231;
- ✓ os extratos de complexos PPS de sobrenadantes mostraram ser mais eficientes do que os dos micélios na redução da capacidade de crescimento da linha celular cancerígena, apresentando valores de IC₅₀ inferiores;
- ✓ os extratos de complexos PPS obtidos do micélio da estirpe de Mértola mostraram efeito mais promissor na inibição de crescimento de células MDA-MB-231.

O estudo da detecção de compostos polissacáridos em extratos de complexos PPS mostrou que:

- ✓ no ensaio *screening* de análise do reconhecimento dos compostos polissacáridos presentes nos extratos de complexos PPS extraídos de corpos de frutificação e culturas, por diferentes anticorpos específicos produzidos por tecnologia de hibridomas, evidenciou-se uma maior reconhecimento dos micélios das culturas da estirpe de S¹⁰ Aleixo R.;
- ✓ os extratos de complexos PPS intracelulares, obtidos nos diferentes dias de cultura, foram reconhecidos pelo anticorpo 1E6-1E8-B3, apresentando um perfil

de reconhecimento semelhante ao perfil de concentração de polissacáridos presente nos diferentes extratos;

- ✓ as frações purificadas por SEC e IEC, dos extratos de complexos PPS intracelulares obtidos ao décimo quarto dia de cultura, também apresentaram reconhecimento pelo anticorpo específico 1E6-1E8-B3, apresentando uma maior atividade do anticorpo para as amostras maioritárias;
- ✓ no ensaio de competitividade antigénica, o anticorpo específico 1E6-1E8-B3 não reconhece os determinantes antigénicos específicos dos antígenos competidores testados, mostrando elevada especificidade para os complexos PPS de *A. ponderosa*;
- ✓ no ensaio de análise da especificidade antigénica para os extratos de complexos PPS e frações purificadas por SEC e IEC, o anticorpo reconheceu dois complexos PPS;
- ✓ as técnicas imunológicas utilizadas, podem ser úteis no desenvolvimento de metodologias de controlo da especificidade de produção destes compostos.

Este trabalho veio colocar algumas questões que seria importante esclarecer em estudos futuros, designadamente:

- ✓ caracterizar estruturalmente os complexos PPS presentes nas frações ativas purificadas por RMN 2D (COSY, HMQC, HMBC, NOESY);
- ✓ otimizar o processo de produção/aumento de escala com vista a uma maior produção de compostos bioativos em culturas de *A. ponderosa*;

- ✓ avaliar o efeito antitumoral de micélios/extratos em ensaios de proliferação celular, utilizando linhas celulares derivadas de diferentes tipos de carcinoma, e estimar o mecanismo de ação em ensaios de proliferação celular, metastização e efeito nas vias de sinalização, com vista ao desenvolvimento de suplementos alimentares ou coadjuvantes da terapia antitumoral.

Referências

- Afzali D, Mostafavi A, Taher M, Moradian A (2007) Flame atomic absorption spectrometry determination of trace amounts of copper after separation and preconcentration onto TDMBAC-treated analcime pyrocatechol-immobilized. *Talanta* 71:971–975.
- Agrahar-Murugkar D, Subbulakshmi G (2005) Nutritional value of edible wild mushrooms collected from the Khasi hills of Meghalaya. *Food Chemistry* 89(4):599–603.
- Aida F, Shuhaimi M, Yazid M, Maaru A (2009) Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. *Trends in Food Science and Technology* 20:567–575.
- Alves A, Phillips A, Henriques I, Correia A (2007) Rapid differentiation of species of Botryosphaeriaceae by PCR fingerprinting. *Research in Microbiology* 158:112–121.
- AOAC (1991) (Association of Official Analytical Chemist) Official methods of analysis, 15th ed; 2nd 101–102.
- Araújo M, Nascimento I (2000) Marine ecotoxicological tests: analysis of sensitivity responses. *Food and Chemical Toxicology* 38:1097–1102.
- Arteiro J, Martins M, Salvador C, Candeias M, Karmali A, Caldeira A (2012) Protein-Polysaccharides of *Trametes versicolor*: Production and Biological Activities. *Medicinal Chemistry Research* 21:937–943.
- Arteiro JM, Martins MR, Salvador C, Candeias FB, Martins S, Karmali A, Caldeira AT (2008) Overproduction of protein-bound polysaccharides from a *Coriolus versicolor* strain by submerged fermentation. Proceedings of the 10th International Chemical and Biological Engineering Conference 2008 – ChemPor 2008, Braga, Portugal. Edited by E. C. Ferreira and M. Mota, first edition August 2008. ISBN: 978-972-97810-3-2:2001–2006.
- Arunasree K (2010) Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB231. *Phytomedicine* 17:581–588.
- Badfar-Chaleshtori S, Shiran B, Kohgard M, Mommeni H, Hafizi A, Khodambashi M, Mirakhorli N, Sorkheh K (2012) Assessment of genetic diversity and structure of Imperial Crown (*Fritillaria imperialis* L.) populations in the Zagros region of Iran using AFLP, ISSR and RAPD markers and implications for its conservation. *Biochemical Systematics and Ecology* 42:35–48.

-
- Barros L, Baptista P, Correia D, Morais J, Ferreira I (2007a) Effects of conservation treatment and cooking on the chemical composition and antioxidant activity of Portuguese wild edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:4781–4788.
- Barros L, Calhêla R, Vaz J, Ferreira I, Baptista P, Estevinho L (2007b) Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms. *European Food Research and Technology* 225:151–156.
- Barros L, Cruz T, Baptista P, Estevinho L, Ferreira I (2008a) Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food and Chemical Toxicology* 46:2742–2747.
- Barros L, Dueñas M, Ferreira I, Baptista P, Buelga C (2009) Phenolic acids determination by HPLC–DAD–ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. *Food and Chemical Toxicology* 47:1076–1079.
- Barros L, Falcão S, Baptista P, Freire C, Vilas-Boas M, Ferreira I (2008b) Antioxidant activity of *Agaricus* sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Food Chemistry* 111:61–66.
- Barros L, Ferreira M, Queirós B, Ferreira I, Baptista P (2007c) Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry* 103:413–419.
- Bastos M, Lima M, Conserva L, Andrade V, Rocha E, Lemos R (2009) Studies on the antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bur. (Bignoniaceae) extracts and their main constituents. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 18:8–16.
- Beluhan S, Ranogajec A (2011) Chemical composition and non-volatile components of Croatian wild edible mushrooms. *Food Chemistry* 124:1076–1082.
- Bloom H, Beier H, Gross H (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8:93–99.
- Borovicka J, Randa Z (2007) Distribution of iron, cobalt, zinc and selenium in macrofungi. *Mycological Progress* 6:249–259.
- Borovicka J, Randa Z, Jelínek E, Kotrba P, Dunn C (2007) Hyperaccumulation of silver by *Amanita strobiliformis* and related species of the section *Lepidella*. *Mycological Research* 111:1339–1344.

- Box J (1984) Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. *Water Research* 18(12):1597–1599.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248–254.
- Brandão J, Pinheiro J, Pinho D, Silva D, Fernandes E, Fragoso G, Costa M, Silva A (2011) Intoxicação por cogumelos em Portugal. *Acta Médica Portuguesa* 24:269–278.
- Burtis C, Ashwood E, Bruns D, Sawyer B (2008) Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, 6th edition, Elsevier Saunders.
- Caldeira AT, Salvador C, Pinto F, Arteiro JM, Martins MR (2008) Molecular biomarkers to characterize *Amanita ponderosa* mushrooms. Proceedings of the 10th International Chemical and Biological Engineering Conference 2008 - ChemPor 2008, Braga, Portugal. Edited by E. C. Ferreira and M. Mota, first edition August 2008. ISBN: 978-972-97810-3-2:2094–2099.
- Caldeira AT, Salvador C, Pinto F, Arteiro JM, Martins MR (2009) MSP-PCR and RAPD molecular biomarkers to characterize *Amanita ponderosa* mushrooms. *Annals of Microbiology* 59(3):1–6.
- Cao Z, Lin Z (2004) Antitumor and anti-angiogenic activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide. *Acta Pharmacologica Sinica* 25(6):833–838.
- Chang S (2008) Overview of mushroom cultivation and utilization as functional foods. In: Cheung PCK, editor. *Mushrooms as functional foods*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc. 1–33.
- Cheng G, Liu J, Tao M, Lu C, Wua G (2012) Activity, thermostability and isozymes of superoxide dismutase in 17 edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis*
- Cheng J, Lin C, Lur H, Chen H, Lu M (2008) Properties and biological functions of polysaccharides and ethanolic extracts isolated from medicinal fungus, *Fomitopsis pinicola*. *Process Biochemistry* 43:829–834.
- Cheung Y, Siu K, Liu Y, Wu J (2012) Molecular properties and antioxidant activities of polysaccharide–protein complexes from selected mushrooms by ultrasound-assisted extraction. *Process Biochemistry* 47:892–895.

-
- Choi Y, Lee S, Chun J, Lee H, Lee J (2006) Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chemistry* 99:381–387.
- Chudzynski K, Falandysz J (2008) Analysis of elements content of Larch Bolete (*Suillus grevillei*) mushroom. *Chemosphere* 73:1230–1239.
- Cocchi L, Vesconi L, Petrini L, Petrini O (2006) Heavy metals in edible mushrooms in Italy. *Food Chemistry* 98:277–284.
- Colombini M, Modugno F (2004) Characterisation of proteinaceous binders in artistic paintings by chromatographic techniques. *Journal of Separation Science* 147–160.
- Cornejo J, Osorio A, Perez M, Majon J, Horcajada G, Daza A (2003) Molecular studies on *Amanita curtipes* and *Amanita ponderosa*. GenBank, NCBI.
- Crous P, Verkley G, Groenewald J, Samson R (2009) Fungal Biodiversity. CBS, Laboratory Manual Series, Netherlands.
- Cui J, Chisti Y (2003) Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production. *Biotechnology Advances* 21:109–122.
- Cui J, Goh K, Archer R (2007) Characterisation and bioactivity of protein-bound polysaccharides from submerged-culture fermentation of *Coriolus versicolor* Wr-74 and ATCC-20545 strains. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 34:393–402.
- Dapkevicius A, Venskutonis R, Beek T, Linssen J (1998) Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77:140–146.
- Daza A, Moreno G, Santamaría C, Romero de la Osa L, Bernedo M, Manjón J (2003) *Amanita ponderosa* “Gurumelo”, un hongo a estudiar por su interés gastronómico-silvícola en Andalucía (Sierra de Aracena), provincia de Huelva. *Boletín de la Sociedad Micológica de Madrid* 27:91–99.
- De Pinho P, Ribeiro B, Gonçalves R, Baptista P, Valentão P, Seabra R, Andrade P (2008) Correlation between the pattern volatiles and the overall aroma of wild edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:1704–1712.
- Domsch K, Gams W, Anderson T (1980) Compendium of soil fungi, vol. 1, Academic Press, London.

- Douhan G, Rizzo D (2003) Host-parasite relationships among bolete infecting *Hypomyces* species. *Mycological Research* 107(11):1342–1349.
- Duarte-Almeida J, Santos R, Genovese MI, Lajolo F (2006) Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. *Ciência e Tecnologia Alimentar* 26(2):446–452.
- Dubois M, Gilles GA, Hamilton JK, Rebers RA (1956) Colorimetric estimation of carbohydrates by phenol-sulphuric acid method. *Analytical Chemistry*
- Elmastas M, Isildak O, Turkecul I, Temur N (2007) Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis* 20:337–345.
- European Commission (2003). *European Commission Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level of Copper Health and Consumer Protection Directorate-General, Brussels, Belgium*
- FAO/WHO (2002) Human vitamin and mineral requirements. World Health Organization, Food and Agriculture Organization of United Nations, Rome, Italy.
- Fernandes S, Rangel A, Lima J (1997) Flow injection determination of sodium, potassium, calcium, and magnesium in beer by flame emission and atomic absorption spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45:1269–1272.
- Fernández-Checa J, Kaplowitz N, Colell A, García-Ruiz C (1997) Oxidative stress and alcoholic liver disease. *Alcohol Health and Research World* 21:321–324.
- Ferreira I, Baptista P, Vilas-Boas M, Barros L (2007) Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry* 100:1511–1516.
- Ferreira I, Barros L, Abreu R (2009) Antioxidants in Wild Mushrooms. *Current Medicinal Chemistry* 16(12):1543–1560.
- Firenzuoli F, Gori L, Lombardo G (2007) The medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murrill: review of literature and pharmaco-toxicological problems. *Advance Access Publication* 5(1):3–15.
- Flórez A, Álvarez-Martín P, López-Díaz T, Mayo B (2007) Morphotypic and molecular identification of filamentous fungi from Spanish blue-veined Cabrales cheese, and typing of *Penicillium roqueforti* and *Geotrichum candidum* isolates. *International Dairy Journal* 17:350–357.

-
- Gardes M, Bruns TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2:113–118.
- Garibay-Orijel R, Córdova J, Cifuentes J, Valenzuela R, Estrada-Torres A, Kong A (2009) Integrating wild mushrooms use into a model of sustainable management for indigenous community forests. *Forest Ecology and Management* 258:122–131.
- Gençcelep H, Uzun Y, Tunçtürk Y, Demirel K (2009) Determination of mineral contents of wild-grown edible mushrooms. *Food Chemistry* 113:1033–1036.
- Gerber G, Léonard A, Hantson P (2002) Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of manganese compounds. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 42 25–34.
- Gern R, Wisbeck E, Rampinelli J, Ninow J, Furlan S (2008) Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. *Bioresource Technology* 99:76–82.
- Giavasis I (2014) Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals. *Current Opinion in Biotechnology* 26:162–173.
- Godoy P, Cano J, Gene J, Guarro J, Hoffling-Lima AL, Colombo AL (2004) Genotyping of 44 isolates of *Fusarium solani*, the main agent of fungal keratitis in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* 42:4494–4497.
- Gonzaga M, Ricardo N, Heatley F, Soares S (2005) Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill. *Carbohydrate Polymers* 60:43–49.
- González V, Arenal F, Platas G, Esteve-Raventós F, Peláez F (2002) Molecular typing of Spanish species of *Amanita* by restriction analysis of the ITS region of the DNA. *Mycological Research* 106(8): 903–910.
- Griffiths A, Miller J, Suzuki D, Lewontin R, Gelbart W (2000) An Introduction to Genetic Analysis, 7th edition, W.H. Freeman and Company, New York.
- Grob F, Dumer J, gaupels F (2013) Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses. *Frontiers in Plant Science* 4:1–15.
- Guélat B, Strohle G, Lattuada M, Delegrange L, Valax P, Morbidelli M (2012) Simulation model for overloaded monoclonal antibody variants separations in ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A* 1253:32–43.

- Guillamón E, García-Lafuente A, Lozano M, D'Arrigo M, Rostagno M, Villares A, Martínez J (2010) Edible mushrooms: Role in the prevention of cardiovascular diseases. *Fitoterapia* 81:715–723.
- Guimarães J, Chambel L, Melzoch K, Pereira P, Tenreiro R (2011a) *Cladosporium* sp. from phyloplane: a diversity evaluation on a Continental ecosystem. *Mycosphere* 2(3):191–201.
- Guimarães J, Pereira P, Chambel L, Tenreiro R (2011b) Assessment of filamentous fungal diversity using classic and molecular approaches: case study e Mediterranean ecosystem. *Fungal ecology* 4:309–321.
- Ha H, Shin H, Feitelson M, Yu D (2010) Oxidative stress and antioxidants in hepatic pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology* 16(8):6035–6043.
- Hartl M, Humpf H (2000) Toxicity assessment of fumonisins using the brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay. *Food and Chemical Toxicology* 38:1097–1102
- Hawksworth D (2001) The magnitude of fungal diversity: The 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research* 105:1422–1432.
- Hearst R, Nelson D, McCollum G, Millar B, Maeda Y, Goldsmith C, Rooney P, Loughrey A, Rao J, Moore J (2009) An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. *Complementary Therapies in Clinical Practice* 15:5–7.
- Heleno S, Barros L, Sousa M, Martins A, Ferreira I (2010) Tocopherols composition of Portuguese wild mushrooms with antioxidant capacity. *Food Chemistry* 119:1443–1450.
- Hermet A, Eheust D, Mounier J, Barbier G, Jany J (2012) Molecular systematics in the genus *Mucor* with special regards to species encountered in cheese. *Fungal Biology* 116:692–705.
- Hsieh C-C, Hernández-Ledesma B, Lumen B (2011) Cell proliferation inhibitory and apoptosis-inducing properties of anacardic acid and lunasin in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Food Chemistry* 125:630–636.
- Ishii P, Prado C, Mauro M, Carreira C, Mantovani M, Ribeiro L, Dichi J, Oliveira R (2011) Evaluation of *Agaricus blazei* *in vivo* for antigenotoxic, anticarcinogenic, phagocytic and immunomodulatory activities. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 59:412–422.

-
- Jayakumar T, Ramesh E, Geraldine P (2006) Antioxidant activity of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on CCl₄-induced liver injury in rats. *Food and Chemical Toxicology* 44:1989–1996.
- Jesenak M, Majtan J, Rennerova Z, Kyselovic J, Banovcin P, Hrubisko M (2013) Immunomodulatory effect of pleuran (β -glucan from *Pleurotus ostreatus*) in children with recurrent respiratory tract infections. *International Immunopharmacology* 15:395–399.
- Josic D, Horn H, Schulz P, Schwinn H, Britsch L (1998) Size-exclusion chromatography of plasma proteins with high molecular masses. *Journal of Chromatography A* 796:289–298.
- Kalac P (2010) Trace element contents in European species of wild growing edible mushrooms: A review for the period 2000–2009. *Food Chemistry* 122:2–15.
- Kalac P, Svoboda L (2000) A review of trace element concentrations in edible mushrooms. *Food Chemistry* 69:73–281.
- Karmali A, Oliveira P (1999) Glucose 1- and 2-oxidases from fungal strains: isolation and production of monoclonal antibodies. *Journal of Biotechnology* 69:151–162.
- Karmali K, Karmali A, Teixeira A, Curto M (2004a) Assay for glucose oxidase from *Aspergillus niger* and *Penicillium amagasakiense* by Fourier transform infrared spectroscopy. *Analytical Biochemistry* 333:320–327.
- Karmali K, Karmali A, Teixeira A, Curto M (2004b) The use of Fourier transform infrared spectroscopy to assay for urease from *Pseudomonas aeruginosa* and *Canavalia ensiformis*. *Analytical Biochemistry* 331:115–121.
- Keyhani J, Keyhani E, Attar F, Hadizadeh M (2002) Anti-oxidative stress enzymes in *Pleurotus ostreatus*. *Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Technology – Proceedings of the II International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology*
- Kim SW, Hwang HJ, Park JP, Cho YJ, Song CH, Yun JW (2002) Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media. *Letters in Applied Microbiology* 56–61.
- Kirchmair K, Carrilho P, Pfab R, Haberl B, Felgueiras J, Carvalho F, Cardoso J, Melo I, Vinhas J, Neuhauser N (2012) *Amanita* poisonings resulting in acute, reversible renal failure: new cases, new toxic *Amanita* mushrooms. *Nephrology Dialysis Transplantation* 27:1380–1386.

- Kozarski M, Klaus A, Niksic M, Jakovljevic D, Helsper J, Van Griensven L (2011) Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. *Food Chemistry* 129:1667–1675.
- Kozarski M, Klaus A, Niksic M, Vrvic M, Todorovic N, Jakovljevic D, Griensven L (2012) Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. *Journal of Food Composition and Analysis* 26:144–153.
- Kure C, Abeln E, Holst-Jensen A, Skaar I (2002) Differentiation of *Penicillium commune* and *Penicillium palitans* isolates from cheese and indoor environments of cheese factories using M13 fingerprinting. *Food Microbiology* 19:151–157.
- Leal A, Barros L, Barreira J, Sousa M, Martins A, Santos-Buelga C, Ferreira I (2013) Portuguese wild mushrooms at the pharma nutrition interface: Nutritional characterization and antioxidant properties. *Food Research International* 50:1–9.
- Lee C, Yang X, Wan J (2006) The culture duration affects the immunomodulatory and anticancer effect of polysaccharopeptide derived from *Coriolus versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology* 38:14–21.
- Lee J, Gan H, Latiff S, Chuah C, Lee W, Yang Y, Loo B, Ng S, Gagnon P (2012) Principles and applications of steric exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A* 1270:
- Li C, Oberlies N (2005) The most widely recognized mushroom: Chemistry of the genus *Amanita*. *Life Sciences* 78:532–538.
- Li S, Wang D, Tian W, Wang X, Zhao J, Liu Z, Chen R (2008) Characterization and anti-tumor activity of a polysaccharide from *Hedysarum polybotrys* Hand-Mazz. *Carbohydrate Polymers* 73:344–350.
- Li X, Zhou A, Li X (2007) Inhibition of *Lycium barbarum* polysaccharides and *Ganoderma lucidum* polysaccharides against oxidative injury induced by c-irradiation in rat liver mitochondria. *Carbohydrate Polymers* 69:172-178.
- Libjaková L, Bystrický S, Lizicárová I, Paulovicová E, Machová E (2007) Evaluation of different mannan polysaccharide usage in enzyme-linked immunosorbent assay

-
- for specific antibodies determination. *Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 45:522–525.
- Lin E, Sung S (2006) Cultivating conditions influence exopolysaccharide production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. *International Journal of Food Microbiology* 108:182–187.
- Lin K, Tsai P, Hsieh C, Chang L, Lin S (2011) Antimetastatic effect and mechanism of ovatodiolide in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Chemico-Biological Interactions* 194:148–158.
- Lindequist U, Niedermeyer T, Lich W (2005) The Pharmacological Potential of Mushrooms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2:285-299.
- Liu Y, Sun J, Luo Z, Rao S, Su Y, Xu R, Yang Y (2012) Chemical composition of five wild edible mushrooms collected from Southwest China and their antihyperglycemic and antioxidant activity. *Food and Chemical Toxicology* 50:1238–1244.
- Lopes M, Silva D, Freitas G, Tenreiro R (2007) Simultaneous identification and typing of *Candida* species by MSP-PCR and AFLP: Study of clinical isolates from a Portuguese pediatric hospital. *Journal de Mycologie Médicale* 17:157–167.
- Lü L, Zhang L, Wai M, Yew D, Xu J (2012) Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury. *Toxicology in Vitro* 26:636–644.
- Lu Z, Tao W, Zou X, Fu H, Ao Z (2007) Protective effects of mycelia of *Antrodia camphorata* and *Armillariella tabescens* in submerged culture against ethanol-induced hepatic toxicity in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 110 160–164.
- Luo H, Wang F, Baia Y, Chen T, Zheng W (2012) Selenium nanoparticles inhibit the growth of HeLa and MDA-MB-231 cells through induction of S phase arrest. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 94:304–308.
- Ma J, Ryan P, Delhaize E (2001) Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Science* 6 6:273–278.
- Ma Z, Michailides T (2002) Characterization of *Botryosphaeria dothidea* isolates collected from pistachio and other plant hosts in California. *Ecology and Population Biology* 92:519–526.
- Maity K, Patra S, Dey B, Bhunia S, Mandal S, Das D, Majumdar D, Maiti S, Maiti T, Islam S (2011) A heteropolysaccharide from aqueous extract of an edible

- mushroom, *Pleurotus ostreatus* cultivar: structural and biological studies. *Carbohydrate Research* 346 366–372.
- Malençon G, Heim R (1942) Notes critiques sur quelques hyménomycètes d'Europe et d'Afrique du Nord I. Les amanites blanches meridionales. *Bulletin trimestriel de la Société mycologique de France* 58:14–34.
- Mao C, Hsu M, Hwang W (2007) Physicochemical characterization of grifolan: Thixotropic properties and complex formation with Congo Red. *Carbohydrate Polymers* 68:502–510.
- Martins MR (2004) Degradação biológica de fungicidas em amostras de solo, Tese de Doutorado, Universidade de Évora, Évora.
- Martins MR, Salvador C, Vicente H, Neves J, Arteiro JM, Caldeira AT (2010) A Data Mining approach to characterize *Amanita ponderosa* mushrooms using inorganic profile and M13-PCR molecular Data. In Vasco Cadavez & Daniel Thiel Eds, Eurosis – ETI Publication, Ghent, Belgium. *FOODSIM'2010* 5–12.
- Martins S, Karmali A, Andrade J, Custódio A, Serralheiro M (2005) Characterization of monoclonal antibodies against altered (T103I) amidase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Biotechnology* 30:207–219.
- Martins S, Karmali A, Serralheiro M (2011) Chromatographic behaviour of monoclonal antibodies against wild -type amidase from *Pseudomonas aeruginosa* on immobilized metal chelates. *Biomedical Chromatography* 25:1327–1337.
- Mattila P, Suonpaa K, Piironen V (2000) Functional properties of edible mushrooms. *Nutrition* 16:694–696.
- McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry* 244:6049–6055.
- McPherson R, Pincus M (2011) HENRY'S Clinical Diagnostics and Management by Laboratory Methods, 22nd edition, Elsevier Saunders.
- Mendil D, Uluözlü O, Hasdemir E, Caglar A (2004) Determination of trace elements on some wild edible mushroom samples from Kastamonu, Turkey. *Food Chemistry* 88:281–285.
- Menikpurage I, Soysa S, Abeytunga D (2012) Antioxidant activity and cytotoxicity of the edible mushroom, *Pleurotus cystidiosus* against Hep-2 carcinoma cells. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka* 40(2):107–114.

