

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Pesquisa de biocompostos em
Boletus edulis e Boletus pinophilus
com ação anticancerígena

Mestrado em Biologia

Dissertação

Maria Helena Araújo Portugal de Guichard Alves

Orientadora: Professora Doutora Guilhermina Miguel da Silva Marques

Coorientador: Professor Doutor Fernando Hermínio Ferreira Milheiro Nunes



Vila Real, 2014

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Pesquisa de biocompostos em
Boletus edulis e *Boletus pinophilus*
com ação anticancerígena**

Dissertação
Mestrado em Biologia

Realizado nos
Departamento de Agronomia, Escola de Ciências Agrárias e Veterinárias e
Departamento de Química, Escola de Ciências da Vida e do Ambiente

Maria Helena Araújo Portugal de Guichard Alves

Orientadora: Professora Doutora Guilhermina Miguel da Silva Marques
Coorientador: Professor Doutor Fernando Hermínio Ferreira Milheiro Nunes

Composição do Júri:

Professora Doutora Ana Cristina Ramos Sampaio
Professora Doutora Amélia Maria Lopes Dias da Silva
Professor Doutor Fernando Hermínio Milheiro Nunes

Vila Real, 2014

Dedicatórias

Dedico o meu trabalho a uma Menina, de nove anos, que queria descobrir “coisas novas” na Escola mas os seus pés descalços, em vez de seguirem caminhos, cobertos de gelo para a Escola foram obrigados a seguir outros caminhos de gelo:

”Todos os dias ia ao monte, buscar caruma, troncos, pinhas, para a minha mãe e os meus seis irmãos, mais novos; mas o que eu gostava mesmo era de descobrir coisas novas na Escola, mas tive que abandoná-la para trabalhar“

Dedico a outra Menina, do tempo em que poucas Mulheres concluíam o ensino básico, embora sendo afortunada, quis sempre estudar mais e mais. Saiu de casa dos pais aos nove anos, para continuar os estudos, porque” queria ir muito longe”! O mais longe que a vida lhe permitiu: o 6º ano da Universidade, do Curso de Engenharia.

Dedico pois o meu trabalho, a estas duas Meninas, de 67 e 87 anos de idade.

Dedico também este trabalho ao meu Professor, Doutor João Paulo Cabral da FCUP, pelo efeito pessoal e profissional que teve nos seus alunos na transmissão da Ciência.

Obrigada Professor, pelas suas Aulas e pelo seu Testemunho!

“Deus perdoa Sempre

Os Homens por vezes

A Natureza Nunca!”

Por isso a nossa Gratidão a Deus deve ser Constate e a pesquisa da natureza também!

Agradecimentos

Agradeço aos meus Professores Orientadores pela oportunidade que me deram em participar neste projeto de investigação que me permitiu aceder a novos conhecimentos e sonhar em torna-los úteis.

Agradeço, em particular, à Professora Doutora Guilhermina Marques toda a orientação e correções recebidas para este trabalho, nesta fase da vida, tão desafiadora para todos.

Agradeço ao Professor Doutor Fernando Nunes por ter aceitado orientar este trabalho no Laboratório de Química e Qualidade Alimentar, e em me ter dado o seu valioso conhecimento, imprescindível para a prossecução e conclusão do meu trabalho.

Tenho muito a agradecer ao André Lemos, por todos os ensinamentos e técnicas partilhadas, com uma calma e técnicas exímias, que permitiram a progressão contínua do trabalho.

Agradeço ao Sr. Carlos, à Ana Abraão, à Irene Fraga e ao Pedro da Silva, pelos seus bons conselhos de trabalho, pela sua pronta disponibilidade em ajudar, sempre que os solicitei, mesmo nas coisas mais pequenas, mas que fizeram avançar o trabalho.

Dum modo especial, quero agradecer ao Miguel Ribeiro pelo seu extraordinário contributo humano e profissional, verdadeiro exemplo de generosa partilha do conhecimento científico e de qualidades humanas, com as quais esta investigação ficou muito mais completa e promissora. Concretamente no que diz respeito à pesquisa de ácidos nucleicos.

À colaboradora na nossa investigação, na Polónia, Marta Lemieszek, do Departamento de Biologia Médica, do IMA de Jazewskiego, Lublin-Polónia, envio o meu agradecimento pelo seu testemunho efetivo de colaboração, concretamente nos testes e resultados da actividade antitumoral.

Aos meus Filhos, Marido, Mãe e Sogra que me incentivaram, nunca se queixando da minha ausência ou do meu menor contributo na vida familiar.

Dum modo especial, agradeço toda a ajuda do meu Marido e à boa companhia, nas boleias possíveis para Vila Real, dos Físicos mais viajados entre Porto e Trás-os-Montes: Milai (“Gostava de te ter um dia como Professora!”), Daniel e Francisco.

Agradeço por fim, não deixando de ser a minha primeira Força, aos Grandes Amigos:

Mãe, Milita, Isabel e Outros, que não nomeio, mas que estiveram sempre presentes!

Resumo

Os cogumelos para além do seu valor gastronómico e nutricional são uma fonte de compostos com atividades biofuncionais reconhecidas desde há cerca de 5000 anos e confirmadas com testes *in vitro* e ensaios *in vivo* nas últimas duas gerações. Entre essas actividades biológicas destaca-se a atividade antitumoral e imunoestimulante cuja pesquisa se intensificou desde os anos 90.

Estudos prévios demonstraram a existência de biopolímeros, extraídos com água quente, de um extrato de *Boletus edulis* com atividade anticancerígena, onde se destacava a fração, extraída, denominada BE3. O objetivo deste trabalho foi determinar a natureza química desta fração com elevado potencial anticancerígeno. Foi, também, objetivo desta pesquisa, verificar se outros cogumelos do mesmo género continham este biocomposto e em caso afirmativo testar o seu potencial anticancerígeno. Para tal utilizou-se como matéria-prima a película dos carpóforos dos cogumelos *Boletus edulis* e *Boletus pinophilus*. Os biopolímeros foram obtidos por tratamento do material com etanol a 80%, a quente, de forma a obter o resíduo insolúvel em álcool (AIR). O AIR foi fervido em água, concentrado e dializado (MWcut 12-14 kDa). A fracção BE3 e também a correspondente fracção para *Boletus pinophilus* (BP3) foram isoladas por cromatografia de troca aniónica com eluição do material retido com solução aquosa de NaCl de 0,25 a 0,5M.

Efetou-se também a pesquisa de eumelaninas solúveis nos extratos de *Boletus edulis* e *Boletus pinophilus*, nas fracções BE3 e BP3, não tendo sido detetadas quantidades significativas deste biopolímero. Para tal foi extraída a melanina da tinta de *Sepia officinalis* sofrendo clivagem oxidativa e identificados, de seguida, os monómeros, em HPLC. Para verificar a validade do método de clivagem oxidativa, em meio alcalino, da eumelanina em monómeros de PDCA e PTCA, testou-se no sistema cromatográfico a detecção e identificação de PDCA e PTCA da eumelanina da *Sepia officinalis* em HPLC. Os padrões puros de PDCA e PTCA que foram fornecidos por laboratório do Japão foram testados também no sistema cromatográfico.

Fez-se a separação dos extratos HWBE e HWBP em diferentes fracções (1,2,3,4,e5) por cromatografia de troca aniónica com eluição com solução de NaCl a concentrações crescentes.

Pesquisou-se também o conteúdo qualitativo e quantitativo das amostras em monossacarídeos pela análise em HPLC, com prévia hidrólise ácida em: extrato inicial de BE e BP, HWBE e HWBP e de BE3 e BP3. Procedeu-se também a análise colorimétrica ácido fenólica de açúcares, em espectrofotometria, a 490nm. A análise quantitativa de açúcares foi feita, com recurso ao método da análise cromatográfica em HPLC, pelo método do padrão interno utilizando-se o cálculo de regressão linear dos mínimos quadrados. Todos estes métodos permitiram chegar ao teor quanto ao conteúdo (quantitativo e qualitativo) de monossacarídeos, dos extratos: inicial de BE e BP, de H WBE e HWBP e de BE3 e BP3. Verificou-se então que as frações BE3 e BP3, para além de baixo teor de açúcares já identificados em (Cardoso,2012), continham quantidades significativas de ribose, o que sugeria a presença de ARN. A pesquisa de ARN foi confirmada no nosso sistema cromatográfico pela deteção de um pico muito semelhante ao libertado pelo do padrão puro de ribose, (e não de padrão de desoxirribose), introduzido no HPLC. O espectro de ultravioleta visível obtido para estas frações foi um espectro típico de ácidos nucleicos: absorvância máxima a 260nm em UV-Vis.

O tratamento destas frações com DNase e a análise por eletroforese em gel de agarose com coloração de brometo de etídio, permitiu a identificação de uma banda para cada uma das amostras BE3 e BP3, inferior a 100 pares de bases, característica e identificativa de ácidos nucleicos.

Também a anterior identificação de açúcar maioritário, nos extratos, como sendo a ribose e não a desoxirribose, aliado ao fato do tratamento destas frações com transcriptase reversa permitir a síntese do cDNA, confirmou a natureza de ARN nas amostras dos *Boletus*.

No entanto na análise da atividade anticancerígena, avaliada pela inibição da proliferação celular HT29, a fração BP3 não apresentou uma atividade significativa no teste BRdU, contrariamente à fração isolada de *Boletus edulis* (BE3) e a de *Boletus spretus* (BS4) que registaram valores de eficácia da ordem dos 90% e 85%. Este facto sugere que para a atividade biológica do ARN destes *Boletus*, a composição e/ou a conformação da biomolécula serão determinantes para a sua atividade anticancerígena.

Palavras-chave: cogumelos, *Boletus*, ação anticancerígena, biomoléculas, glícidos, melaninas, ácidos nucleicos, ribose, ARN.

Abstract

Beyond their culinary and nutritional values, mushrooms are also a source of compounds with biofunctional activities, recognized for nearly 5000 years and confirmed by *in vitro* and *in vivo* tests during the last two generations. Among these biological activities we highlight the antitumor and immunostimulatory activities whose research has been intensified since the 1990s.

Previous studies have demonstrated the existence of biopolymers, extracted with hot water from a *Boletus edulis* extract, with anticancer activity, among which we highlight the extracted fraction called BE3. The objective of this study was to determine the chemical nature of this fraction with high anticancer potential. This study also aimed to verify if this same biocompound can also be found in other mushrooms and, if so, to test its anticancer potential. For this purpose we used as raw material the film fruiting bodies of *Boletus edulis* and *Boletus pinophilus* mushrooms. The biopolymers were obtained by treating the material with 80% ethanol, at hot, to obtain the alcohol insoluble residue (AIR). The AIR was boiled in water, dialyzed and concentrated (MWcut 12-14 kDa). The fraction BE3 and also the fraction corresponding to *Boletus pinophilus* (BP3) were isolated by anion exchange chromatography with elution of the material retained with NaCl 25-0,5 M solution.

The search for soluble eumelanins in *Boletus edulis* and *Boletus pinophilus* extracts, in BE3 and BP3 fractions, was also carried out, but no significant amounts of this biopolymer were found. To perform this research, the melanin was extracted from the ink of *Sepia officinalis* undergoing oxidative cleavage and then the monomers were identified by HPLC analysis. To verify the validity of the oxidative cleavage method, in an alkaline medium, for the eumelanin monomer PDCA and PTCA, we tested in the chromatographic system the detection and identification of eumelanin PTCA and PDCA *Sepia officinalis* by HPLC. The pure PDCA and PTCA standards that were provided by Japanese laboratories were also tested in the chromatographic system.

The separation of the HWBE and HWBP extracts into different fractions (1, 2, 3, 4 e5) by anion exchange chromatography with elution with NaCl solution at increasing concentrations, has also been done.