-
- Meyer W, Koch A, Niemann C, Beyermann B, Epplen J, Biirner T (1991) Differentiation of species and strains among filamentous fungi by DNA fingerprinting. *Current Genetics* 19::239–242.
- Moncalvo J, Drehmel D, Vilgalys R (2000) Variation in modes and rates of evolution in nuclear and mitochondrial ribosomal DNA in the mushroom genus *Amanita* (*Agaricales*, *Basidiomycota*): phylogenetic implications *Molecular Phylogenetics and Evolution* 16:8–63.
- Moncalvo J, Vilgalys R, Redhead S, Johnson J, James T, Aime M, Hofstetter V, Verduin S, Larsson E, Baroni T, Thorn R, Jacobsson S, Cl  men  on H, Miller O (2002) One hundred and seventeen clades of euagarics. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23:357–400.
- Moreno-Rojas R, Díaz-Valverde A, Moreno-Arroyo B, González T, Capote C (2004) Mineral content of gurumelo (*Amanita ponderosa*). *Food Chemistry* 85:325–330.
- Moreno G, Platas G, Peláez F, Bernedo M, Vargas A, Daza A, Santamaría C, Camacho M, Romero de la Osa L, Manjón J (2008) Molecular phylogenetic analysis shows that *Amanita ponderosa* and *A. curtipes* are distinct species. *Mycological Progress* 7:41–47.
- Morgado L, Martins L, Gonçalves H, Oliveira P (2006) Estudo de intoxica  es causadas por ingestão de macrofungos na região do Alto Alentejo. *Anais da Associa  o Micol  gica A Pantorra* 6:65–74.
- Mota I, Pinto P, Novo C, Sousa G, Guerreiro O, Guerra A, Duarte M, Rodrigues A (2012) Extraction of Polyphenolic Compounds from *Eucalyptus globulus* Bark: Process Optimization and Screening for Biological Activity. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, [dxdoiorg/101021/ie300103z](https://doi.org/10.1021/ie300103z)
- Na YS, Kim WJ, Kim SM, Park JK, Lee SM, Kim SO, Synytsya A, Park Y (2010) Purification, characterization and immunostimulating activity of water-soluble polysaccharide isolated from *Capsosiphon fulvescens*. *International Immunopharmacology* 10:364–370.
- Nada S, Omara E, O. S, Zahran H (2010) Mushroom insoluble polysaccharides prevent carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rat. *Food and Chemical Toxicology* doi:10.1016/j.fct.2010.1008.1019.

- Nitha B, Fijesh P, Janardhanan K (2011) Hepatoprotective activity of cultured mycelium of Morel mushroom, *Morchella esculenta*. *Experimental and Toxicologic Pathology* 65:105–112.
- Noipa T, Srijaranai S, Tuntulani T, Ngeontae W (2011) New approach for evaluation of the antioxidant capacity based on scavenging DPPH free radical in micelle systems. *Food Research International* 44:798–806.
- OCDE (2001) OECD guideline for testing of chemicals. 1–26.
- Oh J, Cho E, Nam S, Choi J, Yun J (2007) Production of polysaccharide-peptide complexes by submerged mycelial culture of an entomopathogenic fungus *Cordyceps sphecocephala*. *Process Biochemistry* 42:352–362.
- Okumura F, Cavaleiro E, Nóbrega J (2004) Simple flame photometric experiments to teach principles of atomic spectrometry in undergraduate analytical chemistry courses. *Química Nova* 27:832–836.
- Orhan I, Ustun O (2011) Determination of total phenol content, antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibition in selected mushrooms from Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis* 24 386–390.
- Ouzouni P, Veltsistas P, Paleologos E, Riganakos K (2007) Determination of metal content in wild edible mushroom species from regions of Greece. *Journal of Food Composition and Analysis* 20:480–486.
- Palacios I, García-Lafuente A, Guillamón E, Villares A (2012) Novel isolation of water-soluble polysaccharides from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* mushrooms. *Carbohydrate Research* 358:72–77.
- Palacios I, Lozano M, Moro C, D'Arrigo M, Rostagno M, Martínez J, Lafuente A, Guillamón E, Villares A (2011) Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemistry* 128:674–678.
- Pereira E, Barros L, Martins A, Ferreira I (2012) Towards chemical and nutritional inventory of Portuguese wild edible mushrooms in different habitats. *Food Chemistry* 130:394–403.
- Pereira L, Amado A, Critchley A, Velde F, Ribeiro-Claro P (2009) Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman). *Food Hydrocolloids* 23:1903–1909.

-
- Pinho-Almeida F (1994) Estudos taxonómicos no género *Amanita*. Secção *Amidella*-Complexo *Lepiotoides*: *A. curtipes* Gilbert, *A. lepiotoides* Barla e *A. ponderosa* Malençon & Heim. *Revista de Biologia* 15:131–151.
- Pöldmaa K (2003) Three species of *Hypomyces* growing on basidiomata of *Stereaceae*. *Mycologia* 95(5):921–933.
- Pöldmaa K (2011) Tropical species of *Cladobotryum* and *Hypomyces* producing red pigments. *Studies in Mycology* 68:1–34.
- Pradhan S, Girish C (2006) Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. *Indian Journal of Medical Research* 124:491–504
- Przyborowski J, Sulima P (2010) The analysis of genetic diversity of *Salix viminalis* genotypes as a potential source of biomass by RAPD markers. *Industrial Crops and Products* 31:395–400.
- Ragonezi C, Caldeira AT, Martins MR, Salvador C, Santos-Silva C, Ganhão E, Klimaszewska K, Zavattieri A (2013) Molecular approach to characterize ectomycorrhizae fungi from mediterranean pine stands in Portugal. *Brazilian Journal of Microbiology* 44:663–670.
- Rao J, Smyth T, Millar B, Moore J (2009) Antimicrobial properties of shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*). *International Journal of Antimicrobial Agents* 33:591–592.
- Ravikumar S, Fredimoses M, Gnanadesigan M (2012) Anticancer property of sediment actinomycetes against MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2:92–96.
- Refaie F, Esmat A, Daba A, Osman W, Taha S (2010) Hepatoprotective activity of polysacchropeptides from *Pleurotus ostreatos* mycelium on thioacetamide-intoxicated mice. *Micologia Aplicada internacional* 22:1–13.
- Reis F, Barros L, Martins A, Ferreira I (2012a) Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: An inter-species comparative study. *Food and Chemical Toxicology* 50:191–197.
- Reis F, Martins A, Barros L, Ferreira I (2012b) Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: A comparative study between in vivo and in vitro samples. *Food and Chemical Toxicology* 50:1201–1207.

- Ribeiro B, Valentão P, Baptista P, Seabra R, Andrade P (2007) Phenolic compounds, organic acids profiles and antioxidative properties of beefsteak fungus (*Fistulina hepatica*). *Food and Chemical Toxicology* 45:1805–1813.
- Ro H-S, Kim S, Ryu J, Jeon C, Lee E T, Le H (2007) Comparative studies on the diversity of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*: ITS sequence analysis, RAPD fingerprinting, and physiological characteristics. *Mycological Research* 111:710–715.
- Rudawska M, Leski T (2005) Macro- and microelement contents in fruiting bodies of wild mushrooms from the Notecka forest in west-central Poland. *Food Chemistry* 92:499–506.
- Saleem T, Chetty C, Ramkanth S, Rajan V, Kumar K, Gauthaman K (2010) Hepatoprotective Herbs – A Review. *International Journal of Research in Pharmacological Science* 1(1):1–5.
- Salvador C, Candeias MF, Martins MR, Caldeira AT (2013a) Culturas de fungos basidiomicetos em resíduos agroindustriais para produção de compostos bioativos (*Bio*)Energia ISBN: 978-989-8550-13-2:56–67.
- Salvador C, Martins MR, Arteiro JM, Caldeira AT (2013b) Molecular evaluation of some *Amanita ponderosa* and the fungal strains living in association with these mushrooms in the southwestern Iberian Peninsula. *Annals Microbiology* DOI 10.1007/s13213-13013-10757-z.
- Salvador C, Martins MR, Candeias MF, Karmali A, Arteiro JM, Caldeira AT (2012) Characterization and biological activities of protein-bound polysaccharides produced by cultures of *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Agricultural Science and Technology A* 2:1296–1306.
- Salvador C, Martins MR, Vicente H, Neves J, Arteiro JM, Caldeira AT (2013c) Modelling molecular and inorganic data of *Amanita ponderosa* mushrooms using artificial neural networks. *Agroforestry Systems* 87:295–302.
- Sambrook J, Feitsch E, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schenk-Jaeger K, Rauber-Luthy C, Bodmer M, Kupferschmidt H, Kullak-Ublick G, Ceschi A (2012) Mushroom poisoning: A study on circumstances of exposure and patterns of toxicity. *European Journal of Internal Medicine* 23:85–91.
- Sesli E, Tüzen M (1999) Levels of trace elements in the fruiting bodies of macrofungi growing in the East Black Sea region of Turkey. *Food Chemistry* 65:453–460.

-
- Sesli E, Tuzen M, Soylak M (2008) Evaluation of trace metal contents of some wild edible mushrooms from Black sea region, Turkey. *Journal of Hazardous Materials* 160:462–467.
- Shi Y, Sun J, He H, Guo H, Zhang S (2008) Hepatoprotective effects of *Ganoderma lucidum* peptides against d-galactosamine-induced liver injury in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 117:415–419.
- Silva J, Beirão T, Filipe P, Fernandes A (2006) Efeito de flavonóides no stresse oxidante e foto-oxidante no eritrócito humano. *Boletim da SPHM* 21 (1):6-28.
- Siqueira J, Bomm M, Pereira N, Garcez W, Boaventura M (1998) Estudo fitoquímico de biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* leach Activity - guided isolation of constituents of *Unonopsis lindmanii* - Annonaceae, based on the brine shrimp lethality bioassay. *Química Nova* 21:557–559.
- Smith C, Marks A, Lieberman M (2007) Bioquímica Médica Básica de Marks - Uma abordagem clínica, 2ª edição, Artmed.
- Smith J, Rowan N, Sullivan R (2002) Medicinal mushrooms: Their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments. *University of Strathclyde*
- Soriano S, Netto A, Cassella R (2007) Determination of Cu, Fe, Mn and Zn by flame atomic absorption spectrometry in multivitamin/multimineral dosage forms or tablets after an acidic extraction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43:304–310.
- Sun, Huang H, Huang C, Lin J (2012) Cycle arrest and apoptosis in MDA-MB-231/Her2 cells induced by curcumin. *European Journal of Pharmacology* 690:22–30.
- Synytsya A, Mícková K, Synytsya A, Jablonsky I, Speváček J, Erban V, Kováříková E, Copíková J (2009) Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers* 76:548–556.
- Tavares A, Agapito M, Coelho M, Silva J, Barros-Timmons A, Coutinho J, Xavier A (2005) Selection and optimization of culture medium for exopolysaccharide production by *Coriolus (Trametes) versicolor*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21:1499–1507.
- Teixeira D, Patão R, Coelho A, Costa C (2006) Comparison between sample disruption methods and solid–liquid extraction (SLE) to extract phenolic compounds from *Ficus carica* leaves. *Journal of Chromatography A* 1103:22–28.

- Tepe B, Daferera D, Tepe A, Polissiou M, Sokmen A (2007) Antioxidant activity of the essential oil and various extracts of *Nepeta flavida* Hub-Mor from Turkey. *Food Chemistry* 103:1358–1364.
- Tsang S, Lam C, Yan C, Mak J, Ooi G, Ho J, Lam B, Man R, Sham J, Lam W (2003) *Coriolus versicolor* polysaccharide peptide slows progression of advanced non-small cell lung cancer. *Respiratory Medicine* 97:618–624.
- Tsujikawa K, Mohri H, Kuwayama K, Miyaguchi H, Iwata Y, Gohda A, Fukushima S, Inoue H, Kishi T (2006) Analysis of hallucinogenic constituents in *Amanita* mushrooms circulated in Japan. *Forensic Science International* 164:172–178.
- Tüzen M, Sesli E, Soylak M (2007) Trace element levels of mushroom species from East Black Sea region of Turkey. *Food Control* 18:806–810.
- Vargas N, Bernal A, V. S, Franco-Molano A, Restrepo S (2011) Amatoxin and phallotoxin composition in species of the genus *Amanita* in Colombia: A taxonomic perspective. *Toxicon* 58:583–590.
- Vaz J, Barros L, Martins A, Morais J, Vasconcelos M, Ferreira I (2011a) Phenolic profile of seventeen Portuguese wild mushrooms. *LWT - Food Science and Technology* 44:343–346.
- Vaz J, Barros L, Martins A, Santos-Buelga C, Vasconcelos M, Ferreira I (2011b) Chemical composition of wild edible mushrooms and antioxidant properties of their water soluble polysaccharidic and ethanolic fractions. *Food Chemistry* 126:610–616.
- Venkatakrishnan V, Shenbhagaraman R, Kaviyarasan V, Gunasundari D, Radhika K, Dandapani R, Jagadish L (2010) Antioxidant and antiproliferative effect of *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Phytology* 2(1):022–028.
- Vetter J (2005) Mineral composition of basidiomes of *Amanita* species. *Mycological Research* 109(6):746–750.
- Vinogradova E, Wasser S (2005) The structure of a polysaccharide isolated from *Inonotus levis* P. Karst. mushroom (Heterobasidiomycetes). *Carbohydrate Research* 340:2821–2825.
- Wang H, NG T, Liu W, Ooi E, Chang S (1996) Polysaccharide-peptide complexes from the cultured mycelia of the mushroom *Coriolus versicolor* and their culture medium activate mouse lymphocytes and macrophages. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 28:601–607.

-
- Wang S, Yu H, Wickliffe J (2011) Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO₂. *Toxicology in Vitro* 25: 2147–2151.
- Wasser S (2002) Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Application of Microbiological Biotechnology* 60:258–274.
- Wasser S (2011) Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89:1323–1332.
- Wong W, Abdulla M, Chua K, Kuppusamy U, Tan Y, Sabaratnam V (2012) Hepatoprotective Effects of *Panus giganteus* (Berk.) Corner against Thioacetamide- (TAA-) Induced Liver Injury in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* doi:10.1155/2012/170303.
- Wray W, Boulikas T, Wray V, Hancock R (1981) Silver stain of proteins in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 118:197–202.
- Wu D, Cederbaum A (2009) Oxidative stress and alcoholic liver disease. *Seminars on Liver Disease* 29(2):141–154.
- Yang L, Zhang L (2009) Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. *Carbohydrate Polymers* 76:349–361.
- Yang Q, Huang B, Li H, Zhang C, Zhang R, Huang Y, Wang J (2012) Gastroprotective activities of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* in rats. *International Journal of Biological Macromolecules* 50 1224–1228.
- Yoo K, Lee CH, Lee H, Moon B, Lee CY (2008) Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. *Food Chemistry* 106:929–936.
- Yuen S, Choi S, Phillips D, Ma C (2009) Raman and FTIR spectroscopic study of carboxymethylated non-starch polysaccharides. *Food Chemistry* 114:1091–1098.
- Zawirska-wojtasiak R, Siwulski M, Mildner-Szkuddarz S, Wąsowicz E (2009) Studies on the aroma of different species and strains of *Pleurotus* measured by GC/MS, sensory analysis and electronic nose. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* 8:47–61.

- Zhang B, Yan P, Chen H, He J (2012a) Optimization of production conditions for mushroom polysaccharides with high yield and antitumor activity. *Carbohydrate Polymers* 87:2569–2575.
- Zhang M, Cui S, Cheung P, Wang Q (2007) Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science and Technology* 18:4–19.
- Zhang P, Chen Z, Hu J, Wei B, Zhang Z, Hu W (2005) Production and characterization of Amanitin toxins from a pure culture of *Amanita exitialis*. *FEMS Microbiology Letters* 252:223–228.
- Zhang Z, Song H, Peng Z, Luo Q, Ming J, Zhao G (2012b) Characterization of stipe and cap powders of mushroom (*Lentinus edodes*) prepared by different grinding methods. *Journal of Food Engineering* 109:406–413.
- Zhao L, Dong Y, Chen G, Hua Q (2010) Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Polymers* 80:783–789.

Site consultados:

- 1- www.biologia.blogger.com.br
- 2- www.infoescola.com
- 3- www.mycologia.com
- 4- Librosdebiologia.blogspot.com
- 5- Elreinodeloshongos.blogspot.pt
- 6- www.biodiversidadvirtual.org
- 7- setasextremadura.blogspot.com
- 8- www.adaptogeno.com

Anexos

Anexo A – Composição química dos meios de cultura utilizados no isolamento das estirpes fúngicas e produção de culturas líquidas.

Tabela A.1. Composição do meio de Hagen modificado.

| Meio Hagen (modificado) | |
|-------------------------------------|---------------------------------|
| Reagentes | Quantidade (g L ⁻¹) |
| KH ₂ PO ₄ | 0,5 |
| NH ₄ Cl | 0,5 |
| MgSO ₄ 7H ₂ O | 0,5 |
| FeCl ₃ | 0,005 |
| Glucose | 5 |
| <i>Malt extract</i> | 5 |
| Tiamina HCL | 0,050 |
| Rifanpicina | 0,035 |
| Agar | 15 |

Tabela A.2. Composição do meio de Melin-Norkans modificado (MMN).

| Meio MMN | |
|--|---------------------------------|
| Reagentes | Quantidade (g L ⁻¹) |
| KH ₂ PO ₄ | 1 |
| (NH ₄) ₂ HPO ₄ | 0,25 |
| MgSO ₄ 7H ₂ O | 0,15 |
| NaCl | 0,025 |
| CaCl ₂ | 0,025 |
| FeCl ₃ | 0,012 |
| Glucose | 20 |
| <i>Malt extract</i> | 3 |
| <i>Yeast extract</i> | 1 |
| Tiamina HCL | 0,3 |
| Rifanpicina | 0,035 |
| Agar | 15 |

Tabela A.3. Composição do meio *potato dextrose agar* (PDA)

| Meio PDA | |
|--------------------------|---------------------------------|
| Reagentes | Quantidade (g L ⁻¹) |
| <i>Potatoes infusion</i> | 32,2 |
| Dextrose | 3,9 |
| Agar | 2,9 |

Tabela A.4. Composição do meio de meio *malt extract agar* (MEA)

| Meio MEA | |
|---------------------|---------------------------------|
| Reagentes | Quantidade (g L ⁻¹) |
| <i>Malt extract</i> | 20 |
| Glucose | 20 |
| Peptona | 1 |
| Agar | 20 |

Tabela A.5. Composição do meio *malt extract* (ME)

| Meio ME | |
|---------------------|---------------------------------|
| Reagentes | Quantidade (g L ⁻¹) |
| <i>Malt extract</i> | 20 |
| Glucose | 20 |
| Peptona | 1 |

Anexo B – Composição de algumas soluções utilizadas no capítulo 2

B.1 - TBE 10X (pH 8,3)

Tris 890 mM

Ácido bórico 890 mM

EDTA 500 mM

B.2 - Solução tampão TBE 1X

Diluição de 1:10 da solução de TBE 10X com água ultrapura estéril.

B.3- Solução tampão TBE 0,5X

Diluição de 1:20 da solução de TBE 10X com água ultrapura estéril.

B.4 - Solução de corante stock (6X) (1 mL)

Azul de bromofenol 0,0025 g

Xilenocianol 0,0025 g

Glicerol 300 µL

TBE 1X 700 µL

B.5 - Solução de corante stock 1X

Diluição de 1:6 da solução corante stock 6X com TBE 1X.

Anexo C – Curvas de calibração padrão utilizadas para quantificação dos compostos bioativos

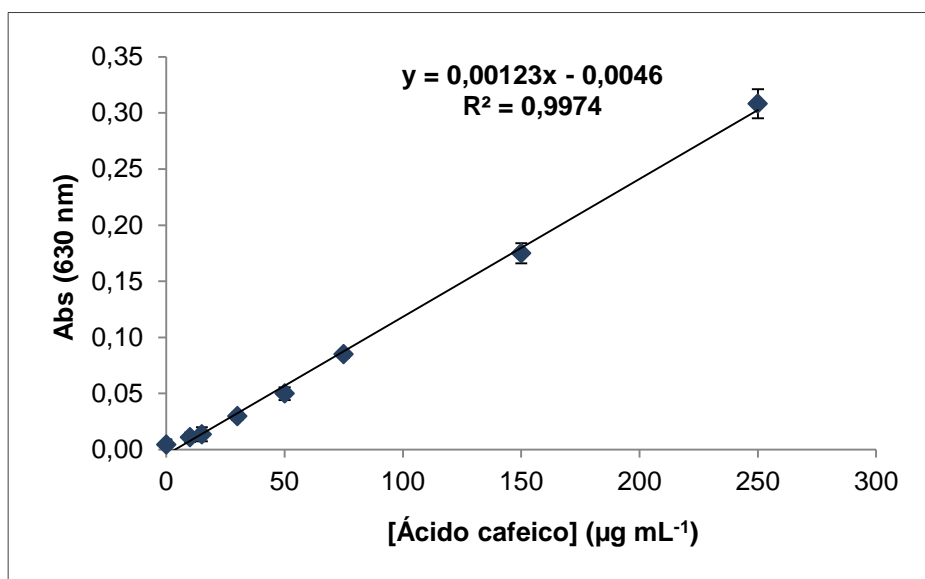


Figura C.1. Curva de calibração do ácido cafeico para quantificação do conteúdo fenólico total efetuado pelo método do Folin-Ciocalteu. Os valores apresentados são a média \pm desvio-padrão de 6 réplicas.