It is also researched the qualitative and quantitative content of samples into monosaccharides by HPLC analysis, with prior acid hydrolysis: the initial extract BE and BP, and HWBE HWBP and BE3 and BP3. The phenolic acids colorimetric analysis of sugars, in spectrophotometry at 490nm, has also been performed. The quantitative analysis of sugars was made, using the method of chromatographic analysis on HPLC, by the internal standard method using the method of linear regression least squares. All these methods have resulted on the determination of the monosaccharides content (quantitative and qualitative) in the extracts: initials BE and BP, HWBE and HWBP and BE3 and BP3. It has been found that the BE3 and BP3 fractions, as well, has low quantity sugars that have been identified in (Cardoso, 2012), they also contained significant amounts of ribose, suggesting the presence of RNA. The RNA research was confirmed in our chromatographic system for the detection of a very similar peak to off by the pure ribose default (not deoxyribose default), introduced in HPLC. The visible ultraviolet spectrum obtained for these fractions was typical for nucleic acids: maximum absorbance at 260nm UV-Vis.

The treatment of these fractions with DNase and analysis by agarose gel electrophoresis, with ethidium bromide staining, led to the identification of a band for each of the samples BE3 and BP3, less than 100 base pairs, which is characteristic and identifier of nucleic acids.

Also the previous identification of majority sugar in the extracts as ribose (instead of deoxyribose) together with the fact that the treatment of these fractions with reverse transcriptase allows cDNA synthesis, attested the RNA nature in the *Boletus* samples.

However in the analysis of anticancer activity, as assessed by inhibition of HT29 cell proliferation, the BP3 fraction showed no significant activity in test BrdU, unlike the isolated fraction *Boletus edulis* (BE3) and the *Boletus spretus* (BS4) that registered values of effectiveness of the order of 90% and 85%. This suggests that for the biological activity of this RNA *Boletus*, the composition and / or conformation of the biomolecule will determine their anticancer activity.

Keywords: mushrooms, *Boletus*, anticancer action, biomolecules, glicids, melanin, acid nucleic acid, ribose, RNA.

Índice

DEDICATÓRIAS.....	III
AGRADECIMENTOS	V
RESUMO	VII
ABSTRACT	IX
ÍNDICE	XI
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
LISTA DE FIGURAS.....	XV
LISTA DE TABELAS	XVII

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A utilização dos cogumelos pelo Homem	1
1.1.1 Investigação sobre os efeitos terapêuticos de biocompostos de cogumelos nos séculos XX e XXI.....	3
1.1.2 Efeitos dos compostos bioativos de cogumelos	5
1.1.3 Efeitos sistémicos dos cogumelos	6
1.1.4 As funções dos polissacarídeos dos cogumelos	8
1.2 Pesquisas recentes sobre biocompostos anticancerígenos de cogumelos	9
1.3 A melanina dos cogumelos como possível biocomposto antitumoral	17
1.4 Apresentação do trabalho experimental	18
1.4.1 As espécies em estudo, <i>Boletus edulis</i> e <i>Boletus pinophilus</i>	18
1.5. Enquadramento e objetivos do trabalho.....	23

CAPÍTULO 2

MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1. Fungos em estudo	27
2.2 Extração, isolamento e purificação dos biopolímeros	27
2.2.1 Extração e isolamento	27
2.2.2 Purificação dos biopolímeros	28
2.3 Caracterização química das frações	30
2.3.1 Análise da composição das amostras em açúcares	30
2.3.2 Determinação colorimétrica dos açúcares totais pelo método do fenol-acido Sulfúrico.....	33

2.4	Análise por espectroscopia de ultravioleta visível (UV-Vis)	33
2.5	Análise de eumelaninas.....	34
2.5.1	Isolamento das eumelaninas da tinta do choco (<i>Sepia officinalis</i>).....	34
2.5.2	Separação do PDCA e PTCA por cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC).	36
2.6	Pesquisa de proteínas	36
2.6.1	Análise do teor de azoto	36
2.7	Pesquisa de ácidos nucleicos	37
2.7.1	Espectrofotometria de absorção UVvis (Ultra-Violeta visível)	37
2.7.3	Electroforese em agarose	37
2.7.4	Remoção rápida de ADN- K2981- descrição do Kit –	37
2.7.5	Transcrição reversa do ARN para posterior sequenciação	38
2.8	Análise da atividade antitumoral	39
2.8.1	Linhas celulares	39
2.8.2	MTT - avaliação da proliferação celular.....	40
2.8.3	Ensaio BrdU - avaliação da proliferação celular.....	41
2.9	Análise estatística.....	42
 CAPÍTULO 3		
RESULTADOS E DISCUSSÃO		
43		
3.1	Isolamento e composição do material de elevado peso molecular, da película do carpóforo.....	43
3.2	Fracionamento do HMWM por cromatografia de troca aniónica.....	46
3.3	Pesquisa de presença de melaninas nas frações BE3 e BP3	51
3.4	Pesquisa de ácidos nucleicos nas frações BE3 e BP3.....	55
3.4.1	Atividade antitumoral das frações BE3 e BP3 para as células de carcinoma de cólon, HT29.....	61
3.5	Conclusões	64
 REFERÊNCIAS.....		
65		

Lista de Abreviaturas

BE- amostra do extrato da película do carpóforo de *Boletus edulis*

BP- amostra do extrato da película do carpóforo de *Boletus pinophilus*

BEci e **BPci**- amostras iniciais só congeladas e liofilizadas

BE_{wsm} e **BP_{wsm}** - material solúvel em água

BE_{HWM} e **BP_{HWM}**- material dos *Boletus edulis* e *B.pinophilu*, solúvel em água e de elevado peso molecular, \geq que 12- 14 kDa

HMWM- material (extrato) solúvel em água de elevado peso molecular

HMWSB - extrato de *Boletus* solúvel em água de elevado peso molecular

AIR – material das amostras, resíduo insolúvel em álcool etílico

BE₃, **BP₃** – fracções nº3, dos extratos isolados e purificados, de *Boletus edulis* e *Boletus pinophilus*

HPLC- cromatografia líquida de elevada eficiência

HPLAEC- cromatografia líquida, de elevada eficiência, de troca aniónica

PDCA - ácido pirrolo-2,3,5-tricarboxílico

PTCA- ácido pirrolo-2,3-carboxílico

DHI-5,6 – dihidroxiindole

DHICA-5,6 – dihidroxiindole -2-acido carboxílico

MW cutoff 12-14 kDa -Membrana de dialise em água, de porosidade 12-14 kDa.