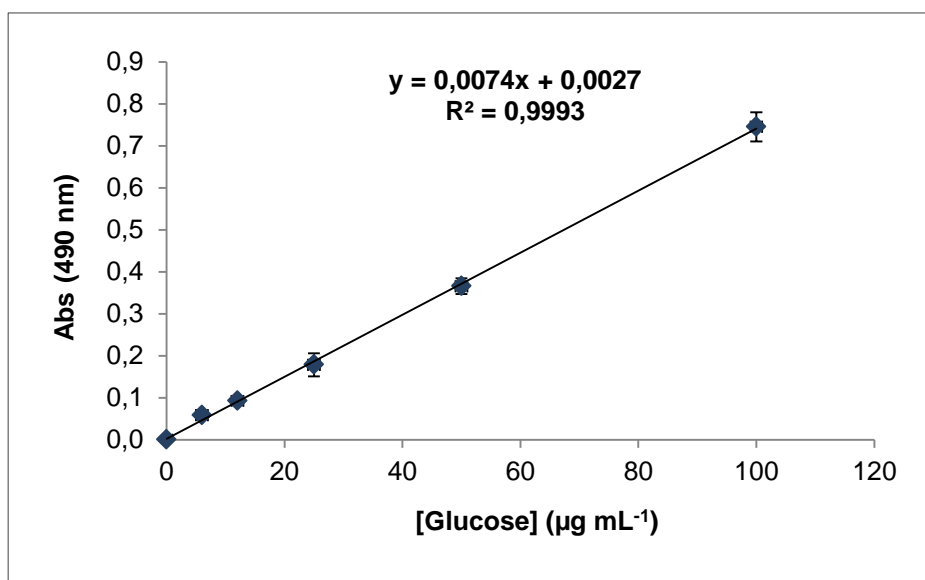


Figura C.2. Curva de calibração de glucose para quantificação de polissacáridos pelo método do fenol-ácido sulfúrico. Os valores apresentados são a média \pm desvio-padrão de 3 réplicas.

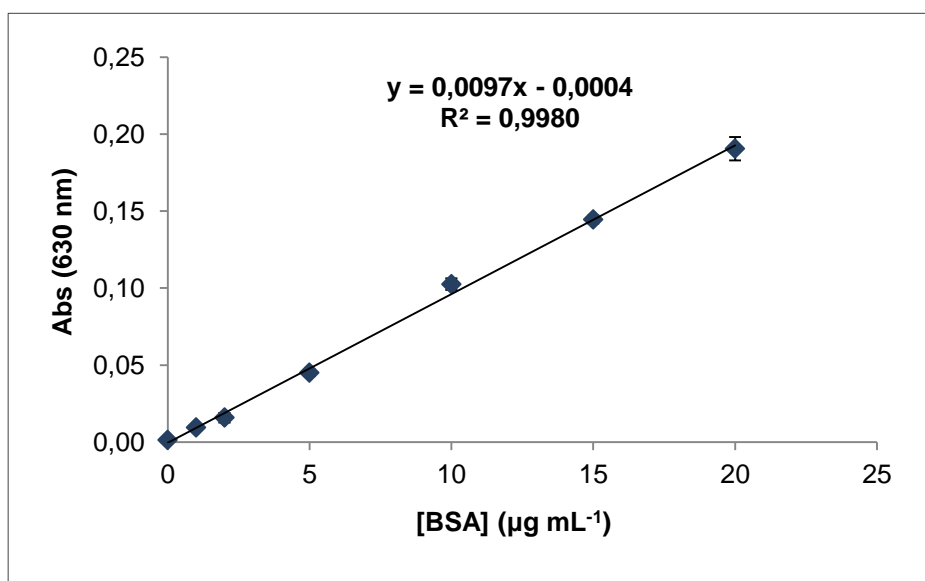


Figura C.3. Curva de calibração de BSA para quantificação de proteína pelo método de Bradford. Os valores apresentados são a média \pm desvio-padrão de 3 réplicas.

Anexo D – Curvas de calibração padrão e dose resposta utilizadas para análise das atividades biológicas

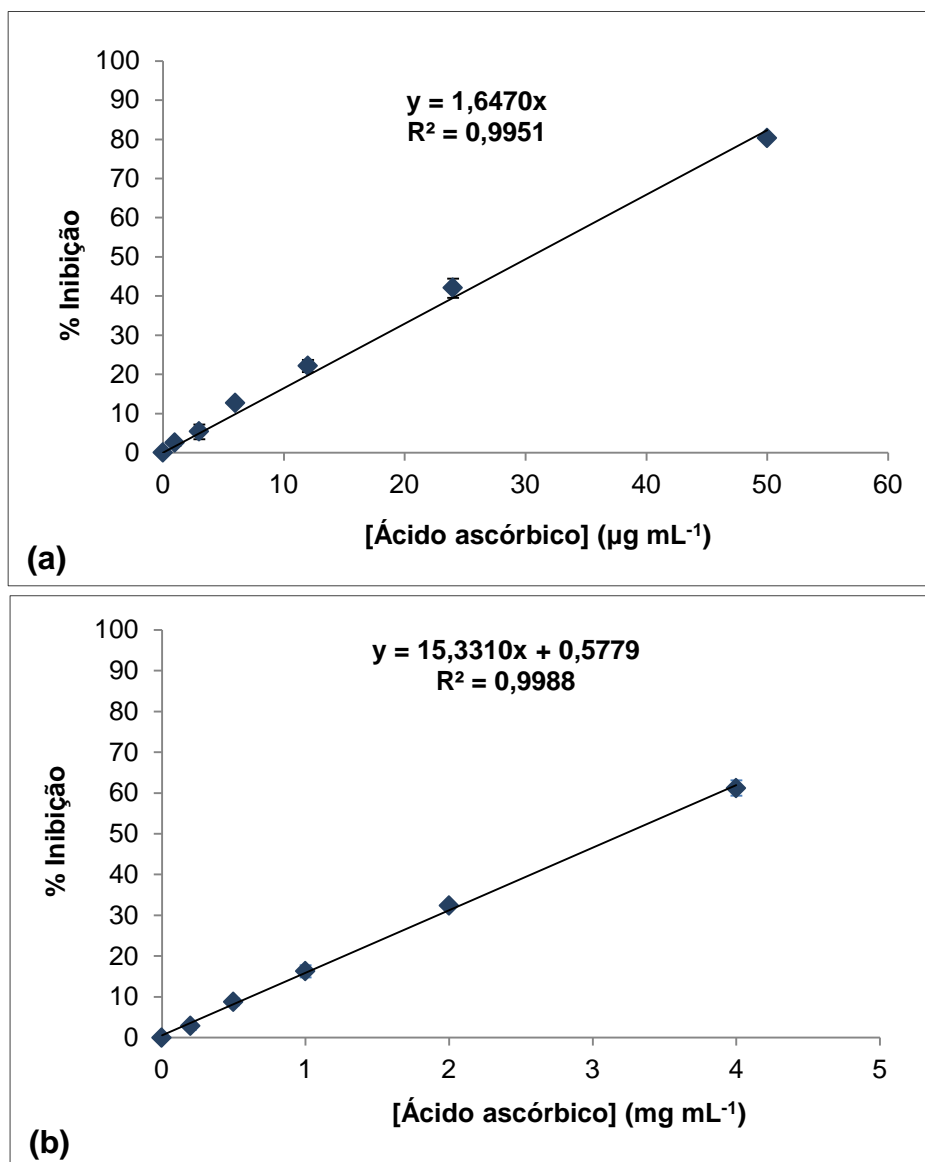


Figura D.1. Avaliação da percentagem de inibição do ácido ascórbico: pelo método do radical livre DPPH (a) e pelo método do β -caroteno/ácido linoleico (b). Os valores apresentados são a média \pm desvio-padrão de 6 réplicas.

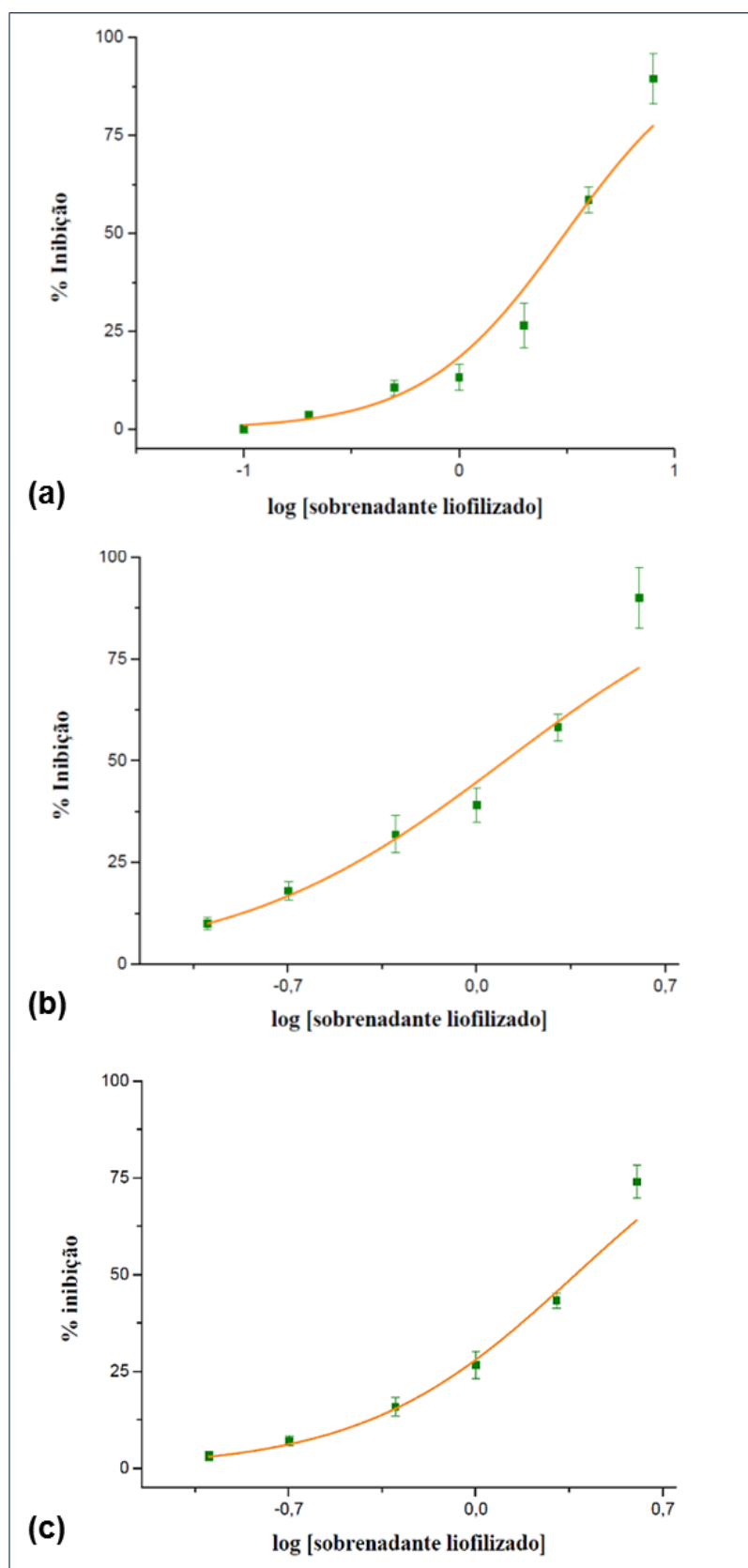


Figura D.2. Determinação dos valores de IC_{50} para os sobrenadantes liofilizados obtidos nas culturas líquidas de *A. ponderosa* das estirpes de Beja (a), Mértola (b) e S^{10} Aleixo R. (c). Os valores apresentados são a média \pm desvio-padrão de 3 réplicas

Anexo E – Curvas de dose resposta obtidas nos ensaios de potencial antiproliferativo em células tumorais humanas MDA-MB-231

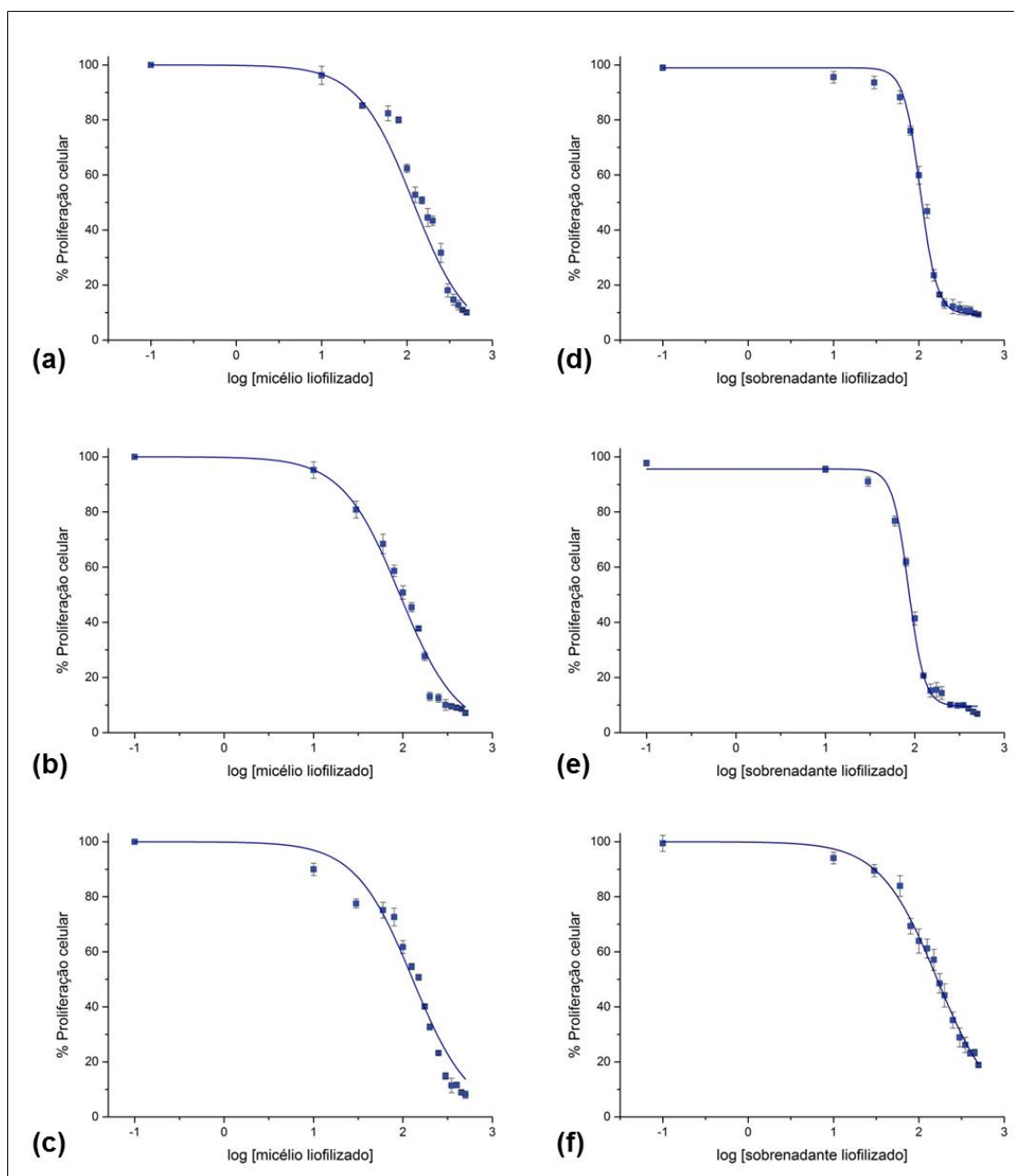


Figura E.1. Determinação dos valores de IC₅₀ de potencial antiproliferativo, obtidos em ensaios de células humanas MDA-MB-231, para as amostras de micélios liofilizados obtidos nas culturas de *A. ponderosa* das estirpes de Beja (a), Mértola (b) e S¹⁰ Aleixo R. (c) e sobrenadantes liofilizados das culturas das estirpes de Beja (d), Mértola (e) e S¹⁰ Aleixo R. (f). Os valores apresentados são a média ± desvio-padrão de três ensaios independentes (n = 3) efetuados em triplicado.

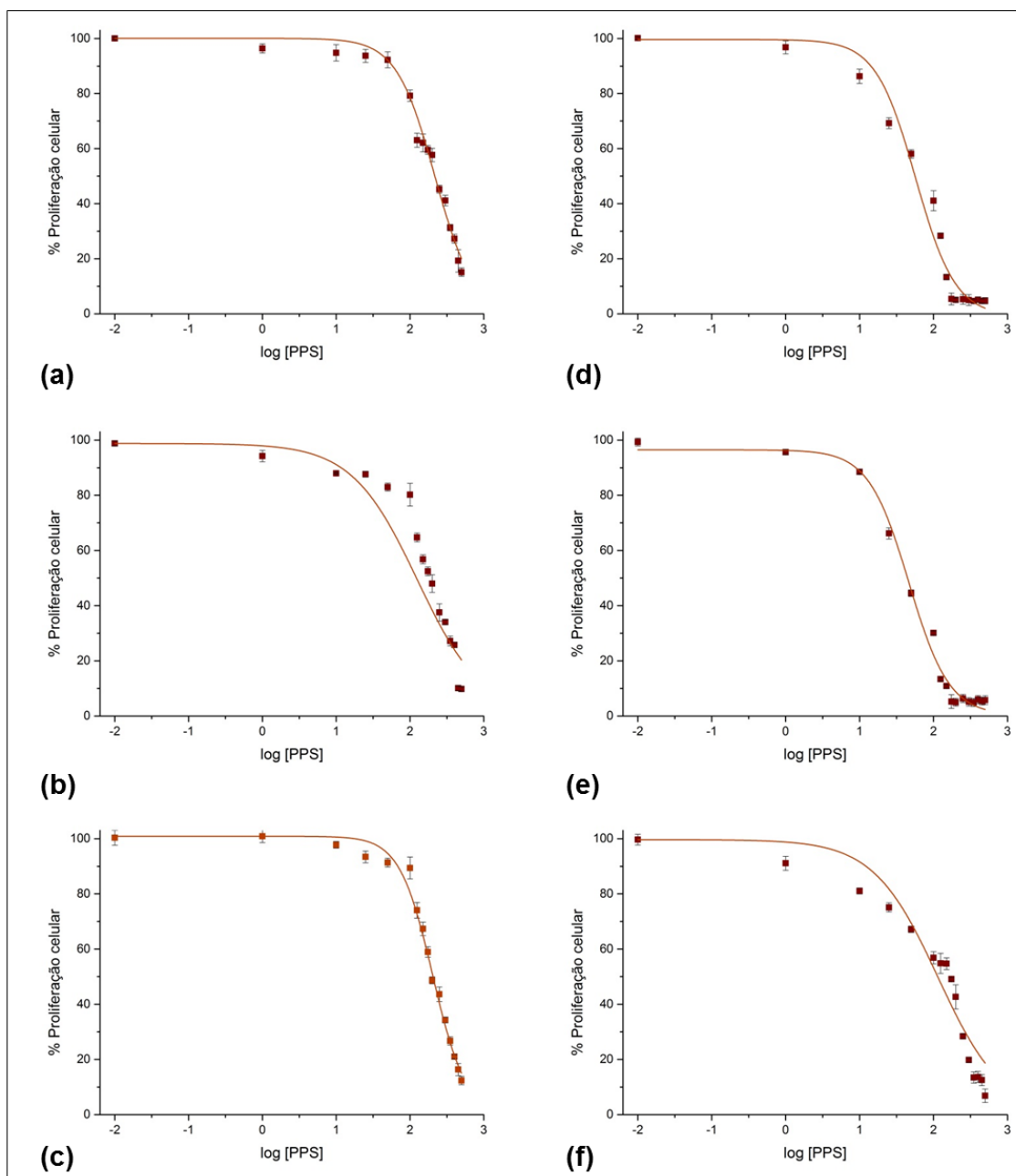


Figura E.2. Determinação dos valores de IC_{50} de potencial antiproliferativo, obtidos em ensaios de células humanas MDA-MB-231, para as amostras de extratos de compostos PPS obtidos de micélios das culturas de *A. ponderosa* das estirpes de Beja (a), Mértola (b) e S^{10} Aleixo R. (c) e extratos de compostos PPS obtidos de sobrenadantes das culturas das estirpes de Beja (d), Mértola (e) e S^{10} Aleixo R. (f). Os valores apresentados são a média \pm desvio-padrão de três ensaios independentes ($n = 3$) efetuados em triplicado.

Anexo F – Composição do meio salino e curva de dose resposta utilizados nos ensaios de toxicidade em *Artemia salina*

Tabela F.1. Composição do meio de sais, utilizado nos ensaios com *Artemia salina*.

| Meio salino | |
|--------------------------------------|---------------------------------|
| Reagentes | Quantidade (g L ⁻¹) |
| KCl | 0,84 |
| CaCl ₂ | 8,6 |
| MgSO ₄ 7H ₂ O | 5,58 |
| NaCl | 26,4 |
| NaHCO ₃ | 0,17 |
| Mg ₃ BO ₃ | 0,03 |
| MgCl ₂ .6H ₂ O | 4,6 |

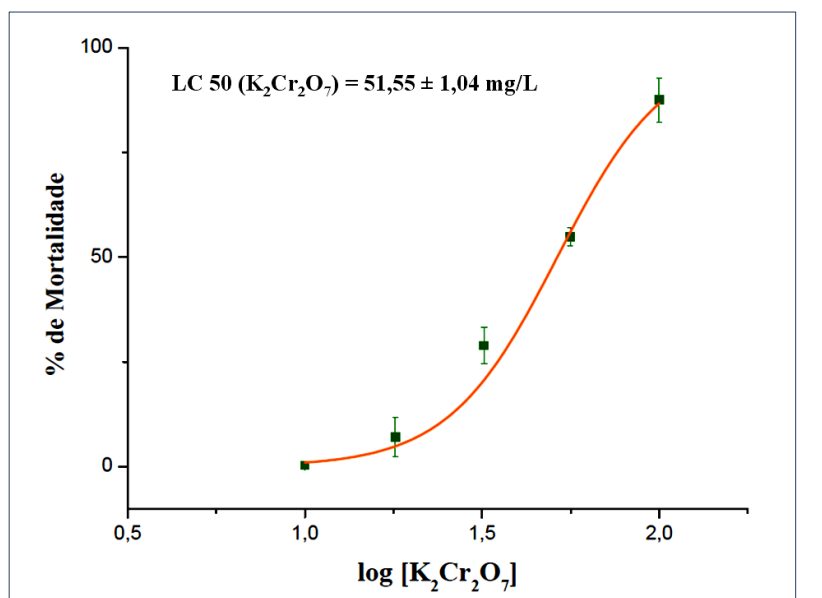


Figura F.1. Curva dose-resposta para o dicromato de potássio, com determinação do LC₅₀. Os valores apresentados são a média ± desvio-padrão de 3 réplicas.