CCD 841 CoTr ou **SV40**-Células que contem sequencias de ADN de poliomavírus

Lista de figuras

Figura 1: <i>Ganoderma lucidum</i> , um dos cogumelos medicinais mais bem conhecido (Dominguez, 2008).....	2
Figura 2: Fórmula de estrutura do ácido ganoderico extraído de <i>Ganoderma lucidum</i> com propriedades terapêuticas (Patel & Goyal, 2012).....	2
Figura 3: Representação esquemática da estrutura molecular de β -glucanas: (a) $\beta(1 \rightarrow 3)$ D-glucanas; (b) $\alpha(1 \rightarrow 3)$ D-glucanas (D. D. D. Silva, Rapior, Fons, Bahkali, & Hyde, 2012).....	8
Figura 4: Algumas espécies de cogumelos estudados com potencial anticancerígeno (Patel e Goyal, 2012).....	10
Figura 5: Ilustração da organização das hifas num Basidiomiceto.	19
Figura 6: Esquema do Ciclo de Vida de um Cogumelo (Basidiomicete).	19
Figura 7: Ilustração da constituição básica de um cogumelo e libertação de esporos maduros (figura adaptada de (Paulino, 1998) pag. 77).	20
Figura 8: Carpóforo de <i>Boletus edulis</i> (Foto de G. Marques).	21
Figura 9: <i>Boletus</i> no seu habitat.	22
Figura 10: Ilustração de um Basidiomycete do género <i>Boletus</i> em simbiose com <i>Pinus</i>	22
Figura 11: Carpóforo de <i>Boletus pinophilus</i> (Foto de G. Marques).	23
Figura 12: Indução, pelos biopolímeros, de BE3 e BE4, da paragem do ciclo celular na fase G0/G1 (M. K. Lemieszek et al., 2013).....	24
Figura 13: Esquema do procedimento para a extração e purificação dos biopolímeros de <i>Boletus edulis</i> e <i>Boletus pinophilus</i>	29
Figura 14: Esquema do procedimento da hidrólise ácida, dos açúcares das amostras BE e BP, até à injeção na coluna de troca iónica.	31
Figura 15: Cromatograma obtido para a análise de açúcares da amostra BE.	32
Figura 16: Degradação oxidativa da eumelanina em meio alcalino.	35
Figura 17: Monómeros (DHI e DHICA) do polímero eumelanina.....	35
Figura 18: Cromatograma da análise de açúcares por HPAEC do HMWM de <i>Boletus edulis</i>	45
Figura 19: Cromatograma da análise de açúcares por HPAEC do material de alto peso molecular solúvel em água do <i>Boletus pinophilus</i>	46
Figura 20: Cromatograma de cromatografia de troca iónica obtido no fracionamento do WSM de <i>Boletus edulis</i>	47
Figura 21: Cromatograma obtido por análise de açúcares das fracções recolhidas após cromatografia de troca aniónica do WSM de <i>Boletus edulis</i>	47
Figura 22: Cromatograma de cromatografia de troca iónica obtido no fracionamento do WSM de <i>Boletus pinophilus</i>	48

Figura 23: Cromatograma obtido por análise de açúcares das fracções recolhidas após cromatografia de troca aniónica do WSM de <i>Boletus pinophilus</i> .	49
Figura 24: Cromatograma dos açúcares de BE3.	50
Figura 25: Cromatograma dos açúcares de BP3.	50
Figura 26: (a) Cromatograma obtido para os produtos de oxidação da melanina do choco e padrões de (b) PDCA e (c) PTCA e respectivos espectros (d) e (e) de ultravioleta-visível.	52
Figura 27: a) Cromatograma obtido para os produtos de oxidação do extrato de BE3. b) Cromatograma obtido para os produtos de oxidação do extrato de PE3.	54
Figura 28: Tempo de retenção do padrão de desoxirribose no nosso sistema cromatográfico.	55
Figura 29: Tempo de retenção do padrão de ribose, no nosso sistema cromatográfico.	56
Figura 30: Cromatograma de ribose (identificativo da libertação de ribose, a partir de ARN).	57
Figura 31: Espectros de Absorvância em, espectroscopia de Ultravioleta Visível (UVVis), das amostras BE3 (linhas pretas e verdes) e BP3 (linha vermelha).	58
Figura 32: Eletroforese em Gel de Agarose de BE3 e BP3, respetivamente da esquerda para direita.	59
Figura 33: Eletroforese em Gel de Agarose de BE3 e BP3, respetivamente, original e após tratamento com a DNase.	60
Figura 34: Transcrição reversa do ARN assinalado com a seta a vermelho. A nomenclatura BE e BP corresponde à amostra utilizada e à nomenclatura, O e/ou H corresponde ao tipo de priming utilizado, O- Oligo-dT e H-Random Hexamer.	60
Figura 35: (a) Ação antiproliferativa de BE3 nas linhas celulares HT29. (b) Ação antiproliferativa de BP3 nas linhas celulares HT29. (c) Ação antiproliferativa de BS4 nas linhas celulares HT29.	62

Lista de Tabelas

Tabela 1: Espécimes de cogumelos, efeitos anticancerígenos dos seus biocompostos.	11
Tabela 2: Identificação dos açúcares constituintes da fracção BE3.....	32
Tabela 3: Componentes e quantidades para remoção rápida de ADN- K2981.....	38
Tabela 4: Mistura de reação para transcrição reversa do ARN.....	39
Tabela 5: Condições do termociclador.....	39
Tabela 6: Valores obtidos da medição colorimétrica de liofilizado de <i>Boletus edulis</i> e <i>Boletus pinophilus</i> . Os valores apresentados correspondem à média \pm desvio padrão (n=3).....	43
Tabela 7: Rendimentos obtidos para o isolamento do material, de alto peso molecular solúvel em água, dos carpóforos dos cogumelos.	44
Tabela 8: Composição em Açúcares (g/100g) das amostras inicia BEc e BPc, BEWSM e BPWSM e das frações BE3 e BP3.....	45
Tabela 9: Valores de Azoto nas amostras BE e BP no WSM, calculado pelo método de Dumas.	51
Tabela 10: Valores de absorvância das Amostras BE3 e BP3 obtidos a 260 e a 280 nm e relações entre valores obtidos.....	58
Tabela 11: Composição em açúcares e rendimento da fracção BS4 isolado de <i>Boletus spretus</i> (Cardoso, 2011).	63

Capítulo 1

Introdução

1.1 A utilização dos cogumelos pelo Homem

A utilização de cogumelos na alimentação e na medicina tradicional tem uma longa história e extensa geografia, abrangendo todo o Oriente, certas regiões de África, bem como os continentes Europeu e Americano (por exemplo, na gastronomia do período do império romano, ou no uso psicotrópico na civilização Maia). O seu uso acompanha o Homem desde tempos ancestrais, comprovado por registos fósseis. Um exemplo é a múmia designada por Ötzi, com cerca de 5300 anos, encontrada em 1991 nos Alpes (Capasso, 1998). Entre os objetos que transportava, encontraram-se porções de cogumelo da espécie *Piptoporus betulinus* e uma larga porção de outro cogumelo da espécie *Fomes fomentarius*. Estes fungos eram tradicionalmente utilizados para fazer e transportar fogo e como medicamentos para cicatrizar feridas ou para fazer chá com objetivo revigorante (Hobbs, 1995).

É também documentado na farmacopeia chinesa o uso de inúmeras espécies de cogumelos na prática médica tradicional, sendo utilizados para uma ampla gama de doenças, desde etologias infecciosas de pele, do sistema digestivo, do aparelho respiratório a doenças degenerativas (Sullivan, Smith, & Rowan, 2002). Os cogumelos têm sido utilizados, segundo a história da medicina, como promotores do aumento das defesas do organismo dum modo geral (Begell, 2005; Sullivan et al., 2002; S. P. Wasser, 2010).

No Oriente, há cerca de 3000 anos, houve o reconhecimento escrito de que os cogumelos traziam benefícios de saúde valiosos. Os cogumelos são consumidos desde há muitos séculos, no oriente, para preservar a juventude, a longevidade, o vigor e a boa saúde (Yang, 1998). Pode-se assim, afirmar que foram atribuídas propriedades curativas ou estimulantes aos cogumelos desde há alguns milhares de anos. Com o avanço da ciência experimental no séc. XX, e a partir da segunda metade desse século, fizeram-se vários estudos sobre os seus efeitos

biológicos, intensificando-se a pesquisa em hospitais e universidades de certos países como o Japão, os Estados Unidos da América, o Brasil, a Rússia, a China e a Coreia.

Com o aparecimento de pandemias do foro imunitário (como a SIDA nos anos 80), os estudos sobre a interação de biocompostos e o sistema imunitário adquiriu um interesse crescente. Atualmente são conhecidos cerca de 200 espécies de fungos basidiomicetas que produzem compostos bioactivos e presentemente a comunidade científica tenta responder a questões sobre a estrutura química, a ligação com a atividade anti-tumoral, formas possíveis de modificação química, o uso clínico antitumoral ou imunoestimulante destes biocompostos, bem como os mecanismos da acção celular (S. P. Wasser, 2010).

Um dos cogumelos mais conhecidos e estudado desde sempre pelas propriedades medicinais é a espécie *Ganoderma lucidum* da família Ganodermataceae (Fig. 1), vulgarmente conhecido como “cogumelo da imortalidade”, também chamado *Língzhī* em chinês, *Reishi* em japonês e *Yeongji* em coreano. Tem sido tradicionalmente administrado em toda a Ásia como agente revigorante e terapêutico (Wasser e Weis, 1999) e é citado em vários documentos que fazem parte da história da medicina oriental (Yang, 1998).



Figura 1: *Ganoderma lucidum* um dos cogumelos medicinais mais conhecido (Dominguez, 2008).

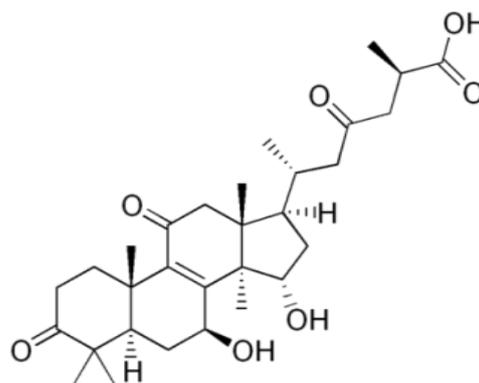


Figura 2: Fórmula de estrutura do ácido ganodérico, extraído de *Ganoderma lucidum*, com propriedades terapêuticas.

Na China foram compilados os efeitos benéficos, de várias espécies de cogumelos no "*Shen Nong Ben Cao Jing*". Traduzido em "*The Divine Farmer`s Classic Medica Materia*", uma espécie de compilação de tradições orais médicas, escrita durante a dinastia *Han*, entre 206 a.C e 220 d.C., com origem no herbalista chinês *Shen Nong* que se estima tenha vivido há cerca de 5000 anos. Demonstra-se aí o conhecimento e a utilização milenar de *Lingzhi* ou *Reishi*, ao descrever alguns dos seus efeitos: "*Afecta positivamente o "Qi "do coração, reparando a zona peitoral e beneficiando aqueles que têm um peito congestionado. Tomado ao longo de um grande período de tempo mantém a agilidade do corpo, e os anos são prolongados*" (Yang, 1998).

Os fungos do género *Ganoderma* são dos mais apreciados no Oriente para efeitos medicinais, desde há alguns milhares de anos, mas hoje em dia é confirmado cientificamente que fungos deste género têm efeito anticancerígeno por si só ou em combinação com os tratamentos convencionais do cancro como a quimioterapia e a radioterapia (Pillai, Nair, & Janardhanan, 2010). O uso de *Ganoderma* e de outros cogumelos como complemento nutricional e complemento terapêutico é assim muito grande (Fig. 2). Trata-se de uma herança do avançado conhecimento e sabedoria do Oriente com cerca de 5000 anos.