Anexo G – Curvas de calibração padrão utilizadas para a caracterização dos extratos PPS

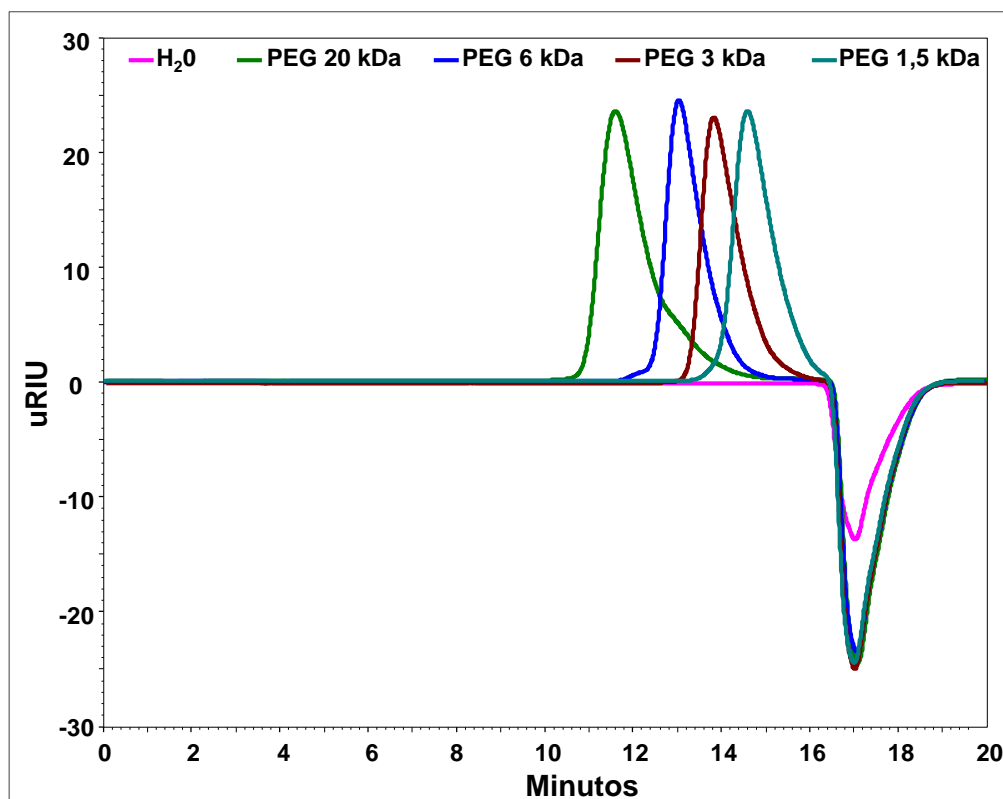


Figura G.1. Perfil cromatográfico de RI dos compostos polietilenoglicol (PEG) com massas moleculares de 20, 6, 3 e 1,5 kDa, por análise de exclusão molecular em sistema de HPLC.

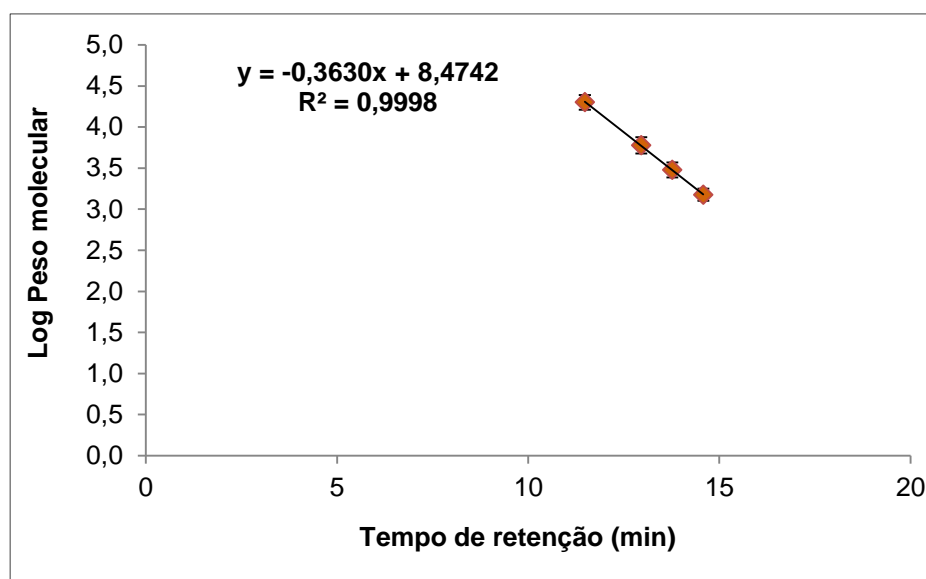


Figura G.2. Curva de calibração da coluna de SEC-UV-RI-HPLC, utilizando padrões de polietilenoglicol (PEG) com massas moleculares de 1,5, 3, 6 e 20 kDa. Os valores apresentados são a média \pm desvio-padrão de 3 réplicas.

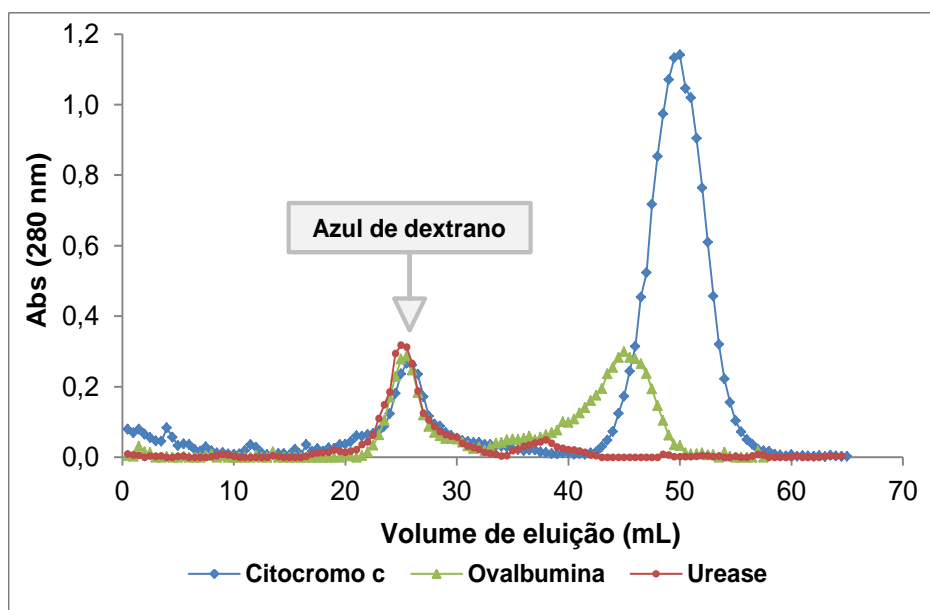


Figura G.3. Perfil cromatográfico dos compostos padrão por SEC, utilizando *Sephacryl* S-300 como fase estacionária.

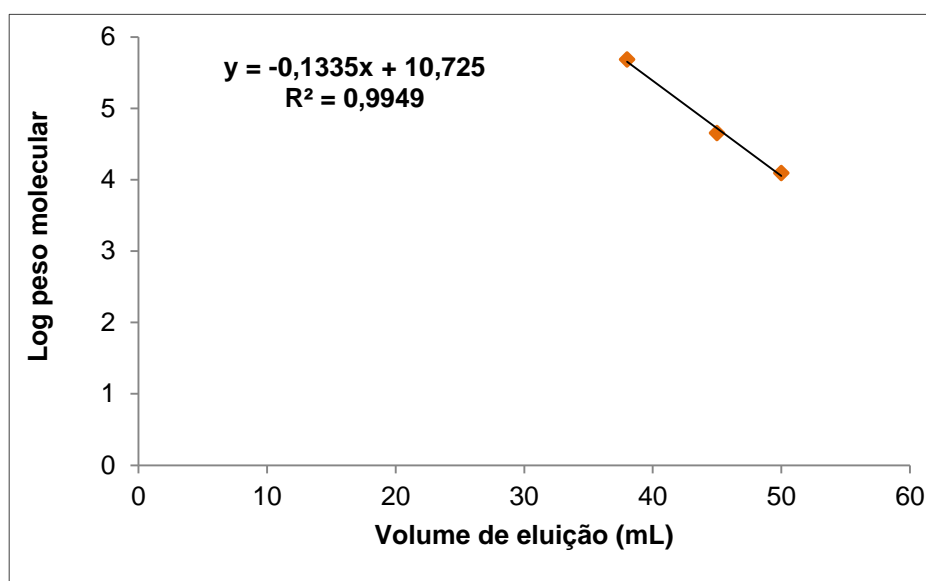


Figura G.4. Curva de calibração da coluna de SEC, utilizando *Sephacryl* S-300 como fase estacionária, para os padrões citocromo C, ovalbumina e urease com massas moleculares de 12, 46 e 400 kDa, respetivamente. Os valores apresentados são a média \pm desvio-padrão de 3 réplicas.

Anexo H – Registo da atividade dos anticorpos e curva de calibração para análise do reconhecimento dos compostos PPS

Tabela H.1. Registo dos valores de atividade dos quatro anticorpos testados obtidos no ensaio de *screening* de reconhecimento dos compostos PPS presentes nos diferentes extratos obtidos de corpos de frutificação e culturas de *A. ponderosa* das estirpes de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R.

| Extratos PPS | Estirpe | Atividade dos anticorpos (U mL ⁻¹) | | | | | | | |
|------------------------|---------------------------|--|-------|---------|-------|---------|-------|------------|-------|
| | | 2.58 | | 3H8-3H7 | | 1E6-1E8 | | 1E6-1E8-B3 | |
| | | IgM | IgG | IgM | IgG | IgM | IgG | IgM | IgG |
| Corpos de frutificação | Beja | 11,680 | 1,160 | 4,730 | 0,770 | 1,790 | 0,950 | 6,230 | 0,760 |
| | Mértola | 13,000 | 1,690 | 6,390 | 0,720 | 2,550 | 0,610 | 12,940 | 0,580 |
| | S ^{to} Aleixo R. | 14,860 | 1,900 | 10,490 | 0,740 | 3,200 | 0,890 | 16,950 | 0,710 |
| Micélios | Beja | 1,210 | 0,750 | 1,260 | 0,690 | 0,850 | 0,650 | 0,810 | 0,410 |
| | Mértola | 0,000 | 0,450 | 0,980 | 0,550 | 0,690 | 0,660 | 1,330 | 0,340 |
| | S ^{to} Aleixo R. | 20,830 | 2,450 | 12,510 | 0,690 | 4,310 | 0,640 | 23,800 | 0,450 |
| Sobrenadantes | Beja | 0,000 | 0,290 | 0,610 | 0,460 | 0,560 | 0,500 | 1,050 | 0,350 |
| | Mértola | 0,000 | 0,090 | 0,440 | 0,350 | 0,430 | 0,350 | 0,710 | 0,250 |
| | S ^{to} Aleixo R. | 0,000 | 0,080 | 0,120 | 0,220 | 0,210 | 0,170 | 0,200 | 0,170 |

Os valores destacados a claro e escuro indicam reconhecimento moderado e elevado dos anticorpos, respetivamente.

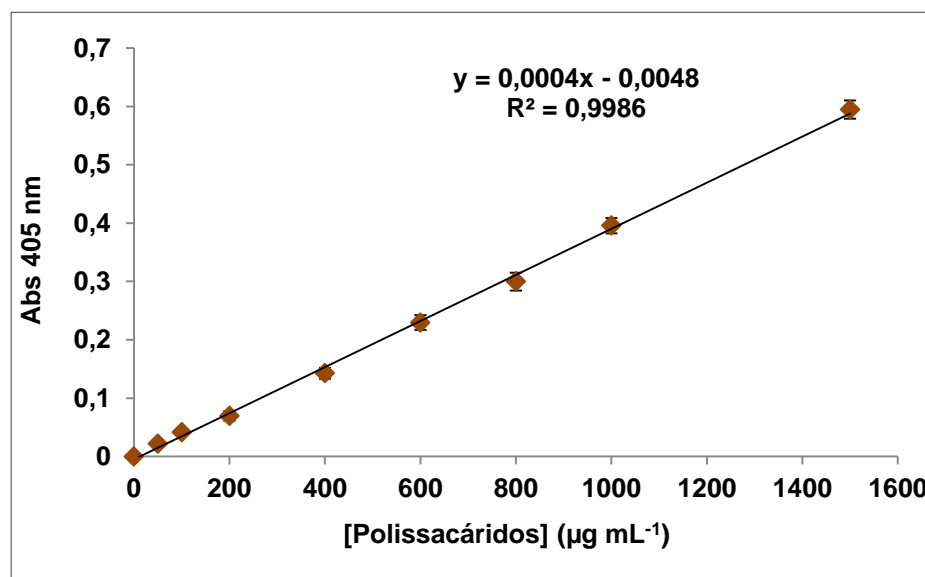


Figura H.1. Curva de calibração de reconhecimento de polissacáridos pelo anticorpo 1E6-1E8-B3, utilizando extratos de polissacáridos nas concentrações de 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 e 1500 µg mL⁻¹. Os valores apresentados são a média ± desvio-padrão de 3 réplicas.

Anexo I – Análise da produção de biomassa nas culturas de *A. ponderosa*

Tabela I.1. Registo dos valores médios das amostras de micélios e sobrenadantes liofilizados obtidos nas culturas líquidas de *A. ponderosa* de 500 mL ao fim de 15 dias de crescimento.

| Culturas de 500 mL | Estirpes | micélio liofilizado (g) | sobrenadante liofilizado (g) |
|---------------------|---------------------------|-------------------------|------------------------------|
| <i>A. ponderosa</i> | Beja | 5,760 ± 0,157 | 1,005 ± 0,089 |
| | Mértola | 7,456 ± 0,203 | 1,415 ± 0,117 |
| | S ^{to} Aleixo R. | 4,816 ± 0,120 | 1,040 ± 0,075 |

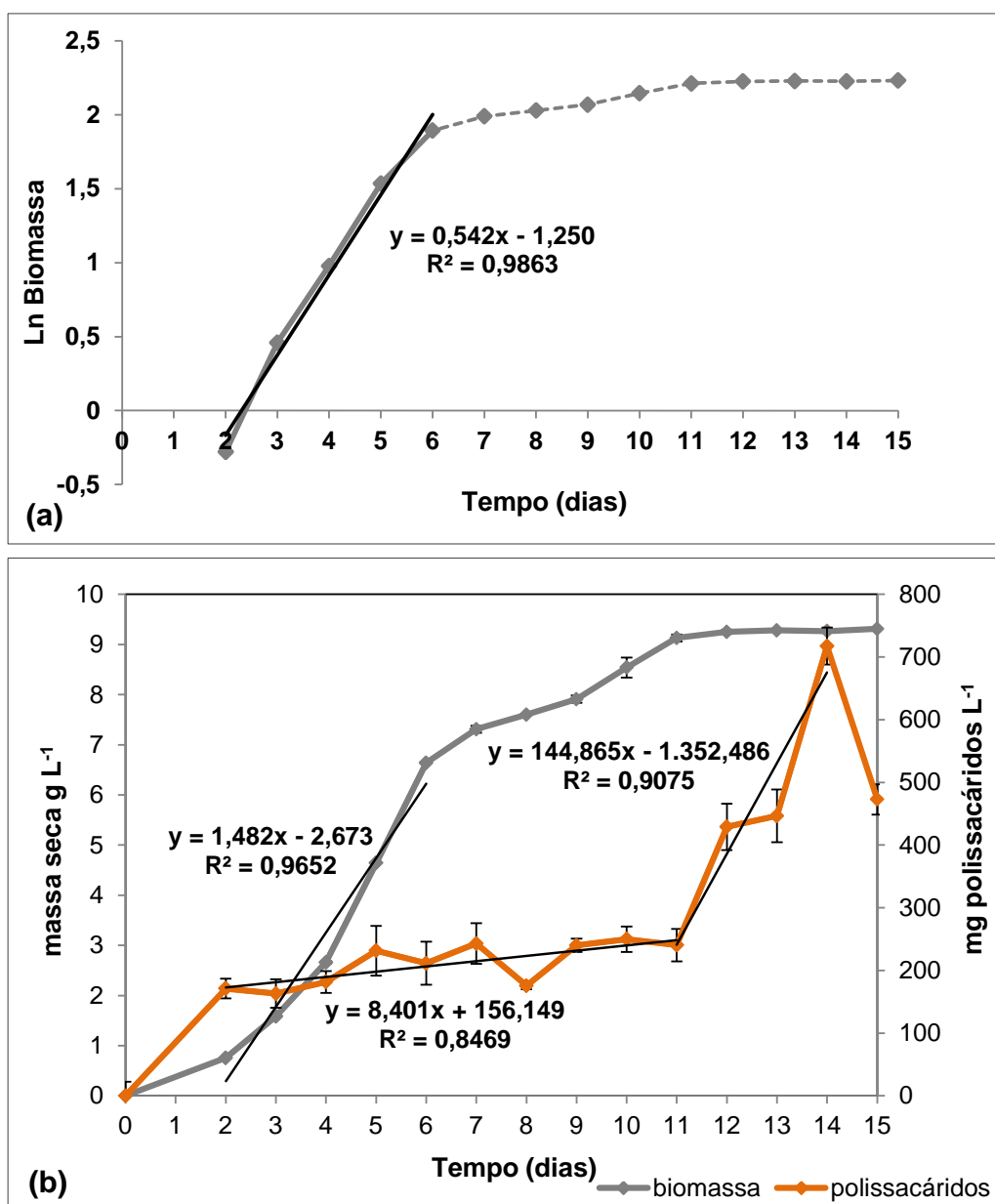


Figura I.1. Perfil de biomassa e concentração de PPS intracelulares nas culturas líquidas de *A. ponderosa* de S^{to} Aleixo R., com determinação da taxa específica de crescimento e produção de PPS. Os valores apresentados são a média ± desvio-padrão de 3 réplicas.

Anexo J – Análise estatística

J.I - Análise estatística referente à caracterização química e inorgânica dos corpos de frutificação de *A. ponderosa* e amostras de solos.

Tabela J.I.1. Análise de variância (ANOVA) dos conteúdos em água, matéria orgânica e minerais presentes nos corpos de frutificação das estirpes de *A. ponderosa* recolhidos nos diferentes locais.

| Conteúdo (%) | | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Média dos quadrados | Valor de F | Valor de p (Sig.) |
|------------------|-------------------|--------------------|--------------------|---------------------|------------|-------------------|
| Água | Entre grupos | 97,909 | 23 | 4,257 | 5,144 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 38,894 | 47 | 0,828 | | |
| | Total | 136,803 | 70 | | | |
| Matéria orgânica | Entre grupos | 93,860 | 23 | 4,081 | 5,192 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 36,942 | 47 | 0,786 | | |
| | Total | 130,802 | 70 | | | |
| Minerais | Entre grupos | 2,283 | 23 | 0,099 | 7,617 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 0,612 | 47 | 0,013 | | |
| | Total | 2,895 | 70 | | | |

Tabela J.I.2. Comparação múltipla de médias do conteúdo em água (a), matéria orgânica (b) e minerais (c), presente nos corpos de frutificação das estirpes de *A. ponderosa* dos diferentes locais, pelo teste de Tukey HSD.

| (a) Conteúdo em água (%) | Nível de significância $p < 0,05$ | | | | |
|------------------------------|-----------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| M. S. Domingos | 89,481 | | | | |
| V. N. S. Bento | 90,040 | 90,040 | | | |
| Évora | 90,171 | 90,171 | 90,171 | | |
| Rosal F. | 90,361 | 90,361 | 90,361 | 90,361 | |
| Evoramonte | 90,410 | 90,410 | 90,410 | 90,410 | |
| Her ^{de} Mitra | 90,469 | 90,469 | 90,469 | 90,469 | |
| Baleizão | 90,698 | 90,698 | 90,698 | 90,698 | |
| Beja | 90,973 | 90,973 | 90,973 | 90,973 | 90,973 |
| S ^{to} Aleixo R. | 91,105 | 91,105 | 91,105 | 91,105 | 91,105 |
| N. S ^{ra} Machede | 91,394 | 91,394 | 91,394 | 91,394 | 91,394 |
| N. S ^{ra} Guadalupe | 91,423 | 91,423 | 91,423 | 91,423 | 91,423 |
| M ^{te} Borralha | 91,526 | 91,526 | 91,526 | 91,526 | 91,526 |
| Cabeça Gorda | 91,647 | 91,647 | 91,647 | 91,647 | 91,647 |
| M ^{te} Novo | 91,737 | 91,737 | 91,737 | 91,737 | 91,737 |
| Cabezas Rubias | 91,824 | 91,824 | 91,824 | 91,824 | 91,824 |
| Valverde | 91,968 | 91,968 | 91,968 | 91,968 | 91,968 |
| Azaruja | | 92,450 | 92,450 | 92,450 | 92,450 |
| Montejuntos | | 92,721 | 92,721 | 92,721 | 92,721 |
| S. Miguel Machede | | 92,725 | 92,725 | 92,725 | 92,725 |
| V ^e Rocins | | | 93,002 | 93,002 | 93,002 |
| V. Fresno | | | | 93,086 | 93,086 |
| Mértola | | | | 93,160 | 93,160 |
| Almendres | | | | | 93,627 |
| Serpa | | | | | 93,769 |

(continua)