1.1.1 Investigação sobre os efeitos terapêuticos de biocompostos de cogumelos nos séculos XX e XXI.

A extração, purificação e aplicação dos extratos de cogumelos como agentes terapêuticos são feitas, em grandes números de casos, a partir de fungos basidiomicetas que apresentam polissacárideos biologicamente ativos, podendo ser extraídos dos corpos de frutificação, do micélio cultivado ou da solução do meio de cultura.

O conhecimento ancestral sobre cogumelos e a pesquisa atual sobre as propriedades estimulantes do sistema imunitário bem como o seu papel de coadjuvante terapêutico, incentivaram a pesquisa bioquímica dos seus compostos nas últimas quatro décadas de modo significativo. A descoberta da estrutura química de alguns biocompostos e a sua identificação como sendo polissacárideos com propriedades antitumorais e imunoestimulantes trouxe melhorias significativas em muitos doentes, consolidando os processos de convalescença. Vários compostos extraídos dos cogumelos, concretamente os polissacárideos, conseguiram passar as fases I, II e III dos testes clínicos, no Ocidente, sendo já amplamente utilizados há

muitos anos, com sucesso, na Ásia, em contexto hospitalar no tratamento de várias degenerescências incluindo as cancerígenas e as do foro imunitário (H.-M. Chang & But, 1993; Sullivan et al., 2002; Pereira, 2011). Concretamente, a pesquisa sobre a composição química dos compostos anticancerígenos e imunomoduladores dos cogumelos intensificou-se de modo experimental desde há cerca de cinco décadas (Borchers, Krishnamurthy, Keen, Meyers, & Gershwin, 2008).

Desde 1981, mais de 100 trabalhos foram publicados acerca do isolamento de componentes químicos do fungo *Ganoderma lucidum* e das suas atividades biológicas. Os efeitos farmacológicos e bioquímicos de *Ganoderma lucidum* incluem acção anti-inflamatória, efeito hipoglicémico, inibição da agregação trombótica, restauração da função hepática, ação anti-hipertensiva, tratamento de miotonia e da distrofia muscular, efeito antitumoral, estimulador do sistema nervoso central e imunomodulador. Os extratos alcoólicos do fungo *Ganoderma lucidum* apresentam também efeitos de proteção contra danos no fígado provocados por excesso de químicos (Cai et al., 2010)

Em estudos, “*invitro*”, dos efeitos do extrato etanólico de *Ganoderma lucidum*, sobre o crescimento de carcinoma gástrico humano (linha celular AGS), observou-se a diminuição da viabilidade dessas células. Os autores relataram a inibição da invasão tumoral e de metástases pelo ácido ganodérico T, um triterpenóide de lanostano (N.-H. Chen & Zhong, 2011). Também um glicopéptido nativo de *Ganoderma lucidum* LZ-D-4, e seu derivado sulfatado, LZ-D-9, inibiram o crescimento de células tumorais da leucemia linfocítica (L1210) de ratinho, em testes *in vitro* (Ye et al., 2009).

Durante séculos a justificação para a utilização medicinal dos cogumelos foi de natureza empírica, sem que nada se soubesse sobre a composição e função bioquímica dos seus extratos (DaSilva, 2005; Yang, 1998). No entanto, nas últimas quatro décadas, esta utilização vem sendo apoiada cientificamente, com vários estudos laboratoriais e ensaios clínicos.

A título demonstrativo citam-se trabalhos sobre os efeitos medicinais antidegenerativos dos cogumelos, da primeira década do séc. XXI, em trabalhos de diversos autores (Cardoso, 2011; J. Cui & Chisti, 2003; Denisova, 2010; Ebina & Fujimiya, 1998; Ebrahimzadeh, Nabavi, Nabavi, & Eslami, 2010; Fantuzzi et al., 2010; Shosuke Ito & Wakamatsu, 2007; Jander-Shagug & Masaphy, 2010; Lai, Abidin, Abdullah, & Sabaratnam, 2010; Lorenzen & Anke, 1998; T Mizuno, 1996; Takashi Mizuno, 1999; Ooi & Liu, 1999; Patel & Goyal, 2012; Radic

et al., 2010; Reshetnikov & Tan, 2001, 2001; Saritha & Pandey, 2010; A. C. Silva & Jorge, 2011; Singh, Bhari, & Kaur, 2010; Tomomatsu, 1994; S. P. Wasser & Weis, 1999, 1999; S. Wasser, 2002; Zaidman, Yassin, Mahajna, & Wasser, 2005; Zeise, Murr, & Chedekel, 1992; M. Zhang, Cui, Cheung, & Wang, 2007).

1.1.2 Efeitos dos compostos bioativos de cogumelos

Ficou comprovado com inúmeros testes e ensaios clínicos, sobretudo nos últimos quinze anos, que os extratos de muitos cogumelos funcionam como biocompostos terapêuticos com diversas funções. Salienta-se a ação antioxidante, antivírica e anticancerígena, de extratos e de cogumelos inteiros (D. D. D. Silva et al., 2012). Destacam-se ainda as funções antibióticas, anti-inflamatórias, antitumorais e imunomoduladoras confirmadas em alguns estudos recentes (Begell, 2005; DaSilva, 2005; Patel e Goyal, 2012). Porém, os efeitos que têm suscitado mais interesse, recentemente, são o anticancerígeno e o estimulador do sistema imunitário. Hoje existe uma maior compreensão dos efeitos específicos e generalizados a nível dos indivíduos e das populações afetadas por patologias em que se verifica estreita relação entre a diminuição das funções do sistema imunitário e o desenvolvimento de degenerescências celulares. Por outro lado, reconheceu-se, nas últimas quatro décadas, a função imunoestimuladora dos biocompostos de muito cogumelos em ratinhos de laboratório e no Homem. (Patel e Goyal, 2012). Estimulando então o sistema imunitário e melhorando o prognóstico de doenças crônicas degenerativas, os cogumelos são vistos, pela farmacopeia ocidental, como promissoras fontes de fármacos para patologias resultantes da sociedade global do sec. XXI (Patel & Goyal, 2012; Sullivan et al., 2002; S. P. Wasser, 2011).

Cada espécie de cogumelo apresenta uma composição química e molecular específica, que têm vindo a ser identificadas por numerosos estudos bioquímicos, o que os torna únicos e simultaneamente coadjuvantes em terapias convencionais direcionadas, sendo também eficazes na manutenção da vitalidade (Stamets, 2005).