Tabela J:l.2. (continuação)

| (b) Conteúdo em matéria orgânica (%) | Nível de significância $p < 0,05$ | | | |
|--------------------------------------|-----------------------------------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Almendres | 5,758 | | | |
| Serpa | 5,775 | | | |
| Mértola | 6,031 | 6,031 | | |
| V ^e Rocins | 6,372 | 6,372 | 6,372 | |
| V. Fresno | 6,412 | 6,412 | 6,412 | |
| S. Miguel Machede | 6,541 | 6,541 | 6,541 | |
| Azaruja | 6,665 | 6,665 | 6,665 | |
| Montejuntos | 6,738 | 6,738 | 6,738 | |
| Cabezas Rubias | 6,800 | 6,800 | 6,800 | |
| Valverde | 7,125 | 7,125 | 7,125 | 7,125 |
| M ^{te} Novo | 7,577 | 7,577 | 7,577 | 7,577 |
| M ^{te} Borralha | 7,756 | 7,756 | 7,756 | 7,756 |
| Cabeça Gorda | 7,814 | 7,814 | 7,814 | 7,814 |
| N. S ^{ra} Guadalupe | 7,873 | 7,873 | 7,873 | 7,873 |
| N. S ^{ra} Machede | 7,954 | 7,954 | 7,954 | 7,954 |
| S ^{to} Aleixo R. | 8,128 | 8,128 | 8,128 | 8,128 |
| Beja | 8,414 | 8,414 | 8,414 | 8,414 |
| Baleizão | | 8,624 | 8,624 | 8,624 |
| Evoramonte | | 8,806 | 8,806 | 8,806 |
| Rosal F. | | 8,823 | 8,823 | 8,823 |
| Her ^{de} Mitra | | | 8,914 | 8,914 |
| V. N. S. Bento | | | 9,145 | 9,145 |
| Évora | | | 9,157 | 9,157 |
| M. S. Domingos | | | | 9,751 |

| (c) Conteúdo em minerais (%) | Nível de significância $p < 0,05$ | | | |
|------------------------------|-----------------------------------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Serpa | 0,456 | | | |
| V. Fresno | 0,503 | | | |
| Cabeça Gorda | 0,539 | 0,539 | | |
| Montejuntos | 0,541 | 0,541 | | |
| Almendres | 0,615 | 0,615 | 0,615 | |
| Beja | 0,616 | 0,616 | 0,616 | |
| Her ^{de} Mitra | 0,617 | 0,617 | 0,617 | |
| V ^e Rocins | 0,627 | 0,627 | 0,627 | |
| N. S ^{ra} Machede | 0,652 | 0,652 | 0,652 | |
| Évora | 0,672 | 0,672 | 0,672 | |
| Baleizão | 0,679 | 0,679 | 0,679 | |
| M ^{te} Novo | 0,685 | 0,685 | 0,685 | |
| N. S ^{ra} Guadalupe | 0,704 | 0,704 | 0,704 | |
| M ^{te} Borralha | 0,718 | 0,718 | 0,718 | |
| S. Miguel Machede | 0,734 | 0,734 | 0,734 | |
| S ^{to} Aleixo R. | 0,767 | 0,767 | 0,767 | |
| M. S. Domingos | 0,768 | 0,768 | 0,768 | |
| Evoramonte | 0,785 | 0,785 | 0,785 | |
| Mértola | 0,809 | 0,809 | 0,809 | |
| V. N. S. Bento | 0,815 | 0,815 | 0,815 | |
| Rosal F. | 0,817 | 0,817 | 0,817 | |
| Azaruja | | 0,886 | 0,886 | |
| Valverde | | | 0,907 | |
| Cabezas Rubias | | | | 1,378 |

Tabela J.I.3. Análise de variância (ANOVA) do conteúdo mineral presente nos corpos de frutificação das estirpes de *A. ponderosa* recolhidos dos diferentes locais.

| Conteúdo mineral | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Média dos quadrados | Valor de F | Valor de p (Sig.) | |
|------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------|---------------------|-------|
| Ag | Entre grupos | 167,855 | 23 | 7,298 | 11,504 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 30,452 | 48 | 0,634 | | |
| | Total | 198,307 | 71 | | | |
| Al | Entre grupos | 2882469,893 | 23 | 125324,778 | 18,086 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 332605,775 | 48 | 6929,287 | | |
| | Total | 3215075,668 | 71 | | | |
| Ba | Entre grupos | 23,885 | 23 | 1,038 | 11,268 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 4,424 | 48 | 0,092 | | |
| | Total | 28,309 | 71 | | | |
| Ca | Entre grupos | 27060827,222 | 23 | 1176557,705 | 74,784 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 755171,456 | 48 | 15732,739 | | |
| | Total | 27815998,678 | 71 | | | |
| Cd | Entre grupos | 36,465 | 23 | 1,585 | 26,569 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 2,864 | 48 | 0,060 | | |
| | Total | 39,329 | 71 | | | |
| Cr | Entre grupos | 37,855 | 23 | 1,646 | 26,097 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 3,027 | 48 | 0,063 | | |
| | Total | 40,882 | 71 | | | |
| Cu | Entre grupos | 1078037,406 | 23 | 46871,192 | 3,960 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 568106,284 | 48 | 11835,548 | | |
| | Total | 1646143,690 | 71 | | | |
| Fe | Entre grupos | 500837,212 | 23 | 21775,531 | 36,912 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 28316,887 | 48 | 589,935 | | |
| | Total | 529154,099 | 71 | | | |
| K | Entre grupos | 15336008209,101 | 23 | 666782965,613 | 8,482 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 3773571786,102 | 48 | 78616078,877 | | |
| | Total | 19109579995,203 | 71 | | | |
| Mg | Entre grupos | 4706903,978 | 23 | 204647,999 | 4,260 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 2306128,758 | 48 | 48044,349 | | |
| | Total | 7013032,736 | 71 | | | |
| Mn | Entre grupos | 49796,728 | 23 | 2165,075 | 10,550 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 9850,376 | 48 | 205,216 | | |
| | Total | 59647,104 | 71 | | | |
| Na | Entre grupos | 26535226,410 | 23 | 1153705,496 | 22,233 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 2490819,068 | 48 | 51892,064 | | |
| | Total | 29026045,478 | 71 | | | |
| P | Entre grupos | 2024678,246 | 23 | 88029,489 | 31,295 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 135020,172 | 48 | 2812,920 | | |
| | Total | 2159698,418 | 71 | | | |
| Pb | Entre grupos | 123,133 | 23 | 5,354 | 25,730 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 9,987 | 48 | 0,208 | | |
| | Total | 133,121 | 71 | | | |
| Zn | Entre grupos | 42759,062 | 23 | 1859,090 | 5,362 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 16641,220 | 48 | 346,692 | | |
| | Total | 59400,282 | 71 | | | |

Tabela J.I.4. Comparação múltipla de médias do conteúdo em minerais: Ag (a), Al (b), Ba (c), Ca (d), Cd (e), Cr (f), Cu (g), Fe (h), K (i), Mg (j), Mn (k), Na (l), P (m), Pb (n), Zn (o), presente nos corpos de frutificação das estirpes de *A. ponderosa* dos diferentes locais, pelo teste de Tukey HSD.

| (a) | Ag | Nível de significância $p < 0,05$ | | | | | |
|------------------------------|----|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| M ^{te} Novo | | 0,377 | | | | | |
| V. Fresno | | 0,426 | | | | | |
| V ^e Rocins | | 0,512 | | | | | |
| Valverde | | 0,560 | 0,560 | | | | |
| Mértola | | 0,568 | 0,568 | | | | |
| Beja | | 0,665 | 0,665 | | | | |
| Cabezas Rubias | | 1,036 | 1,036 | 1,036 | | | |
| S ^{to} Aleixo R. | | 1,140 | 1,140 | 1,140 | | | |
| V. N. S. Bento | | 1,245 | 1,245 | 1,245 | | | |
| Serpa | | 1,467 | 1,467 | 1,467 | | | |
| M. S. Domingos | | 1,486 | 1,486 | 1,486 | | | |
| Cabeça Gorda | | 1,487 | 1,487 | 1,487 | | | |
| Montejuntos | | 1,588 | 1,588 | 1,588 | | | |
| M ^{te} Borralha | | 1,689 | 1,689 | 1,689 | | | |
| Évora | | 1,815 | 1,815 | 1,815 | 1,815 | | |
| Her ^{de} Mitra | | 2,089 | 2,089 | 2,089 | 2,089 | | |
| Baleizão | | 2,463 | 2,463 | 2,463 | 2,463 | | |
| Almendres | | 2,590 | 2,590 | 2,590 | 2,590 | 2,590 | |
| N. S ^{ra} Machede | | 2,601 | 2,601 | 2,601 | 2,601 | 2,601 | |
| S. Miguel Machede | | | 3,043 | 3,043 | 3,043 | 3,043 | |
| Rosal F. | | | | 3,308 | 3,308 | 3,308 | |
| Evoramonte | | | | | 4,276 | 4,276 | 4,276 |
| N. S ^{ra} Guadalupe | | | | | | 5,047 | 5,047 |
| Azaruja | | | | | | | 6,602 |

| (b) | Al | Nível de significância $p < 0,05$ | | | | | | | |
|-------------------------------|----|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Azaruja | | 58 | | | | | | | |
| S ^{to} Aleixo R. | | 65 | | | | | | | |
| Cabeça Gorda | | 151 | 151 | | | | | | |
| V ^e Rocins | | 181 | 181 | 181 | | | | | |
| Valverde | | 183 | 183 | 183 | | | | | |
| Évora | | 208 | 208 | 208 | 208 | | | | |
| Her ^{de} da Borralha | | 209 | 209 | 209 | 209 | | | | |
| N. S ^{ra} Guadalupe | | 209 | 209 | 209 | 209 | | | | |
| M. S. Domingos | | 299 | 299 | 299 | 299 | 299 | | | |
| V. N. S. Bento | | 303 | 303 | 303 | 303 | 303 | | | |
| N. S ^{ra} Machede | | 313 | 313 | 313 | 313 | 313 | | | |
| Mértola | | | 333 | 333 | 333 | 333 | | | |
| Almendres | | | 349 | 349 | 349 | 349 | 349 | | |
| Baleizão | | | 357 | 357 | 357 | 357 | 357 | | |
| Her ^{de} Mitra | | | 373 | 373 | 373 | 373 | 373 | | |
| M ^{te} Novo | | | | 423 | 423 | 423 | 423 | 423 | |
| Evoramonte | | | | 423 | 423 | 423 | 423 | 423 | |
| Beja | | | | | 449 | 449 | 449 | 449 | |
| Serpa | | | | | 453 | 453 | 453 | 453 | |
| Montejuntos | | | | | | 545 | 545 | 545 | |
| V. Fresno | | | | | | | 602 | 602 | |
| S. Miguel Machede | | | | | | | 610 | 610 | |
| Rosal F. | | | | | | | | 659 | |
| Cabezas Rubias | | | | | | | | | 932 |

(continua)

Tabela J.I.4. (continuação).

| (c) | Ba | Nível de significância $p < 0,05$ | | | | | | |
|-----|------------------------------|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| | Her ^{de} Mitra | 0,324 | | | | | | |
| | M ^{ie} Borralha | 0,420 | 0,420 | | | | | |
| | Évora | 0,523 | 0,523 | | | | | |
| | M ^{ie} Novo | 0,554 | 0,554 | 0,554 | | | | |
| | Valverde | 0,572 | 0,572 | 0,572 | 0,572 | | | |
| | N. S ^{ra} Guadalupe | 0,626 | 0,626 | 0,626 | 0,626 | | | |
| | Baleizão | 0,741 | 0,741 | 0,741 | 0,741 | | | |
| | S ^{to} Aleixo R. | 0,837 | 0,837 | 0,837 | 0,837 | | | |
| | V ^e Rocins | 0,842 | 0,842 | 0,842 | 0,842 | | | |
| | Cabezas Rubias | 0,896 | 0,896 | 0,896 | 0,896 | | | |
| | Azaruja | 0,899 | 0,899 | 0,899 | 0,899 | | | |
| | Cabeça Gorda | 0,916 | 0,916 | 0,916 | 0,916 | | | |
| | M. S. Domingos | 1,047 | 1,047 | 1,047 | 1,047 | 1,047 | | |
| | V. N. S. Bento | 1,109 | 1,109 | 1,109 | 1,109 | 1,109 | | |
| | S. Miguel Machede | 1,138 | 1,138 | 1,138 | 1,138 | 1,138 | 1,138 | |
| | Beja | 1,210 | 1,210 | 1,210 | 1,210 | 1,210 | 1,210 | |
| | N. S ^{ra} Machede | 1,271 | 1,271 | 1,271 | 1,271 | 1,271 | 1,271 | |
| | Rosal F. | | 1,294 | 1,294 | 1,294 | 1,294 | 1,294 | |
| | Mértola | | 1,313 | 1,313 | 1,313 | 1,313 | 1,313 | |
| | Evoramonte | | | 1,500 | 1,500 | 1,500 | 1,500 | |
| | Montejuntos | | | | 1,516 | 1,516 | 1,516 | |
| | Serpa | | | | | 1,989 | 1,989 | 1,989 |
| | V. Fresno | | | | | | 2,093 | 2,093 |
| | Almendres | | | | | | | 2,873 |

| (d) | Ca | Nível de significância $p < 0,05$ | | |
|-----|------------------------------|-----------------------------------|-----|------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| | Azaruja | 139 | | |
| | S ^{to} Aleixo R. | 366 | 366 | |
| | Mértola | 370 | 370 | |
| | N. S ^{ra} Guadalupe | 408 | 408 | |
| | Montejuntos | 412 | 412 | |
| | M ^{ie} Novo | 436 | 436 | |
| | M ^{ie} Borralha | 448 | 448 | |
| | V ^e Rocins | 448 | 448 | |
| | V. Fresno | 459 | 459 | |
| | Valverde | 521 | 521 | |
| | Cabeça Gorda | | 554 | |
| | Her ^{de} Mitra | | 579 | |
| | M. S. Domingos | | 582 | |
| | Rosal F. | | 584 | |
| | V. N. S. Bento | | 599 | |
| | Évora | | 605 | |
| | Baleizão | | 606 | |
| | Beja | | 614 | |
| | N. S ^{ra} Machede | | 632 | |
| | S. Miguel Machede | | 649 | |
| | Serpa | | 698 | |
| | Evoramonte | | 733 | |
| | Almendres | | 757 | |
| | Cabezas Rubias | | | 3523 |

(continua)

Tabela J.I.4. (continuação).

| (e) | Cd | Nível de significância $p < 0,05$ | | | | | |
|------------------------------|----|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Azaruja | | 0,328 | | | | | |
| M ^{te} Borralha | | 0,416 | 0,416 | | | | |
| V ^e Rocins | | 0,425 | 0,425 | | | | |
| S ^{to} Aleixo R. | | 0,441 | 0,441 | | | | |
| Rosal F. | | 0,515 | 0,515 | | | | |
| Mértola | | 0,592 | 0,592 | 0,592 | | | |
| V. Fresno | | 0,676 | 0,676 | 0,676 | 0,676 | | |
| Her ^{de} Mitra | | 0,684 | 0,684 | 0,684 | 0,684 | | |
| V. N. S. Bento | | 0,692 | 0,692 | 0,692 | 0,692 | | |
| M ^{te} Novo | | 0,734 | 0,734 | 0,734 | 0,734 | | |
| S. Miguel Machede | | 0,774 | 0,774 | 0,774 | 0,774 | | |
| Serpa | | 0,816 | 0,816 | 0,816 | 0,816 | | |
| Baleizão | | 0,905 | 0,905 | 0,905 | 0,905 | | |
| Évora | | 0,971 | 0,971 | 0,971 | 0,971 | | |
| Beja | | 0,981 | 0,981 | 0,981 | 0,981 | | |
| Montejuntos | | 1,020 | 1,020 | 1,020 | 1,020 | | |
| Evoramonte | | 1,024 | 1,024 | 1,024 | 1,024 | | |
| N. S ^{ra} Guadalupe | | 1,067 | 1,067 | 1,067 | 1,067 | | |
| Cabeça Gorda | | | 1,097 | 1,097 | 1,097 | | |
| Cabezas Rubias | | | 1,145 | 1,145 | 1,145 | | |
| M. S. Domingos | | | | 1,306 | 1,306 | | |
| Valverde | | | | | 1,424 | | |
| Almendres | | | | | | 2,204 | |
| N. S ^{ra} Machede | | | | | | | 3,845 |

| (f) | Cr | Nível de significância $p < 0,05$ | | | | | |
|------------------------------|----|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| M ^{te} Novo | | 0,362 | | | | | |
| Baleizão | | 0,508 | 0,508 | | | | |
| Mértola | | 0,515 | 0,515 | | | | |
| M ^{te} Borralha | | 0,573 | 0,573 | 0,573 | | | |
| Azaruja | | 0,632 | 0,632 | 0,632 | | | |
| Valverde | | 0,684 | 0,684 | 0,684 | 0,684 | | |
| Her ^{de} Mitra | | 0,750 | 0,750 | 0,750 | 0,750 | | |
| S ^{to} Aleixo R. | | 0,835 | 0,835 | 0,835 | 0,835 | | |
| Cabeça Gorda | | 0,886 | 0,886 | 0,886 | 0,886 | | |
| V ^e Rocins | | 0,895 | 0,895 | 0,895 | 0,895 | | |
| Serpa | | 0,901 | 0,901 | 0,901 | 0,901 | | |
| V. N. S. Bento | | 0,925 | 0,925 | 0,925 | 0,925 | | |
| Evoramonte | | 0,936 | 0,936 | 0,936 | 0,936 | | |
| N. S ^{ra} Machede | | 0,944 | 0,944 | 0,944 | 0,944 | | |
| M. S. Domingos | | 1,021 | 1,021 | 1,021 | 1,021 | 1,021 | |
| N. S ^{ra} Guadalupe | | 1,022 | 1,022 | 1,022 | 1,022 | 1,022 | |
| Montejuntos | | | 1,204 | 1,204 | 1,204 | 1,204 | |
| Almendres | | | | 1,335 | 1,335 | 1,335 | |
| S. Miguel Machede | | | | | 1,450 | 1,450 | |
| Rosal F. | | | | | | 1,755 | |
| Beja | | | | | | 1,792 | |
| V. Fresno | | | | | | | 2,839 |
| Évora | | | | | | | 2,848 |
| Cabezas Rubias | | | | | | | 2,919 |

(continua)

Tabela J.I.4. (continuação).

| (g) | Cu | Nível de significância $p < 0,05$ | | |
|------------------------------|----|-----------------------------------|-----|-----|
| | | 1 | 2 | 3 |
| Azaruja | | 30 | | |
| Mértola | | 43 | 43 | |
| Valverde | | 62 | 62 | |
| Almendres | | 80 | 80 | |
| V ^e Rocins | | 84 | 84 | |
| V. Fresno | | 100 | 100 | |
| M ^{te} Novo | | 121 | 121 | |
| Evoramonte | | 123 | 123 | |
| S ^{to} Aleixo R. | | 129 | 129 | |
| Cabezas Rubias | | 140 | 140 | |
| Serpa | | 143 | 143 | |
| N. S ^{ra} Machede | | 148 | 148 | |
| Cabeça Gorda | | 161 | 161 | |
| Montejuntos | | 170 | 170 | |
| V. N. S. Bento | | 172 | 172 | |
| Her ^{de} Mitra | | 193 | 193 | |
| Évora | | 198 | 198 | |
| S. Miguel Machede | | 207 | 207 | |
| M ^{te} Borralha | | 232 | 232 | |
| N. S ^{ra} Guadalupe | | 264 | 264 | 264 |
| M. S. Domingos | | 334 | 334 | 334 |
| Baleizão | | 356 | 356 | 356 |
| Beja | | | 373 | 373 |
| Rosal F. | | | | 584 |

| (h) | Fe | Nível de significância $p < 0,05$ | | | | | | | |
|------------------------------|----|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Azaruja | | 18 | | | | | | | |
| Mértola | | 22 | | | | | | | |
| Baleizão | | 27 | | | | | | | |
| M ^{te} Novo | | 29 | | | | | | | |
| Her ^{de} Mitra | | 35 | 35 | | | | | | |
| V ^e Rocins | | 36 | 36 | | | | | | |
| Mte Borralha | | 41 | 41 | | | | | | |
| Serpa | | 43 | 43 | 43 | | | | | |
| N. S ^{ra} Machede | | 48 | 48 | 48 | | | | | |
| S ^{to} Aleixo R. | | 51 | 51 | 51 | | | | | |
| Cabeça Gorda | | 51 | 51 | 51 | | | | | |
| V. Fresno | | 52 | 52 | 52 | | | | | |
| Valverde | | 57 | 57 | 57 | | | | | |
| M. S. Domingos | | 62 | 62 | 62 | | | | | |
| Evoramonte | | 62 | 62 | 62 | | | | | |
| Montejuntos | | 62 | 62 | 62 | | | | | |
| Almendres | | 66 | 66 | 66 | | | | | |
| N. S ^{ra} Guadalupe | | | 109 | 109 | 109 | | | | |
| Rosal F. | | | | 119 | 119 | 119 | | | |
| V. N. S. Bento | | | | | 181 | 181 | 181 | | |
| Cabezas Rubias | | | | | | 193 | 193 | | |
| Beja | | | | | | | 227 | 227 | |
| Évora | | | | | | | | 292 | 292 |
| S. Miguel Machede | | | | | | | | | 311 |

(continua)

Tabela J.I.4. (continuação).

| (i) | K | Nível de significância $p < 0,05$ | | | | | |
|------------------------------|---|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Azaruja | | 4589 | | | | | |
| Beja | | 6090 | 6090 | | | | |
| V. N. S. Bento | | 6228 | 6228 | | | | |
| Mértola | | 18021 | 18021 | 18021 | | | |
| S ^{to} Aleixo R. | | 18586 | 18586 | 18586 | | | |
| V ^e Rocins | | 21788 | 21788 | 21788 | 21788 | | |
| N. S ^{ra} Machede | | 24717 | 24717 | 24717 | 24717 | 24717 | |
| Evoramonte | | 25148 | 25148 | 25148 | 25148 | 25148 | |
| V. Fresno | | 25712 | 25712 | 25712 | 25712 | 25712 | |
| Baleizão | | 25758 | 25758 | 25758 | 25758 | 25758 | |
| M ^{te} Novo | | 25763 | 25763 | 25763 | 25763 | 25763 | |
| M ^{te} Borralha | | 26099 | 26099 | 26099 | 26099 | 26099 | |
| Almendres | | 26677 | 26677 | 26677 | 26677 | 26677 | |
| Valverde | | 27256 | 27256 | 27256 | 27256 | 27256 | |
| Her ^{de} Mitra | | 31852 | 31852 | 31852 | 31852 | 31852 | |
| M. S. Domingos | | | 33607 | 33607 | 33607 | 33607 | |
| Évora | | | | 34630 | 34630 | 34630 | |
| N. S ^{ra} Guadalupe | | | | 34814 | 34814 | 34814 | |
| Cabeça Gorda | | | | 38652 | 38652 | 38652 | |
| Montejuntos | | | | 41285 | 41285 | 41285 | |
| S. Miguel Machede | | | | 45011 | 45011 | 45011 | 45011 |
| Serpa | | | | | 47715 | 47715 | 47715 |
| Rosal F. | | | | | | 51996 | 51996 |
| Cabezas Rubias | | | | | | | 69565 |

| (j) | Mg | Nível de significância $p < 0,05$ | | | |
|------------------------------|----|-----------------------------------|-----|------|------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Azaruja | | 194 | | | |
| V ^e Rocins | | 418 | 418 | | |
| S ^{to} Aleixo R. | | 481 | 481 | | |
| S. Miguel Machede | | 549 | 549 | | |
| M ^{te} Novo | | 562 | 562 | | |
| Valverde | | 586 | 586 | 586 | |
| V. N. S. Bento | | 657 | 657 | 657 | |
| Mértola | | 658 | 658 | 658 | |
| Her ^{de} Mitra | | 685 | 685 | 685 | |
| M ^{te} Borralha | | 696 | 696 | 696 | |
| Évora | | 713 | 713 | 713 | |
| Beja | | 734 | 734 | 734 | |
| Serpa | | 736 | 736 | 736 | |
| M. S. Domingos | | 737 | 737 | 737 | |
| V. Fresno | | 738 | 738 | 738 | |
| Montejuntos | | 742 | 742 | 742 | |
| Evoramonte | | 760 | 760 | 760 | |
| Almendres | | 774 | 774 | 774 | |
| N. S ^{ra} Machede | | 843 | 843 | 843 | |
| Cabeça Gorda | | 848 | 848 | 848 | |
| Baleizão | | 856 | 856 | 856 | 856 |
| N. S ^{ra} Guadalupe | | | 930 | 930 | 930 |
| Cabezas Rubias | | | | 1265 | 1265 |
| Rosal F. | | | | | 1540 |