Os efeitos bioativos dos cogumelos são atribuídos concretamente a espécies como *Agaricus brasiliensis*, *Cordyceps sinensis*, *Flammulina velutipes*, *Fomes fomentarius*, *Ganoderma applanatum*, *G. lucidum*, *G. oregonense*, *Grifola frondosa* (Maitake), *Hericium erinaceus*, *Inonotus obliquus* (Chaga), *Lentinula edodes* (Shiitake), *Phellinus linteus*, *Piptoporus betulinus*, *Pleurotus ostreatus*, *Polyporus sulphureus* e *Polyporus umbellatus* (Stamets, 2005).

As preparações, de cogumelos secos ou em pó, usados para infusões, são utilizadas em contexto clínico em vários países asiáticos. (Teplyakova et al., 2012). Refere-se o Japão, a China, a Coreia, a Rússia como países utilizadores tradicionais e atuais na prática medicinal, utilizando esses biocompostos como elementos terapêuticos e coadjuvantes de outras terapias de um modo recorrente (DaSilva, 2005; Patel & Goyal, 2012; Sullivan et al., 2002).

Vários estudos estão a decorrer utilizando extratos ou cogumelos inteiros bem como a ingestão contínua e prolongada na dieta de várias populações amostra. Muitos testes *invitro*, em animais e no Homem, comprovam a eficácia de extratos cujos compostos são essencialmente polissacarídeos. Os efeitos destes são efetivos e muito específicos, em numerosas patologias, desde estados de imunodepressão, ao descontrolo da expressão génica celular (Radic et al., 2010).

O crescimento da “indústria micológica” com fins gastronómicos, e nas últimas décadas com fins farmacológicos, fez com que o levantamento e estudo de espécies existentes fossem aumentando.

1.1.3 Efeitos sistémicos dos cogumelos

A modelação do sistema imunitário tem sido uma característica da medicina holística chinesa e é referida como terapia *Fu Zheng*. Esta no Oriente pode ser considerada equivalente de imunoterapia no Ocidente. Compostos derivados de certos cogumelos são usados extensivamente no Oriente para aumentar a resistência a doenças e mesmo como medicamentos terapêuticos (Sullivan et al., 2002).

Muitos compostos dos cogumelos ativam a produção e a ação de células do sistema imunitário (macrófagos, monócitos, neutrófilos, células “natural killer“, células dendríticas) mas também a produção de mensageiros químicos como citoquinas (interleucinas, interferões, estimuladores de fatores coloniais) que desencadeiam “resposta complementar“ e respostas de fase aguda (Patel & Goyal, 2012; Sullivan et al., 2002). Aqueles compostos são também capazes de induzir ou inibir a expressão de genes de uma variedade de citoquinas imunomoduladoras e de recetores membranares de citoquinas.

Os efeitos dos compostos destes fungos, não deixam de surpreender, quer pela sua eficácia quer pelo amplo espetro de ação. Demonstrativo disto, são os efeitos e funções benéficos nos

animais testados, inicialmente em cobaias de laboratório e posteriormente confirmados no Homem. O espectro de ação nos organismos é vasto, desde os efeitos já citados a outros como o antiperoxidativo e o da eliminação de radicais livres oxidantes. São notáveis também certos efeitos mais específicos, recentemente confirmados, como a ação *anti-papiloma vírus humano* (HPV) (Lai et al., 2010), e na inibição do crescimento das células de hepatoma, por indução de apoptose das células cancerígenas (Y. S. Lee et al., 2010).

Foram, também, utilizados extratos de cogumelos como coadjuvantes de quimio e de radioterapia, reduzindo significativamente os efeitos colaterais agressivos, (enjoo, náuseas, vômitos, redução das defesas naturais do organismo e perda de peso) destas terapias, funcionando também como imunoprotetores ao incrementar as defesas naturais do organismo que sofrem um decréscimo durante aqueles tratamentos. Tudo isto é constatado por numerosos doentes que recorrem a ingestão de extratos ou de cogumelos inteiros, como forma de terapia coadjuvante, mas tem vindo, também, a ser comprovado com ensaios laboratoriais e testes clínicos, nas últimas quatro décadas (Patel & Goyal, 2012; S. P. Wasser, 2010).

Curioso também ter-se verificado ação antitrombolítica e fibrinolítica que foi verificada por ação enzimática de compostos de basidiomicetes (Denisova, 2010).

Os compostos bioativos estão presentes quer nos extratos aquosos, quer no corpo do cogumelo inteiro, conforme verificado em *Agaricus brasiliensis* por consumo contínuo e prolongado (Denisova, 2010; S. P. Wasser, 2010).

A quantidade de benefícios que podemos receber de alguns cogumelos medicinais, como *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes*, *Trametes versicolor*, *Schizophyllum commune*, *Grifola frondosa*, é considerável, podendo ter impacto não só na saúde e economia individual, bem como na economia, por exemplo, de muitos países ocidentais do séc. XXI. As suas populações, com pirâmides etárias invertidas, vão sendo exponencialmente afetadas por doenças degenerativas e do sistema imunitário que podem ser combatidas ou mesmo prevenidas com o consumo regular e orientado destes compostos fúngicos bioativos.

1.1.4 As funções dos polissacarídeos dos cogumelos

Em resultado da investigação efetuada nas últimas cinco décadas sobre polissacarídeos derivados dos cogumelos verificou-se que estes compostos são capazes de modular as respostas imunitárias em animais, incluindo o Homem, sendo inibidores de certos crescimentos tumorais (Patel & Goyal, 2012; Sullivan et al., 2002).

Os cogumelos medicinais são assim uma fonte muito rica de polissacarídeos e de glicoproteínas. A maioria destes compostos está presente no filo Basidiomycota (D. D. D. Silva et al., 2012).