(continua)

Tabela J.I.4. (continuação).

| (k) | Mn | Nível de significância $p < 0,05$ | | | | | | | |
|------------------------------|----|-----------------------------------|----|----|----|----|----|----|-----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Azaruja | | 5 | | | | | | | |
| V ^e Rocins | | 15 | 15 | | | | | | |
| Valverde | | 26 | 26 | 26 | | | | | |
| Almendres | | 28 | 28 | 28 | 28 | | | | |
| Mértola | | 29 | 29 | 29 | 29 | | | | |
| M ^{ie} Novo | | 34 | 34 | 34 | 34 | | | | |
| N. S ^{ra} Guadalupe | | 38 | 38 | 38 | 38 | 38 | | | |
| M ^{ie} Borralha | | 39 | 39 | 39 | 39 | 39 | 39 | | |
| V. Fresno | | 39 | 39 | 39 | 39 | 39 | 39 | | |
| S ^{to} Aleixo R. | | 47 | 47 | 47 | 47 | 47 | 47 | 47 | |
| Her ^{de} Mitra | | 47 | 47 | 47 | 47 | 47 | 47 | 47 | |
| Montejuntos | | 49 | 49 | 49 | 49 | 49 | 49 | 49 | |
| N. S ^{ra} Machede | | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | |
| Évora | | | 59 | 59 | 59 | 59 | 59 | 59 | 59 |
| Cabeça Gorda | | | | 66 | 66 | 66 | 66 | 66 | 66 |
| Serpa | | | | 69 | 69 | 69 | 69 | 69 | 69 |
| V. N. S. Bento | | | | | 72 | 72 | 72 | 72 | 72 |
| Evoramonte | | | | | | 79 | 79 | 79 | 79 |
| Cabezas Rubias | | | | | | | 81 | 81 | 81 |
| Beja | | | | | | | | 84 | 84 |
| Rosal F. | | | | | | | | | 90 |
| S. Miguel Machede | | | | | | | | | 91 |
| Baleizão | | | | | | | | | 91 |
| M. S. Domingos | | | | | | | | | 104 |

| (l) | Na | Nível de significância $p < 0,05$ | | | | | | | |
|------------------------------|----|-----------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Azaruja | | 216 | | | | | | | |
| M ^{ie} Borralha | | 368 | 368 | | | | | | |
| M ^{ie} Novo | | 379 | 379 | | | | | | |
| V ^e Rocins | | 419 | 419 | 419 | | | | | |
| Mértola | | 484 | 484 | 484 | 484 | | | | |
| N. S ^{ra} Guadalupe | | 551 | 551 | 551 | 551 | 551 | | | |
| Evoramonte | | 614 | 614 | 614 | 614 | 614 | | | |
| Cabeça Gorda | | 889 | 889 | 889 | 889 | 889 | 889 | | |
| Valverde | | 895 | 895 | 895 | 895 | 895 | 895 | | |
| S. Miguel Machede | | 897 | 897 | 897 | 897 | 897 | 897 | | |
| Her ^{de} Mitra | | 929 | 929 | 929 | 929 | 929 | 929 | | |
| Rosal F. | | | 964 | 964 | 964 | 964 | 964 | | |
| Serpa | | | 1078 | 1078 | 1078 | 1078 | 1078 | | |
| M. S. Domingos | | | | 1097 | 1097 | 1097 | 1097 | | |
| S ^{to} Aleixo R. | | | | 1098 | 1098 | 1098 | 1098 | | |
| Montejuntos | | | | | 1146 | 1146 | 1146 | | |
| Évora | | | | | | 1241 | 1241 | | |
| Almendres | | | | | | | 1408 | | |
| V. Fresno | | | | | | | | 1451 | |
| V. N. S. Bento | | | | | | | | | 1467 |
| Beja | | | | | | | | 1540 | 1540 |
| N. S ^{ra} Machede | | | | | | | | | 2185 |
| Baleizão | | | | | | | | | 2249 |
| Cabezas Rubias | | | | | | | | | 2645 |

(continua)

Tabela J.I.4. (continuação).

| (m) | P | Nível de significância $p < 0,05$ | | | | | | | | | | |
|------------------------------|---|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| S ^{to} Aleixo R. | | 34 | | | | | | | | | | |
| Azaruja | | 44 | 44 | | | | | | | | | |
| Mértola | | 61 | 61 | 61 | | | | | | | | |
| Cabezas Rubias | | 73 | 73 | 73 | | | | | | | | |
| M. S. Domingos | | 149 | 149 | 149 | 149 | | | | | | | |
| Valverde | | 152 | 152 | 152 | 152 | | | | | | | |
| V ^e Rocins | | 165 | 165 | 165 | 165 | 165 | | | | | | |
| V. N. S. Bento | | 197 | 197 | 197 | 197 | 197 | 197 | | | | | |
| Évora | | | 201 | 201 | 201 | 201 | 201 | | | | | |
| Beja | | | | 212 | 212 | 212 | 212 | | | | | |
| S. Miguel Machede | | | | | 270 | 270 | 270 | 270 | | | | |
| Her ^{de} Mitra | | | | | 277 | 277 | 277 | 277 | 277 | | | |
| V. Fresno | | | | | 310 | 310 | 310 | 310 | 310 | 310 | | |
| M ^{ie} Novo | | | | | 316 | 316 | 316 | 316 | 316 | 316 | 316 | |
| Almendres | | | | | | 319 | 319 | 319 | 319 | 319 | 319 | |
| N. S ^{ra} Guadalupe | | | | | | | 344 | 344 | 344 | 344 | | |
| M ^{ie} Borralha | | | | | | | | 417 | 417 | 417 | 417 | |
| Montejuntos | | | | | | | | | 442 | 442 | 442 | |
| Cabeça Gorda | | | | | | | | | | 447 | 447 | |
| Serpa | | | | | | | | | | | 460 | 460 |
| Evoramonte | | | | | | | | | | | | 468 |
| Baleizão | | | | | | | | | | | | 525 |
| N. S ^{ra} Machede | | | | | | | | | | | | 542 |
| Rosal F. | | | | | | | | | | | | 641 |

| (n) | Pb | Nível de significância $p < 0,05$ | | | | | | | | |
|------------------------------|----|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| M ^{ie} Novo | | 0,398 | | | | | | | | |
| Azaruja | | 0,416 | | | | | | | | |
| Almendres | | 0,649 | 0,649 | | | | | | | |
| M ^{ie} Borralha | | 1,021 | 1,021 | 1,021 | | | | | | |
| N. S ^{ra} Machede | | 1,367 | 1,367 | 1,367 | | | | | | |
| Beja | | 1,399 | 1,399 | 1,399 | 1,399 | | | | | |
| V. Fresno | | 1,616 | 1,616 | 1,616 | 1,616 | 1,616 | | | | |
| Mértola | | 1,617 | 1,617 | 1,617 | 1,617 | 1,617 | | | | |
| N. S ^{ra} Guadalupe | | 1,731 | 1,731 | 1,731 | 1,731 | 1,731 | 1,731 | | | |
| Her ^{de} Mitra | | | 1,852 | 1,852 | 1,852 | 1,852 | 1,852 | | | |
| V ^e Rocins | | | 1,884 | 1,884 | 1,884 | 1,884 | 1,884 | | | |
| Baleizão | | | | 2,139 | 2,139 | 2,139 | 2,139 | | | |
| Cabeça Gorda | | | | 2,206 | 2,206 | 2,206 | 2,206 | | | |
| Rosal F. | | | | 2,320 | 2,320 | 2,320 | 2,320 | 2,320 | | |
| S ^{to} Aleixo R. | | | | | 2,827 | 2,827 | 2,827 | 2,827 | 2,827 | |
| M. S. Domingos | | | | | | 3,004 | 3,004 | 3,004 | 3,004 | |
| Montejuntos | | | | | | 3,038 | 3,038 | 3,038 | 3,038 | |
| S. Miguel Machede | | | | | | | 3,113 | 3,113 | 3,113 | |
| Valverde | | | | | | | 3,122 | 3,122 | 3,122 | |
| Evoramonte | | | | | | | | 3,709 | 3,709 | 3,709 |
| V. N. S. Bento | | | | | | | | | 3,938 | 3,938 |
| Cabezas Rubias | | | | | | | | | | 4,172 |
| Serpa | | | | | | | | | | 5,071 |
| Évora | | | | | | | | | | 5,115 |

(continua)

Tabela J.I.4. (continuação).

| (o) | Zn | Nível de significância $p < 0,05$ | | | | |
|-----|------------------------------|-----------------------------------|----|----|-----|-----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| | Azaruja | 16 | | | | |
| | V ^e Rocins | 30 | 30 | | | |
| | Valverde | 42 | 42 | 42 | | |
| | S ^{to} Aleixo R. | 47 | 47 | 47 | 47 | |
| | M ^{te} Novo | 51 | 51 | 51 | 51 | |
| | Mértola | 51 | 51 | 51 | 51 | |
| | S. Miguel Machede | 58 | 58 | 58 | 58 | |
| | Almendres | 59 | 59 | 59 | 59 | |
| | Evoramonte | 59 | 59 | 59 | 59 | |
| | Montejuntos | 60 | 60 | 60 | 60 | |
| | Serpa | 61 | 61 | 61 | 61 | |
| | Her ^{de} Mitra | 61 | 61 | 61 | 61 | |
| | M ^{te} Borralha | 62 | 62 | 62 | 62 | |
| | N. S ^{ra} Guadalupe | 63 | 63 | 63 | 63 | |
| | V. Fresno | 68 | 68 | 68 | 68 | |
| | N. S ^{ra} Machede | 70 | 70 | 70 | 70 | |
| | Évora | | 75 | 75 | 75 | 75 |
| | Cabeça Gorda | | 81 | 81 | 81 | 81 |
| | V. N. S. Bento | | 86 | 86 | 86 | 86 |
| | M. S. Domingos | | | 91 | 91 | 91 |
| | Rosal F. | | | 95 | 95 | 95 |
| | Baleizão | | | 97 | 97 | 97 |
| | Beja | | | | 104 | 104 |
| | Cabezas Rubias | | | | | 132 |

Tabela J.I.5. Análise de variância (ANOVA) do conteúdo mineral presente nas amostras de solo correspondentes aos locais de recolha das diferentes estirpes de *A. ponderosa*.

| Conteúdo mineral | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Média dos quadrados | Valor de F | Valor de p (Sig.) |
|------------------|--------------------|--------------------|---------------------|------------|-------------------|
| Ag | Entre grupos | 23 | 0,014 | 25,581 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 48 | 0,001 | | |
| | Total | 71 | | | |
| Al | Entre grupos | 23 | 72122,184 | 581,295 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 48 | 124,072 | | |
| | Total | 71 | | | |
| Ba | Entre grupos | 23 | 11,618 | 64,064 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 48 | 0,181 | | |
| | Total | 71 | | | |
| Ca | Entre grupos | 23 | 12017,017 | 47,925 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 48 | 250,748 | | |
| | Total | 71 | | | |
| Cd | Entre grupos | 23 | 0,020 | 16,108 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 48 | 0,001 | | |
| | Total | 71 | | | |
| Cr | Entre grupos | 23 | 7,514 | 43,369 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 48 | 0,173 | | |
| | Total | 71 | | | |
| Cu | Entre grupos | 23 | 24,514 | 294,599 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 48 | 0,083 | | |
| | Total | 71 | | | |
| Fe | Entre grupos | 23 | 10489962,683 | 376,131 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 48 | 27889,132 | | |
| | Total | 71 | | | |
| K | Entre grupos | 23 | 224124,290 | 440,804 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 48 | 508,444 | | |
| | Total | 71 | | | |
| Mg | Entre grupos | 23 | 263192,882 | 291,647 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 48 | 902,437 | | |
| | Total | 71 | | | |
| Mn | Entre grupos | 23 | 427997,468 | 149,572 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 48 | 2861,488 | | |
| | Total | 71 | | | |
| Na | Entre grupos | 23 | 1684,993 | 156,404 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 48 | 10,773 | | |
| | Total | 71 | | | |
| P | Entre grupos | 23 | 8350,542 | 323,312 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 48 | 25,828 | | |
| | Total | 71 | | | |
| Pb | Entre grupos | 23 | 47,966 | 34,956 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 48 | 1,372 | | |
| | Total | 71 | | | |
| Zn | Entre grupos | 23 | 124,915 | 583,604 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 48 | 0,214 | | |
| | Total | 71 | | | |

Tabela J.I.6. Comparação múltipla de médias do conteúdo em minerais: Ag (a), Al (b), Ba (c), Ca (d), Cd (e), Cr (f), Cu (g), Fe (h), K (i), Mg (j), Mn (k), Na (l), P (m), Pb (n), Zn (o), presente nas amostras de solo dos diferentes locais, pelo teste de *Tukey HSD*.

| (a) | Ag | Nível de significância $p < 0,05$ | | | | | | | | | |
|------------------------------|-------|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| Almendres | 0,070 | | | | | | | | | | |
| Mértola | 0,074 | 0,074 | | | | | | | | | |
| M ^{te} Novo | 0,086 | 0,086 | 0,086 | | | | | | | | |
| Azaruja | 0,087 | 0,087 | 0,087 | 0,087 | | | | | | | |
| Baleizão | 0,087 | 0,087 | 0,087 | 0,087 | | | | | | | |
| V ^e Rocins | 0,093 | 0,093 | 0,093 | 0,093 | 0,093 | | | | | | |
| V. Fresno | 0,100 | 0,100 | 0,100 | 0,100 | 0,100 | | | | | | |
| V. N. S. Bento | 0,112 | 0,112 | 0,112 | 0,112 | 0,112 | 0,112 | | | | | |
| Beja | 0,138 | 0,138 | 0,138 | 0,138 | 0,138 | 0,138 | 0,138 | | | | |
| Evoramonte | 0,141 | 0,141 | 0,141 | 0,141 | 0,141 | 0,141 | 0,141 | | | | |
| Cabeça Gorda | | 0,145 | 0,145 | 0,145 | 0,145 | 0,145 | 0,145 | | | | |
| N. S ^{ra} Guadalupe | | 0,147 | 0,147 | 0,147 | 0,147 | 0,147 | 0,147 | 0,147 | | | |
| Cabezas Rubias | | | 0,151 | 0,151 | 0,151 | 0,151 | 0,151 | 0,151 | | | |
| Rosal F. | | | 0,154 | 0,154 | 0,154 | 0,154 | 0,154 | 0,154 | | | |
| Valverde | | | 0,154 | 0,154 | 0,154 | 0,154 | 0,154 | 0,154 | | | |
| M ^{te} Borralha | | | | 0,161 | 0,161 | 0,161 | 0,161 | 0,161 | | | |
| S. Miguel Machede | | | | | 0,162 | 0,162 | 0,162 | 0,162 | | | |
| Her ^{de} Mitra | | | | | 0,165 | 0,165 | 0,165 | 0,165 | | | |
| S ^{to} Aleixo R. | | | | | 0,167 | 0,167 | 0,167 | 0,167 | | | |
| Serpa | | | | | | 0,183 | 0,183 | 0,183 | | | |
| Évora | | | | | | | 0,219 | 0,219 | 0,219 | | |
| Montejuntos | | | | | | | | 0,237 | 0,237 | | |
| M. S. Domingos | | | | | | | | | 0,266 | | |
| N. S ^{ra} Machede | | | | | | | | | | 0,373 | |

| (b) | Al | Nível de significância $p < 0,05$ | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|-----|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| M ^{te} Borralha | 157 | | | | | | | | | | | | |
| M. S. Domingos | 159 | | | | | | | | | | | | |
| Her ^{de} Mitra | 160 | | | | | | | | | | | | |
| Cabeça Gorda | | 195 | | | | | | | | | | | |
| N. S ^{ra} Guadalupe | | 200 | | | | | | | | | | | |
| Azaruja | | | 243 | | | | | | | | | | |
| Beja | | | 254 | | | | | | | | | | |
| Almendres | | | 277 | 277 | | | | | | | | | |
| M ^{te} Novo | | | | 300 | | | | | | | | | |
| Evoramonte | | | | 311 | | | | | | | | | |
| Évora | | | | | 368 | | | | | | | | |
| Cabezas Rubias | | | | | 375 | 375 | | | | | | | |
| S ^{to} Aleixo R. | | | | | 378 | 378 | | | | | | | |
| Rosal F. | | | | | 381 | 381 | | | | | | | |
| V ^e Rocins | | | | | 391 | 391 | 391 | | | | | | |
| Baleizão | | | | | 397 | 397 | 397 | | | | | | |
| V. N. S. Bento | | | | | | 409 | 409 | | | | | | |
| Mértola | | | | | | | 417 | 417 | | | | | |
| S. Miguel Machede | | | | | | | | 449 | 449 | | | | |
| Valverde | | | | | | | | | 453 | | | | |
| V. Fresno | | | | | | | | | | 494 | | | |
| Serpa | | | | | | | | | | 497 | | | |
| N. S ^{ra} Machede | | | | | | | | | | | 632 | | |
| Montejuntos | | | | | | | | | | | | 813 | |

(continua)

Tabela J.I.6. (continuação).

| (c) | Ba | Nível de significância $p < 0,05$ | | | | | | | | | |
|-----|------------------------------|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| | Azaruja | 1,579 | | | | | | | | | |
| | Valverde | 1,688 | 1,688 | | | | | | | | |
| | M. S. Domingos | 1,870 | 1,870 | | | | | | | | |
| | Almendres | 1,991 | 1,991 | | | | | | | | |
| | Her ^{de} Mitra | 2,259 | 2,259 | 2,259 | | | | | | | |
| | M ^{ie} Borralha | 2,319 | 2,319 | 2,319 | 2,319 | | | | | | |
| | Cabeça Gorda | 2,344 | 2,344 | 2,344 | 2,344 | | | | | | |
| | Rosal F. | 2,344 | 2,344 | 2,344 | 2,344 | | | | | | |
| | Serpa | 2,380 | 2,380 | 2,380 | 2,380 | | | | | | |
| | N. S ^{ra} Guadalupe | 2,404 | 2,404 | 2,404 | 2,404 | | | | | | |
| | Cabezas Rubias | 2,587 | 2,587 | 2,587 | 2,587 | | | | | | |
| | Beja | 2,635 | 2,635 | 2,635 | 2,635 | | | | | | |
| | Evoramonte | 2,806 | 2,806 | 2,806 | 2,806 | 2,806 | | | | | |
| | S ^{to} Aleixo R. | 2,829 | 2,829 | 2,829 | 2,829 | 2,829 | | | | | |
| | Mértola | | 3,012 | 3,012 | 3,012 | 3,012 | 3,012 | | | | |
| | M ^{ie} Novo | | | 3,364 | 3,364 | 3,364 | 3,364 | 3,364 | | | |
| | S. Miguel Machede | | | 3,364 | 3,364 | 3,364 | 3,364 | 3,364 | | | |
| | Montejuntos | | | | 3,607 | 3,607 | 3,607 | 3,607 | 3,607 | | |
| | N. S ^{ra} Machede | | | | | 4,033 | 4,033 | 4,033 | 4,033 | 4,033 | |
| | Évora | | | | | | 4,287 | 4,287 | 4,287 | 4,287 | |
| | V. N. S. Bento | | | | | | | 4,494 | 4,494 | 4,494 | |
| | V ^e Rocins | | | | | | | | 4,761 | 4,761 | |
| | Baleizão | | | | | | | | | 5,247 | |
| | V. Fresno | | | | | | | | | | 11,285 |

| (d) | Ca | Nível de significância $p < 0,05$ | | | | | | |
|-----|------------------------------|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| | M. S. Domingos | 70 | | | | | | |
| | S. Miguel Machede | 79 | | | | | | |
| | Rosal F. | 83 | | | | | | |
| | Évora | 91 | | | | | | |
| | Valverde | 93 | | | | | | |
| | Evoramonte | 102 | 102 | | | | | |
| | Azaruja | 102 | 102 | | | | | |
| | Almendres | 106 | 106 | | | | | |
| | Cabeça Gorda | 108 | 108 | | | | | |
| | Her ^{de} Mitra | 112 | 112 | 112 | | | | |
| | V ^e Rocins | 113 | 113 | 113 | | | | |
| | Cabezas Rubias | 118 | 118 | 118 | | | | |
| | S ^{to} Aleixo R. | 119 | 119 | 119 | | | | |
| | N. S ^{ra} Machede | | 143 | 143 | 143 | | | |
| | Mértola | | 143 | 143 | 143 | | | |
| | M ^{ie} Novo | | 148 | 148 | 148 | | | |
| | N. S ^{ra} Guadalupe | | 148 | 148 | 148 | | | |
| | M ^{ie} Borralha | | | 159 | 159 | | | |
| | Baleizão | | | 161 | 161 | | | |
| | Beja | | | | 189 | 189 | | |
| | Montejuntos | | | | | 224 | 224 | |
| | V. N. S. Bento | | | | | 233 | 233 | |
| | V. Fresno | | | | | | 240 | |
| | Serpa | | | | | | | 338 |

(continua)

Tabela J.I.6. (continuação).

| (e) | Cd | Nível de significância $p < 0,05$ | | | | | |
|------------------------------|----|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Beja | | 0,034 | | | | | |
| Serpa | | 0,034 | | | | | |
| M ^{ie} Borralha | | 0,085 | 0,085 | | | | |
| N. S ^{ra} Machede | | 0,089 | 0,089 | | | | |
| Her ^{de} Mitra | | 0,092 | 0,092 | | | | |
| S. Miguel Machede | | 0,097 | 0,097 | | | | |
| Évora | | 0,102 | 0,102 | | | | |
| Cabezas Rubias | | 0,111 | 0,111 | | | | |
| M. S. Domingos | | 0,113 | 0,113 | | | | |
| Rosal F. | | 0,120 | 0,120 | | | | |
| Montejuntos | | 0,127 | 0,127 | | | | |
| Evoramonte | | 0,128 | 0,128 | | | | |
| Mértola | | 0,133 | 0,133 | | | | |
| Baleizão | | | 0,153 | | | | |
| V ^e Rocins | | | 0,166 | 0,166 | | | |
| Cabeça Gorda | | | 0,171 | 0,171 | 0,171 | | |
| N. S ^{ra} Guadalupe | | | 0,175 | 0,175 | 0,175 | | |
| Valverde | | | 0,176 | 0,176 | 0,176 | 0,176 | |
| M ^{ie} Novo | | | 0,182 | 0,182 | 0,182 | 0,182 | |
| S ^{to} Aleixo R. | | | | 0,271 | 0,271 | 0,271 | 0,271 |
| V. Fresno | | | | | 0,276 | 0,276 | 0,276 |
| V. N. S. Bento | | | | | 0,278 | 0,278 | 0,278 |
| Almendres | | | | | | 0,286 | 0,286 |
| Azaruja | | | | | | | 0,337 |

| (f) | Cr | Nível de significância $p < 0,05$ | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|-------|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| Azaruja | 0,932 | | | | | | | | | | | | |
| Almendres | 1,002 | | | | | | | | | | | | |
| Valverde | 1,204 | 1,204 | | | | | | | | | | | |
| V. N. S. Bento | 1,813 | 1,813 | 1,813 | | | | | | | | | | |
| S. Miguel M. | | 2,313 | 2,313 | | | | | | | | | | |
| Baleizão | | 2,424 | 2,424 | 2,424 | | | | | | | | | |
| V ^e Rocins | | 2,455 | 2,455 | 2,455 | 2,455 | | | | | | | | |
| Evoramonte | | | 2,556 | 2,556 | 2,556 | 2,556 | | | | | | | |
| M ^{ie} Novo | | | 2,576 | 2,576 | 2,576 | 2,576 | | | | | | | |
| S ^{to} Aleixo R. | | | 2,767 | 2,767 | 2,767 | 2,767 | | | | | | | |
| Évora | | | 2,818 | 2,818 | 2,818 | 2,818 | | | | | | | |
| Rosal F. | | | 2,879 | 2,879 | 2,879 | 2,879 | | | | | | | |
| Mértola | | | 2,949 | 2,949 | 2,949 | 2,949 | 2,949 | | | | | | |
| Cabezas Rubias | | | 3,050 | 3,050 | 3,050 | 3,050 | 3,050 | 3,050 | | | | | |
| M ^{ie} Borralha | | | | 3,696 | 3,696 | 3,696 | 3,696 | 3,696 | 3,696 | | | | |
| N. S ^{ra} Machede | | | | | 3,754 | 3,754 | 3,754 | 3,754 | 3,754 | 3,754 | | | |
| Her ^{de} Mitra | | | | | | 3,766 | 3,766 | 3,766 | 3,766 | 3,766 | | | |
| Cabeça Gorda | | | | | | | 4,230 | 4,230 | 4,230 | 4,230 | | | |
| N. S ^{ra} Guadalupe | | | | | | | | 4,280 | 4,280 | 4,280 | | | |
| Beja | | | | | | | | | 4,391 | 4,391 | | | |
| V. Fresno | | | | | | | | | 4,855 | 4,855 | 4,855 | | |
| M. S. Domingos | | | | | | | | | | 5,057 | 5,057 | | |
| Montejuntos | | | | | | | | | | | 5,728 | | |
| Serpa | | | | | | | | | | | | 7,851 | |

(continua)

Tabela J.I.6. (continuação).

| (g) Cu | Nível de significância $p < 0,05$ | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
| Almendres | 0,645 | | | | | | | | | | | | |
| Cabeça Gorda | 0,645 | | | | | | | | | | | | |
| Valverde | 0,788 | 0,788 | | | | | | | | | | | |
| Évora | | 1,648 | 1,648 | | | | | | | | | | |
| Azaruja | | | 1,935 | | | | | | | | | | |
| M ^{te} Borralha | | | 1,935 | | | | | | | | | | |
| Evoramonte | | | 2,366 | 2,366 | | | | | | | | | |
| M ^{te} Novo | | | 2,509 | 2,509 | | | | | | | | | |
| M. S. Domingos | | | | 2,939 | 2,939 | | | | | | | | |
| N. S ^{ra} Machede | | | | | 3,752 | 3,752 | | | | | | | |
| Mértola | | | | | | 4,659 | 4,659 | | | | | | |
| Serpa | | | | | | 4,659 | 4,659 | | | | | | |
| Cabezas Rubias | | | | | | | 5,089 | | | | | | |
| S. Miguel Machede | | | | | | | 5,376 | 5,376 | | | | | |
| S ^{to} Aleixo R. | | | | | | | 5,519 | 5,519 | 5,519 | | | | |
| V. N. S. Bento | | | | | | | | 6,093 | 6,093 | 6,093 | | | |
| V. Fresno | | | | | | | | | 6,380 | 6,380 | | | |
| Montejuntos | | | | | | | | | | 6,783 | 6,783 | | |
| Baleizão | | | | | | | | | | | 7,384 | | |
| N. S ^{ra} Guadalupe | | | | | | | | | | | | 8,387 | |
| Rosal F. | | | | | | | | | | | | 8,530 | |
| V ^e Rocins | | | | | | | | | | | | 8,530 | |
| Beja | | | | | | | | | | | | 8,674 | |
| Her ^{de} Mitra | | | | | | | | | | | | | 9,677 |

| (h) Fe | Nível de significância $p < 0,05$ | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|-----------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
| Valverde | 1440 | | | | | | | | | | | | |
| Almendres | 1547 | | | | | | | | | | | | |
| Évora | 1653 | | | | | | | | | | | | |
| M ^{te} Novo | 1653 | | | | | | | | | | | | |
| Azaruja | | 2240 | | | | | | | | | | | |
| V. Fresno | | 2347 | 2347 | | | | | | | | | | |
| Evoramonte | | 2400 | 2400 | | | | | | | | | | |
| S. Miguel Machede | | | 2827 | 2827 | | | | | | | | | |
| V ^e Rocins | | | | 3040 | 3040 | | | | | | | | |
| Baleizão | | | | 3093 | 3093 | 3093 | | | | | | | |
| S ^{to} Aleixo R. | | | | 3253 | 3253 | 3253 | 3253 | | | | | | |
| Rosal F. | | | | | 3360 | 3360 | 3360 | 3360 | | | | | |
| Cabezas Rubias | | | | | 3520 | 3520 | 3520 | 3520 | | | | | |
| Mértola | | | | | | 3573 | 3573 | 3573 | | | | | |
| N. S ^{ra} Machede | | | | | | | 3738 | 3738 | 3738 | | | | |
| M. S. Domingos | | | | | | | | 3840 | 3840 | | | | |
| Beja | | | | | | | | | 4107 | 4107 | | | |
| V. N. S. Bento | | | | | | | | | | 4587 | 4587 | | |
| M ^{te} Borralha | | | | | | | | | | | 4747 | | |
| Her ^{de} Mitra | | | | | | | | | | | 4853 | | |
| N. S ^{ra} Guadalupe | | | | | | | | | | | 4960 | | |
| Cabeça Gorda | | | | | | | | | | | 5067 | | |
| Montejuntos | | | | | | | | | | | | 8099 | |
| Serpa | | | | | | | | | | | | | 9040 |

(continua)

Tabela J.I.6. (continuação).

| (i) | K | Nível de significância $p < 0,05$ | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|---|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| M. S. Domingos | | 155 | | | | | | | | | | | |
| Rosal F. | | 160 | 160 | | | | | | | | | | |
| S ^{to} Aleixo R. | | 171 | 171 | | | | | | | | | | |
| V. N. S. Bento | | 192 | 192 | 192 | | | | | | | | | |
| M ^{te} Borralha | | | 229 | 229 | | | | | | | | | |
| Mértola | | | | 256 | 256 | | | | | | | | |
| Montejuntos | | | | 256 | 256 | | | | | | | | |
| Serpa | | | | | 315 | 315 | | | | | | | |
| V ^e Rocins | | | | | 320 | 320 | | | | | | | |
| Almendres | | | | | | 363 | 363 | | | | | | |
| V. Fresno | | | | | | 368 | 368 | | | | | | |
| Cabeça Gorda | | | | | | 384 | 384 | 384 | | | | | |
| Valverde | | | | | | | 405 | 405 | | | | | |
| Cabezas Rubias | | | | | | | | 443 | | | | | |
| Evoramonte | | | | | | | | | 576 | | | | |
| M ^{te} Novo | | | | | | | | | 603 | 603 | | | |
| Beja | | | | | | | | | 619 | 619 | | | |
| Évora | | | | | | | | | | 651 | | | |
| N. S ^{ra} Guadalupe | | | | | | | | | | 656 | | | |
| Her ^{de} Mitra | | | | | | | | | | | 731 | | |
| S. Miguel Machede | | | | | | | | | | | 773 | | |
| N. S ^{ra} Machede | | | | | | | | | | | | 912 | |
| Azaruja | | | | | | | | | | | | 981 | |
| Baleizão | | | | | | | | | | | | | 1099 |

| (j) | Mg | Nível de significância $p < 0,05$ | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|----|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | |
| Evoramonte | | 156 | | | | | | | | | | | |
| Évora | | 171 | 171 | | | | | | | | | | |
| M. S. Domingos | | 172 | 172 | | | | | | | | | | |
| Cabeça Gorda | | 186 | 186 | 186 | | | | | | | | | |
| Her ^{de} Mitra | | 193 | 193 | 193 | 193 | | | | | | | | |
| M ^{te} Novo | | 217 | 217 | 217 | 217 | 217 | | | | | | | |
| N. S ^{ra} Guadalupe | | | 255 | 255 | 255 | 255 | 255 | | | | | | |
| Valverde | | | 265 | 265 | 265 | 265 | 265 | | | | | | |
| V. Fresno | | | | 267 | 267 | 267 | 267 | | | | | | |
| S ^{to} Aleixo R. | | | | | 272 | 272 | 272 | 272 | 272 | | | | |
| Cabezas Rubias | | | | | | 277 | 277 | 277 | 277 | 277 | | | |
| Beja | | | | | | | 277 | 277 | 277 | 277 | 277 | | |
| V ^e Rocins | | | | | | | | 284 | 284 | 284 | 284 | | |
| Almendres | | | | | | | | | 286 | 286 | 286 | 286 | |
| M ^{te} Borralha | | | | | | | | | | 298 | 298 | 298 | |
| Baleizão | | | | | | | | | | | 312 | 312 | |
| Azaruja | | | | | | | | | | | | 324 | 324 |
| Rosal F. | | | | | | | | | | | | | 365 |
| Mértola | | | | | | | | | | | | | 365 |
| S. Miguel Machede | | | | | | | | | | | | 477 | |
| V. N. S. Bento | | | | | | | | | | | | 536 | |
| N. S ^{ra} Machede | | | | | | | | | | | | | 804 |
| Montejuntos | | | | | | | | | | | | | 910 |
| Serpa | | | | | | | | | | | | | 1466 |

(continua)

Tabela J.I.6. (continuação).

| (k) | Mn | Nível de significância $p < 0,05$ | | | | | | | |
|------------------------------|----|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| Valverde | | 21 | | | | | | | |
| Almendres | | 22 | | | | | | | |
| N. S ^{ra} Machede | | 123 | 123 | | | | | | |
| Azaruja | | 131 | 131 | | | | | | |
| M ^{ie} Novo | | 139 | 139 | | | | | | |
| Évora | | 175 | 175 | | | | | | |
| S. Miguel Machede | | | 193 | | | | | | |
| M. S. Domingos | | | 198 | | | | | | |
| Evoramonte | | | 212 | | | | | | |
| Mértola | | | 290 | | | | | | |
| Beja | | | | 507 | | | | | |
| Serpa | | | | 576 | 576 | | | | |
| Montejuntos | | | | 649 | 649 | 649 | | | |
| Cabeça Gorda | | | | | 695 | 695 | | | |
| M ^{ie} Borralha | | | | | 725 | 725 | | | |
| Her ^{de} Mitra | | | | | 725 | 725 | | | |
| Rosal F. | | | | | 725 | 725 | | | |
| Cabezas Rubias | | | | | 735 | 735 | 735 | | |
| V. N. S. Bento | | | | | | 744 | 744 | | |
| N. S ^{ra} Guadalupe | | | | | | 794 | 794 | | |
| Baleizão | | | | | | | 893 | 893 | |
| V ^e Rocins | | | | | | | 893 | 893 | |
| S ^{to} Aleixo R. | | | | | | | | 1002 | |
| V. Fresno | | | | | | | | | 1518 |

| (l) | Na | Nível de significância $p < 0,05$ | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|----|-----------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| Evoramonte | | 51 | | | | | | | | | | | |
| M ^{ie} Borralha | | 51 | | | | | | | | | | | |
| Évora | | 52 | 52 | | | | | | | | | | |
| M ^{ie} Novo | | 53 | 53 | | | | | | | | | | |
| Mértola | | 59 | 59 | 59 | | | | | | | | | |
| V. N. S. Bento | | 60 | 60 | 60 | 60 | | | | | | | | |
| S ^{to} Aleixo R. | | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | | | | | | | |
| Cabezas Rubias | | | 62 | 62 | 62 | 62 | | | | | | | |
| M. S. Domingos | | | | 67 | 67 | 67 | 67 | | | | | | |
| Cabeça Gorda | | | | 69 | 69 | 69 | 69 | 69 | | | | | |
| Beja | | | | 69 | 69 | 69 | 69 | 69 | | | | | |
| Almendres | | | | | 70 | 70 | 70 | 70 | | | | | |
| S. Miguel Machede | | | | | | 70 | 70 | 70 | | | | | |
| N. S ^{ra} Guadalupe | | | | | | | 73 | 73 | 73 | | | | |
| Azaruja | | | | | | | 75 | 75 | 75 | 75 | | | |
| V. Fresno | | | | | | | | 78 | 78 | 78 | 78 | | |
| N. S ^{ra} Machede | | | | | | | | 79 | 79 | 79 | 79 | | |
| Rosal F. | | | | | | | | 79 | 79 | 79 | 79 | | |
| Her ^{de} Mitra | | | | | | | | | 82 | 82 | 82 | | |
| Montejuntos | | | | | | | | | | 85 | 85 | | |
| V ^e Rocins | | | | | | | | | | | 86 | | |
| Baleizão | | | | | | | | | | | | 109 | |
| Valverde | | | | | | | | | | | | | 111 |
| Serpa | | | | | | | | | | | | | 158 |

(continua)

Tabela J.I.6. (continuação).

| (m) | P | Nível de significância $p < 0,05$ | | | | | | | | |
|------------------------------|---|-----------------------------------|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| Valverde | | 65 | | | | | | | | |
| Almendres | | 72 | 72 | | | | | | | |
| Mértola | | 74 | 74 | | | | | | | |
| Azaruja | | 74 | 74 | | | | | | | |
| V ^e Rocins | | 74 | 74 | | | | | | | |
| M. S. Domingos | | 75 | 75 | | | | | | | |
| N. S ^{ra} Machede | | 78 | 78 | 78 | | | | | | |
| Évora | | | 82 | 82 | | | | | | |
| M ^{te} Novo | | | 84 | 84 | | | | | | |
| Cabezas Rubias | | | | 93 | | | | | | |
| Evoramonte | | | | 94 | | | | | | |
| Serpa | | | | | 111 | | | | | |
| M ^{te} Borralha | | | | | 115 | 115 | | | | |
| V. N. S. Bento | | | | | 116 | 116 | | | | |
| Her ^{de} Mitra | | | | | 119 | 119 | 119 | | | |
| Cabeça Gorda | | | | | | 130 | 130 | | | |
| N. S ^{ra} Guadalupe | | | | | | 131 | 131 | | | |
| Beja | | | | | | | 133 | | | |
| Rosal F. | | | | | | | | 154 | | |
| Baleizão | | | | | | | | 156 | | |
| V. Fresno | | | | | | | | | 179 | |
| S ^{to} Aleixo R. | | | | | | | | | 179 | |
| S. Miguel Machede | | | | | | | | | 185 | |
| Montejuntos | | | | | | | | | | 294 |

| (n) | Pb | Nível de significância $p < 0,05$ | | | | | |
|------------------------------|----|-----------------------------------|-------|-------|-------|--------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Almendres | | 4,019 | | | | | |
| Valverde | | 4,440 | 4,440 | | | | |
| Cabeça Gorda | | 4,487 | 4,487 | | | | |
| N. S ^{ra} Guadalupe | | 4,487 | 4,487 | | | | |
| M ^{te} Borralha | | 5,422 | 5,422 | 5,422 | | | |
| Her ^{de} Mitra | | 5,422 | 5,422 | 5,422 | | | |
| S. Miguel Machede | | 5,843 | 5,843 | 5,843 | 5,843 | | |
| S ^{to} Aleixo R. | | 6,405 | 6,405 | 6,405 | 6,405 | | |
| Beja | | 6,873 | 6,873 | 6,873 | 6,873 | 6,873 | |
| Azaruja | | 6,966 | 6,966 | 6,966 | 6,966 | 6,966 | |
| Evoramonte | | 7,387 | 7,387 | 7,387 | 7,387 | 7,387 | 7,387 |
| V. Fresno | | 7,434 | 7,434 | 7,434 | 7,434 | 7,434 | 7,434 |
| Mértola | | | 7,949 | 7,949 | 7,949 | 7,949 | 7,949 |
| M ^{te} Novo | | | | 8,229 | 8,229 | 8,229 | 8,229 |
| N. S ^{ra} Machede | | | | 8,370 | 8,370 | 8,370 | 8,370 |
| V. N. S. Bento | | | | 8,370 | 8,370 | 8,370 | 8,370 |
| Baleizão | | | | | 9,165 | 9,165 | 9,165 |
| V ^e Rocins | | | | | 9,165 | 9,165 | 9,165 |
| Montejuntos | | | | | | 10,194 | 10,194 |
| M. S. Domingos | | | | | | 10,335 | 10,335 |
| Évora | | | | | | | 10,896 |
| Cabezas Rubias | | | | | | | |
| Rosal F. | | | | | | | |
| Serpa | | | | | | | |

(continua)

Tabela J.I.6. (continuação).

| (p) | Zn | Nível de significância $p < 0,05$ | | | | | | | | | |
|---------------------------------|-------|-----------------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| M. S. Domingos | 3,715 | | | | | | | | | | |
| Almendres | 4,404 | 4,404 | | | | | | | | | |
| Valverde | 4,541 | 4,541 | 4,541 | | | | | | | | |
| V. Fresno | 4,920 | 4,920 | 4,920 | | | | | | | | |
| M ^{ie} Novo | 4,954 | 4,954 | 4,954 | | | | | | | | |
| V ^e Rocins | 4,989 | 4,989 | 4,989 | | | | | | | | |
| Azaruja | 5,023 | 5,023 | 5,023 | | | | | | | | |
| Évora | | 5,196 | 5,196 | | | | | | | | |
| Rosal F. | | 5,815 | 5,815 | | | | | | | | |
| Evoramonte | | | 5,953 | | | | | | | | |
| S. Miguel Machede | | | | 9,189 | | | | | | | |
| Baleizão | | | | 9,396 | | | | | | | |
| N. S ^{ra} Machede | | | | 9,472 | | | | | | | |
| Cabeça Gorda | | | | 9,534 | | | | | | | |
| M ^{ie} Borralha | | | | 10,326 | 10,326 | | | | | | |
| Montejuntos | | | | 10,454 | 10,454 | | | | | | |
| Cabezas Rubias | | | | 10,498 | 10,498 | | | | | | |
| S ^{to} Aleixo R. | | | | 10,532 | 10,532 | | | | | | |
| Her ^{de} Mitra | | | | | 11,187 | 11,187 | | | | | |
| N. S ^{ra} Guadalupe | | | | | | 12,323 | 12,323 | | | | |
| Beja | | | | | | | 13,253 | | | | |
| Mértola | | | | | | | | 15,146 | | | |
| V. N. S. Bento | | | | | | | | | 26,495 | | |
| Serpa | | | | | | | | | | 29,521 | |

J.II – Análise estatística referente à quantificação e avaliação das propriedades biológicas dos corpos de frutificação e culturas de *A. ponderosa* e extratos lipofílicos, fenólicos e complexos PPS.

Tabela J.II.1. Análise de variância (ANOVA) das propriedades biológicas presentes nos corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das culturas de *A. ponderosa* de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R..

| | | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Média dos quadrados | Valor de F | Valor de p (Sig.) |
|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|---------------------|------------|---------------------|
| DPPH | Entre grupos | 20926,185 | 8 | 2615,773 | 513,971 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 203,574 | 40 | 5,089 | | |
| | Total | 21129,759 | 48 | | | |
| β -Caroteno | Entre grupos | 3760,743 | 8 | 470,093 | 257,971 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 74,713 | 41 | 1,822 | | |
| | Total | 3835,456 | 49 | | | |
| CAT | Entre grupos | 16774,109 | 8 | 2096,764 | 191,354 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 197,235 | 18 | 10,957 | | |
| | Total | 16971,344 | 26 | | | |
| SOD | Entre grupos | 6125,874 | 8 | 765,734 | 279,778 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 49,265 | 18 | 2,737 | | |
| | Total | 6175,139 | 26 | | | |

Tabela J.II.2. Comparação múltipla de médias das propriedades biológicas presentes nos corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das culturas, pelo teste de Tukey HSD.

| | | Nível de significância $p < 0,05$ | | | | | |
|-------------------|---|-----------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| DPPH | Micélio (Beja) | 15,187 | | | | | |
| | C. frutificação (S ^{to} Aleixo R.) | 18,040 | 18,040 | | | | |
| | C. frutificação (Beja) | 19,304 | 19,304 | | | | |
| | Micélio (S ^{to} Aleixo R.) | | 20,662 | 20,662 | | | |
| | Sobrenadante (Beja) | | 22,099 | 22,099 | | | |
| | Micélio (Mértola) | | | 24,846 | | | |
| | Sobrenadante (S ^{to} Aleixo R.) | | | | 33,966 | | |
| | Sobrenadante (Mértola) | | | | | 65,358 | |
| | C. frutificação (Mértola) | | | | | | 73,310 |
| β -Caroteno | Micélio (Beja) | 10,231 | | | | | |
| | C. frutificação (Beja) | 10,734 | | | | | |
| | C. frutificação (S ^{to} Aleixo R.) | 10,956 | | | | | |
| | Micélio (S ^{to} Aleixo R.) | 11,145 | | | | | |
| | Micélio (Mértola) | 12,835 | 12,835 | | | | |
| | Sobrenadante (S ^{to} Aleixo R.) | | 15,287 | | | | |
| | C. frutificação (Mértola) | | | 21,033 | | | |
| | Sobrenadante (Beja) | | | 21,903 | | | |
| | Sobrenadante (Mértola) | | | | 39,363 | | |
| CAT | C. frutificação (S ^{to} Aleixo R.) | 0,721 | | | | | |
| | C. frutificação (Mértola) | 0,731 | | | | | |
| | C. frutificação (Beja) | 0,782 | | | | | |
| | Micélio (S ^{to} Aleixo R.) | 1,015 | | | | | |
| | Micélio (Beja) | 6,223 | | | | | |
| | Micélio (Mértola) | 7,279 | | | | | |
| | Sobrenadante (Mértola) | | 54,315 | | | | |
| | Sobrenadante (S ^{to} Aleixo R.) | | 54,619 | | | | |
| | Sobrenadante (Beja) | | 57,310 | | | | |
| SOD | C. frutificação (S ^{to} Aleixo R.) | 22,195 | | | | | |
| | C. frutificação (Beja) | | 41,996 | | | | |
| | C. frutificação (Mértola) | | | 47,822 | | | |
| | Sobrenadante (S ^{to} Aleixo R.) | | | | 59,813 | | |
| | Micélio (S ^{to} Aleixo R.) | | | | 59,813 | | |
| | Sobrenadante (Beja) | | | | | 65,389 | |
| | Micélio (Beja) | | | | | 65,478 | |
| | Sobrenadante (Mértola) | | | | | 69,642 | 69,642 |
| | Micélio (Mértola) | | | | | | 71,590 |

Tabela J.II.3. Análise de variância (ANOVA) das propriedades biológicas presentes nos extratos lipofílicos obtidos de corpos de frutificação e micélios das culturas de *A. ponderosa* de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R..

| | | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Média dos quadrados | Valor de F | Valor de <i>p</i> (Sig.) |
|------------|-------------------|--------------------|--------------------|---------------------|------------|--------------------------|
| DPPH | Entre grupos | 13134,206 | 5 | 2626,841 | 217,363 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 362,551 | 30 | 12,085 | | |
| | Total | 13496,757 | 35 | | | |
| β-Caroteno | Entre grupos | 9,918 | 5 | 1,984 | 14,264 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 4,172 | 30 | 0,139 | | |
| | Total | 14,089 | 35 | | | |
| CAT | Entre grupos | 11,879 | 5 | 2,376 | 29,251 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 0,975 | 12 | 0,081 | | |
| | Total | 12,853 | 17 | | | |
| SOD | Entre grupos | 256,872 | 5 | 51,374 | 67,545 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 9,127 | 12 | 0,761 | | |
| | Total | 265,999 | 17 | | | |

Tabela J.II.4. Comparação múltipla de médias das propriedades biológicas presentes nos extratos lipofílicos obtidos de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes, pelo teste de *Tukey HSD*.

| | | Nível de significância <i>p</i> < 0,05 | | | | | |
|------------|---|--|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| DPPH | C. frutificação (Beja) | 9,440 | | | | | |
| | Micélio (Beja) | | 21,625 | | | | |
| | C. frutificação (Mértola) | | | 33,602 | | | |
| | Micélio (Mértola) | | | | 43,832 | | |
| | Micélio (S ^{to} Aleixo R.) | | | | | 56,350 | |
| | C. frutificação (S ^{to} Aleixo R.) | | | | | | 64,750 |
| β-Caroteno | C. frutificação (Mértola) | 4,525 | | | | | |
| | Micélio (Mértola) | 4,956 | 4,956 | | | | |
| | C. frutificação (S ^{to} Aleixo R.) | | 5,341 | 5,341 | | | |
| | C. frutificação (Beja) | | | 5,737 | | | |
| | Micélio (Beja) | | | 5,900 | | | |
| | Micélio (S ^{to} Aleixo R.) | | | 5,970 | | | |
| CAT | Micélio (Beja) | 3,878 | | | | | |
| | Micélio (Mértola) | 4,102 | 4,102 | | | | |
| | C. frutificação (S ^{to} Aleixo R.) | 4,569 | 4,569 | | | | |
| | Micélio (S ^{to} Aleixo R.) | | 4,660 | | | | |
| | C. frutificação (Beja) | | | 5,584 | | | |
| | C. frutificação (Mértola) | | | 6,193 | | | |
| SOD | C. frutificação (S ^{to} Aleixo R.) | 12,079 | | | | | |
| | C. frutificação (Beja) | 13,260 | | | | | |
| | Micélio (Beja) | | 17,790 | | | | |
| | Micélio (S ^{to} Aleixo R.) | | 18,400 | | | | |
| | Micélio (Mértola) | | 19,044 | | | | |
| | C. frutificação (Mértola) | | | 23,428 | | | |

Tabela J.II.5. Análise de variância (ANOVA) do conteúdo em fenólico presente nos extratos obtidos de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das culturas de *A. ponderosa* de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R..

| | | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Média dos quadrados | Valor de F | Valor de p (Sig.) |
|--------|-------------------|--------------------|--------------------|---------------------|------------|---------------------|
| Fenóis | Entre grupos | 395965,816 | 8 | 49495,727 | 703,952 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 3164,004 | 45 | 70,311 | | |
| | Total | 399129,821 | 53 | | | |

Tabela J.II.6. Comparação múltipla de médias do conteúdo em fenóis totais, pelo teste de *Tukey* HSD.

| | | Nível de significância $p < 0,05$ | | | | | |
|--------|---|-----------------------------------|--------|--------|---------|---------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Fenóis | C. frutificação (S ^{to} Aleixo R.) | 30,909 | | | | | |
| | C. frutificação (Beja) | | 57,467 | | | | |
| | Micélio (S ^{to} Aleixo R.) | | 59,006 | | | | |
| | C. frutificação (Mértola) | | 59,183 | | | | |
| | Micélio (Beja) | | 69,087 | 69,087 | | | |
| | Micélio (Mértola) | | | 84,426 | | | |
| | Sobrenadante (S ^{to} Aleixo R.) | | | | 167,027 | | |
| | Sobrenadante (Beja) | | | | | 225,293 | |
| | Sobrenadante (Mértola) | | | | | | 292,366 |

Tabela J.II.7. Análise de variância (ANOVA) das propriedades biológicas presentes nos extratos fenólicos totais obtidos de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das culturas de *A. ponderosa* de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R..

| | | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Média dos quadrados | Valor de F | Valor de p (Sig.) |
|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|---------------------|------------|---------------------|
| DPPH | Entre grupos | 7420,543 | 8 | 927,568 | 188,527 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 201,724 | 41 | 4,920 | | |
| | Total | 7622,267 | 49 | | | |
| β -Caroteno | Entre grupos | 3759,060 | 8 | 469,883 | 321,490 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 65,771 | 45 | 1,462 | | |
| | Total | 3824,831 | 53 | | | |
| CAT | Entre grupos | 176,543 | 8 | 22,068 | 154,591 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 2,570 | 18 | 0,143 | | |
| | Total | 179,113 | 26 | | | |
| SOD | Entre grupos | 21,516 | 8 | 2,690 | 236,651 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 0,205 | 18 | 0,011 | | |
| | Total | 21,721 | 26 | | | |

Tabela J.II.8. Comparação múltipla de médias das propriedades biológicas presentes nos extratos fenólicos totais obtidos de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes, pelo teste de Tukey HSD.

| | | Nível de significância $p < 0,05$ | | | | | | |
|-------------------|---|-----------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| DPPH | Micélio (S ^{to} Aleixo R.) | 19,933 | | | | | | |
| | C. frutificação (S ^{to} Aleixo R.) | 21,043 | 21,043 | | | | | |
| | Micélio (Beja) | 23,523 | 23,523 | 23,523 | | | | |
| | Sobrenadante (Beja) | | 24,443 | 24,443 | | | | |
| | Sobrenadante (S ^{to} Aleixo R.) | | | 26,033 | 26,033 | | | |
| | C. frutificação (Mértola) | | | | 29,818 | | | |
| | Sobrenadante (Mértola) | | | | | 47,322 | | |
| | Micélio (Mértola) | | | | | 48,247 | 48,247 | |
| | C. frutificação (Beja) | | | | | | 52,233 | |
| | C. frutificação (S ^{to} Aleixo R.) | 3,822 | | | | | | |
| β -Caroteno | Micélio (Mértola) | | 8,285 | | | | | |
| | C. frutificação (Beja) | | 8,770 | | | | | |
| | Micélio (Beja) | | | 13,148 | | | | |
| | Micélio (S ^{to} Aleixo R.) | | | | 23,486 | | | |
| | Sobrenadante (Beja) | | | | 23,864 | | | |
| | C. frutificação (Mértola) | | | | 24,889 | | | |
| | Sobrenadante (Mértola) | | | | 25,262 | | | |
| | Sobrenadante (S ^{to} Aleixo R.) | | | | 25,757 | | | |
| | Micélio (Beja) | 2,883 | | | | | | |
| | C. frutificação (Beja) | 3,959 | | | | | | |
| CAT | Micélio (S ^{to} Aleixo R.) | | 6,102 | | | | | |
| | C. frutificação (Mértola) | | | 7,208 | | | | |
| | C. frutificação (S ^{to} Aleixo R.) | | | 7,614 | 7,614 | | | |
| | Micélio (Mértola) | | | 7,929 | 7,929 | | | |
| | Sobrenadante (Beja) | | | | 8,487 | 8,487 | | |
| | Sobrenadante (Mértola) | | | | | 9,340 | | |
| | Sobrenadante (S ^{to} Aleixo R.) | | | | | | 11,848 | |
| | C. frutificação (Beja) | 15,710 | | | | | | |
| SOD | C. frutificação (S ^{to} Aleixo R.) | | 17,440 | | | | | |
| | Micélio (Beja) | | | 17,790 | | | | |
| | C. frutificação (Mértola) | | | 17,987 | 17,987 | | | |
| | Sobrenadante (Beja) | | | | 18,242 | 18,242 | | |
| | Micélio (S ^{to} Aleixo R.) | | | | | 18,400 | 18,400 | |
| | Sobrenadante (S ^{to} Aleixo R.) | | | | | | 18,553 | 18,553 |
| | Sobrenadante (Mértola) | | | | | | 18,668 | 18,668 |
| | Micélio (Mértola) | | | | | | | 18,787 |

Tabela J.II.9. Análise de variância (ANOVA) dos conteúdos em polissacáridos e proteína presente nos extratos de complexos proteína-polissacárido extraídos de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das culturas de *A. ponderosa* de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R..

| | | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Média dos quadrados | Valor de F | Valor de <i>p</i> (Sig.) |
|----------------|-------------------|--------------------|--------------------|---------------------|------------|--------------------------|
| Polissacáridos | Entre grupos | 1119139,189 | 8 | 139892,399 | 195,463 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 12882,530 | 18 | 715,696 | | |
| | Total | 1132021,719 | 26 | | | |
| Proteína | Entre grupos | 3957,887 | 8 | 494,736 | 332,215 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 31,273 | 21 | 1,489 | | |
| | Total | 3989,161 | 29 | | | |

Tabela J.II.10. Comparação múltipla de médias dos conteúdos em polissacáridos e proteína presente nos extratos de PPS, pelo teste de *Tukey HSD*.

| | | Nível de significância $p < 0,05$ | | | | |
|---|---|-----------------------------------|---------|---------|---------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Polissacáridos | C. frutificação (Mértola) | 61,527 | | | | |
| | C. frutificação (Beja) | 88,149 | | | | |
| | C. frutificação (S ^{to} Aleixo R.) | 137,279 | | | | |
| | Sobrenadante (Mértola) | | 260,563 | | | |
| | Sobrenadante (Beja) | | | 343,446 | | |
| | Micélio (Beja) | | | | 425,135 | |
| | Micélio (Mértola) | | | | | 546,599 |
| | Micélio (S ^{to} Aleixo R.) | | | | | 589,977 |
| | Sobrenadante (S ^{to} Aleixo R.) | | | | | 608,761 |
| Proteína | C. frutificação (Mértola) | 4,973 | | | | |
| | Sobrenadante (Beja) | 6,062 | | | | |
| | Micélio (Mértola) | 6,074 | | | | |
| | Sobrenadante (Mértola) | 7,763 | 7,763 | | | |
| | Micélio (Beja) | 7,878 | 7,878 | | | |
| | C. frutificação (Beja) | | 9,670 | 9,670 | | |
| | Micélio (S ^{to} Aleixo R.) | | | 12,517 | | |
| | Sobrenadante (S ^{to} Aleixo R.) | | | | 26,113 | |
| C. frutificação (S ^{to} Aleixo R.) | | | | | 42,041 | |

Tabela J.II.11. Análise de variância (ANOVA) das propriedades biológicas presentes nos extratos PPS obtidos de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes das culturas de *A. ponderosa* de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R..

| | | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Média dos quadrados | Valor de F | Valor de <i>p</i> (Sig.) |
|------------|-------------------|--------------------|--------------------|---------------------|------------|--------------------------|
| DPPH | Entre grupos | 8000,257 | 8 | 1000,032 | 17,517 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 2283,520 | 40 | 57,088 | | |
| | Total | 10283,777 | 48 | | | |
| β-Caroteno | Entre grupos | 2480,504 | 8 | 310,063 | 291,516 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 42,545 | 40 | 1,064 | | |
| | Total | 2523,048 | 48 | | | |
| CAT | Entre grupos | 99,104 | 8 | 12,388 | 133,497 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 1,670 | 18 | 0,093 | | |
| | Total | 100,775 | 26 | | | |
| SOD | Entre grupos | 1015,219 | 8 | 126,902 | 111,660 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 20,457 | 18 | 1,137 | | |
| | Total | 1035,676 | 26 | | | |

Tabela J.II.12. Comparação múltipla de médias das propriedades biológicas presentes nos extratos PPS obtidos de corpos de frutificação, micélios e sobrenadantes, pelo teste de *Tukey HSD*.

| | | Nível de significância <i>p</i> < 0,05 | | | | | | |
|------------|---|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| DPPH | Sobrenadante (Beja) | 30,955 | | | | | | |
| | Sobrenadante (Mértola) | 37,486 | | | | | | |
| | Micélio (Mértola) | | 53,958 | | | | | |
| | Sobrenadante (S ^{to} Aleixo R.) | | 56,087 | | | | | |
| | C. frutificação (Mértola) | | 56,573 | | | | | |
| | C. frutificação (Beja) | | 63,717 | | | | | |
| | C. frutificação (S ^{to} Aleixo R.) | | 65,145 | | | | | |
| | Micélio (S ^{to} Aleixo R.) | | 66,794 | | | | | |
| β-Caroteno | Micélio (Beja) | | 68,952 | | | | | |
| | Micélio (S ^{to} Aleixo R.) | 6,230 | | | | | | |
| | Micélio (Beja) | 6,739 | | | | | | |
| | C. frutificação (Beja) | 6,970 | | | | | | |
| | Sobrenadante (Beja) | | 10,465 | | | | | |
| | C. frutificação (Mértola) | | 10,505 | | | | | |
| | C. frutificação (S ^{to} Aleixo R.) | | | 12,644 | | | | |
| | Micélio (Mértola) | | | 14,126 | | | | |
| CAT | Sobrenadante (Mértola) | | | | 17,929 | | | |
| | Sobrenadante (S ^{to} Aleixo R.) | | | | | 30,726 | | |
| | C. frutificação (Beja) | 6,497 | | | | | | |
| | Micélio (Beja) | 6,832 | | | | | | |
| | C. frutificação (S ^{to} Aleixo R.) | | 8,223 | | | | | |
| | Sobrenadante (Beja) | | | 9,330 | | | | |
| | C. frutificação (Mértola) | | | | 10,254 | | | |
| | Micélio (S ^{to} Aleixo R.) | | | | 10,325 | | | |
| SOD | Micélio (Mértola) | | | | 10,975 | 10,975 | | |
| | Sobrenadante (S ^{to} Aleixo R.) | | | | | 11,533 | 11,533 | |
| | Sobrenadante (Mértola) | | | | | | 12,284 | |
| | C. frutificação (Beja) | 40,066 | | | | | | |
| | C. frutificação (S ^{to} Aleixo R.) | | 46,643 | | | | | |
| | Micélio (Beja) | | | 50,145 | | | | |
| SOD | C. frutificação (Mértola) | | | 52,111 | 52,111 | | | |
| | Sobrenadante (Beja) | | | | 54,666 | 54,666 | | |
| | Micélio (S ^{to} Aleixo R.) | | | | | 56,239 | 56,239 | |
| | Sobrenadante (S ^{to} Aleixo R.) | | | | | | 57,776 | 57,776 |
| | Sobrenadante (Mértola) | | | | | | 58,920 | 58,920 |
| | Micélio (Mértola) | | | | | | | 60,117 |

Tabela J.II.13. Análise de variância (ANOVA) para os valores de IC₅₀ de proliferação celular, obtidos em ensaios de células humanas MDA-MB-231, para as amostras de micélios e sobrenadantes de *A. ponderosa*.

| | | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Média dos quadrados | Valor de F | Valor de <i>p</i> (Sig.) |
|---------------------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|---------------------|------------|--------------------------|
| Proliferação celular IC ₅₀ | Entre grupos | 13938,723 | 5 | 2787,745 | 136,717 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 244,687 | 12 | 20,391 | | |
| | Total | 14183,410 | 17 | | | |

Tabela J.II.14. Comparação múltipla de médias dos valores de IC₅₀ de proliferação celular, para as amostras de micélios e sobrenadantes de *A. ponderosa*, pelo teste de Tukey HSD.

| | Nível de significância $p < 0,05$ | | | |
|--|-----------------------------------|---------|---------|---------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Sobrenadante (Mértola) | 88,963 | | | |
| Micélio (Mértola) | 96,708 | | | |
| Sobrenadante (Beja) | | 113,608 | | |
| Micélio (Beja) | | | 147,026 | |
| Micélio (S ^{to} Aleixo R.) | | | 150,929 | 150,929 |
| Sobrenadante (S ^{to} Aleixo R.) | | | | 160,641 |

Tabela J.II.15. Análise de variância (ANOVA) para os valores de IC₅₀ de proliferação celular, obtidos em ensaios de células humanas MDA-MB-231, para as amostras de complexos PPS extraídos de micélios e sobrenadantes de *A. ponderosa*.

| | | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Média dos quadrados | Valor de F | Valor de <i>p</i> (Sig.) |
|---------------------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|---------------------|------------|--------------------------|
| Proliferação celular IC ₅₀ | Entre grupos | 103814,620 | 5 | 20762,924 | 534,309 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 466,313 | 12 | 38,859 | | |
| | Total | 104280,933 | 17 | | | |

Tabela J.II.16. Comparação múltipla de médias dos valores de IC₅₀ de proliferação celular, para as amostras de PPS extraídos de micélios e sobrenadantes de *A. ponderosa*, pelo teste de Tukey HSD.

| | Nível de significância $p < 0,05$ | | | | |
|--|-----------------------------------|--------|---------|---------|---------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Sobrenadante (Mértola) | 37,772 | | | | |
| Sobrenadante (Beja) | | 59,987 | | | |
| Sobrenadante (S ^{to} Aleixo R.) | | | 170,000 | | |
| Micélio (Mértola) | | | | 188,694 | |
| Micélio (S ^{to} Aleixo R.) | | | | | 222,813 |
| Micélio (Beja) | | | | | 232,035 |

J.III– Análise estatística referente à avaliação do efeito hepatoprotetor pela avaliação das atividades enzimáticas AST, ALT, ALP e GGT.

Tabela J.III.1. Análise de variância (ANOVA) das atividades enzimáticas dos enzimas séricos AST, ALT, ALP e GGT correspondentes às amostras de corpos de frutificação de *A. ponderosa* de Beja, micélios liofilizados das culturas de *A. ponderosa* de Beja, Mértola e S^{to} Aleixo R., controlos positivo e negativo e fármaco padrão silimarina.

| | | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Média dos quadrados | Valor de F | Valor de <i>p</i> (Sig.) |
|-----|-------------------|--------------------|--------------------|---------------------|------------|--------------------------|
| AST | Entre grupos | 64981,596 | 10 | 6498,160 | 26,007 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 11993,336 | 48 | 249,861 | | |
| | Total | 76974,932 | 58 | | | |
| ALT | Entre grupos | 2678,736 | 10 | 267,874 | 8,396 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 1531,357 | 48 | 31,903 | | |
| | Total | 4210,094 | 58 | | | |
| ALP | Entre grupos | 148856,916 | 10 | 14885,692 | 13,835 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 51644,145 | 48 | 1075,920 | | |
| | Total | 200501,061 | 58 | | | |
| GGT | Entre grupos | 5,863 | 10 | 0,586 | 10,686 | 0,000 |
| | Dentro dos grupos | 2,634 | 48 | 0,055 | | |
| | Total | 8,497 | 58 | | | |

Tabela J.III.2. Comparação múltipla de médias das atividades enzimáticas dos enzimas séricos AST, ALT, ALP e GGT para as diferentes amostras testadas, pelo teste de *Tukey HSD*.

| | | Nível de significância $p < 0,05$ | | |
|-------------------|--|-----------------------------------|---------|---|
| | | 1 | 2 | 3 |
| AST | Micélio (S ^{to} Aleixo R.) + etanol | 84,021 | | |
| | C. frutificação + etanol | 90,921 | | |
| | Micélio (Beja) | 97,396 | | |
| | Micélio (S ^{to} Aleixo R.) | 98,975 | | |
| | Micélio (Mértola) | 100,482 | | |
| | Micélio (Mértola) + etanol | 105,071 | | |
| | C. frutificação | 106,286 | | |
| | Micélio (Beja) + etanol | 109,876 | 109,876 | |
| | Controlo negativo | 114,668 | 114,668 | |
| | Silimarina | | 142,711 | |
| Controlo positivo | | | 203,168 | |
| ALT | Micélio (S ^{to} Aleixo R.) + etanol | 26,988 | | |
| | Micélio (Beja) | 27,203 | | |
| | C. frutificação | 29,540 | | |
| | Micélio (S ^{to} Aleixo R.) | 29,803 | | |
| | C. frutificação + etanol | 30,565 | | |
| | Micélio (Mértola) | 30,772 | | |
| | Micélio (Beja) + etanol | 30,946 | | |
| | Micélio (Mértola) + etanol | 32,946 | | |
| | Controlo negativo | 38,239 | | |
| | Silimarina | 38,396 | | |
| Controlo positivo | | 50,435 | | |
| ALP | Micélio (Mértola) | 182,659 | | |
| | Controlo negativo | 194,972 | | |
| | Micélio (Mértola) + etanol | 198,256 | | |
| | Micélio (S ^{to} Aleixo R.) | 223,298 | 223,298 | |
| | Micélio (Beja) + etanol | 228,733 | 228,733 | |
| | Micélio (Beja) | 230,171 | 230,171 | |
| | Silimarina | 240,787 | 240,787 | |
| | Micélio (S ^{to} Aleixo R.) + etanol | 241,988 | 241,988 | |
| | C. frutificação | 242,782 | 242,782 | |
| | C. frutificação + etanol | | 270,119 | |
| Controlo positivo | | | 371,861 | |
| GGT | C. frutificação | 0,559 | | |
| | Micélio (Mértola) | 0,559 | | |
| | Micélio (S ^{to} Aleixo R.) | 0,773 | 0,773 | |
| | Micélio (Beja) + etanol | 0,828 | 0,828 | |
| | Micélio (S ^{to} Aleixo R.) + etanol | 0,901 | 0,901 | |
| | Controlo negativo | 0,915 | 0,915 | |
| | C. frutificação + etanol | 0,937 | 0,937 | |
| | Micélio (Mértola) + etanol | 0,942 | 0,942 | |
| | Micélio (Beja) | 0,962 | 0,962 | |
| | Silimarina | | 1,087 | |
| Controlo positivo | | | 1,768 | |



Contactos:

Universidade de Évora
Instituto de Investigação e Formação Avançada - IIFA
Palácio do Vimioso | Largo Marquês de Marialva, Apart. 94
7002-554 Évora | Portugal
Tel: (+351) 266 706 581
Fax: (+351) 266 744 677
email: iifa@uevora.pt