Após 1960, investigadores japoneses iniciaram estudos sistemáticos sobre as substâncias nos cogumelos capazes de inibir o crescimento de tumores (Takashi Mizuno, 1999). Aqueles verificaram que a maioria dos cogumelos com atividade antitumoral apresentavam na sua composição o $\beta(1 \rightarrow 3)$ D-glucano (Fig. 3), polissacarídeo que faz aumentar o número e a atividade de células do sistema imunitário, como as “natural killer”, linfócitos T e macrófagos de um modo geral. Os polissacarídeos são os mais conhecidos e até agora as mais potentes substâncias encontradas nos cogumelos com propriedades antitumorais e imunomoduladoras. (Ooi e Liu, 1999; Reshetnikov e Tan, 2001; Wasser, 2002).

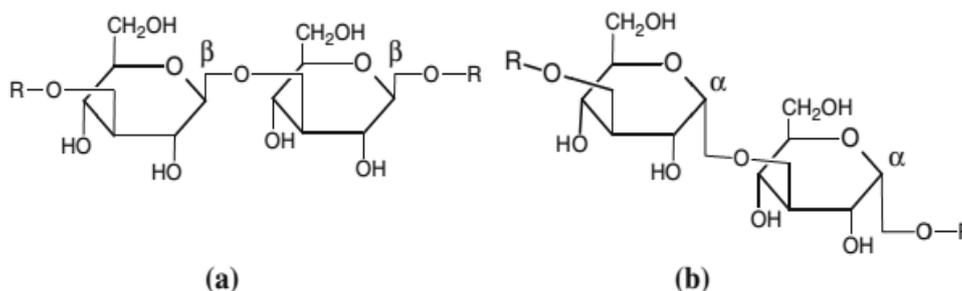


Figura 3: Fórmula de estrutura molecular de β – glucanas: (a)- $\beta(1 \rightarrow 3)$ D-glucanas; (b) - $\alpha(1 \rightarrow 3)$ D-glucanas (D. D. D. Silva et al., 2012).

O polissacarídeo B-glucano é o metabolito mais versátil devido à sua atividade de amplo espectro biológico. Estes, β -glucano $\beta(1 \rightarrow 3)$ (Fig. 3), apresentam uma cadeia de unidades de glicose, com resíduos ligados por ligações B-glucano $\beta(1 \rightarrow 3)$. As ligações-glicosídicas, apresentam muitas vezes resíduos de glicose na cadeia lateral, acompanhados por ligações $\beta(1 \rightarrow 6)$ (J. Chen & Seviour, 2007). Atribui-se às suas ligações β -glucano a eficácia das propriedades terapêuticas, e em menor grau aos complexos químicos de polissacarídeos com proteínas.

Muitos recetores destes β -glucanos foram encontrados em células do sistema imunitário (neutrófilos, monócitos, macrófagos, células “natural kiler”, linfócitos B e linfócitos T) daí “entender-se” a interação daqueles com esse sistema. Por exemplo, os polissacarídeos de cogumelos comestíveis sendo ingeridos com regularidade e por período de tempo prolongado, são agora considerados como biocompostos capazes de modular as respostas imunitárias (Patel & Goyal, 2012; Sullivan et al., 2002).

Um número limitado de compostos polissacarídicos altamente purificados, derivados de certos cogumelos medicinais, é utilizado concretamente no Japão e na China, em contexto hospitalar. Estes produtos e o seu grau de pureza farmacêutica são aí alvo de contínua investigação. A falta de obtenção de pureza e de caracterização química destes produtos, até agora, foram um entrave à utilização deste biorrecurso, quer na produção farmacêutica quer como prática recorrente na medicina do ocidente. Urge, pois, fazer mais pesquisa para colmatar esta falha.

1.2 Pesquisas recentes, *in vitro* e *in vivo*, sobre efeitos bioativos dos cogumelos

Nesta secção é apresentada uma síntese de várias espécies de cogumelos com potencial bioativo e de efeitos anticancerígenos, confirmados com pesquisas científicas, *in vitro* e/ou *in vivo*, na primeira década do século XXI. A síntese apresentada na tabela 1 tem por base uma revisão da pesquisa científica feita na última década. Na figura que se segue (Fig. 4) estão sinalizadas as principais espécies de cogumelos com potencial anticancerígeno, muitos deles estudados e testados por cientistas de várias nacionalidades (Tabela 1).



Figura 4: Algumas espécies de cogumelos estudadas com potencial anticancerígeno (Patel and Goyal, 2012).

Tabela 1: Espécies de cogumelos, efeitos anticancerígenos dos seus biocompostos

Espécies de cogumelos	Efeitos bioativos dos seus biocompostos (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>)	Referências
<i>Agaricus bisporus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Propriedades antiproliferativas e pro-apoptóticas, inibindo o crescimento de tumores da próstata em ratos atímicos. • A atividade antioxidante do extrato etanólico, <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>, verificou-se ser devida a compostos fenólicos do extrato. • Lectinas e proteínas de <i>Agaricus bisporus</i> são estimulantes para o sistema imunológico. O extrato de <i>Agaricus bisporus</i> pode prevenir a proliferação de células do cancro da mama. • Ácido linoleico, conjugado, inibiu o desenvolvimento de linhas celulares de cancro da próstata <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> em ratos. 	<p>(Adams, Phung, Wu, Ki, & Chen, 2008)</p> <p>(Liu, Jia, Kan, & Jin, 2013)</p> <p>(H.-H. Chang, Chien, Tong, & Sheu, 2007)</p> <p>(Adams et al., 2008)</p>
<i>Agaricus blazei</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Induz a apoptose em linha de células leucémicas. • Verificaram-se efeitos inibidores em células de leucemia mielóide humana. Revelou-se coadjuvante na quimioterapia do cancro; inibe o crescimento de vários tipos de células tumorais. • Evidenciou-se o papel imunomodulador, anticancerígeno e antimutagénico com base nos estudos da sua ação sobre a clastotumorogénese induzida pela ciclofosfamida (CP) em camundongos. <p>O extracto JAB80E70 mostrou a actividade mais potente como inibidor do crescimento tumoral selectivo, contra a leucemia humana em linhagens celulares <i>in vitro</i>. Os ensaios de fragmentação de ADN e a detecção de morte celular por ELISA mostraram que a fracção induz a apoptose em células NB-4.</p>	<p>(Akiyama et al., 2011)</p> <p>(C.-F. Kim, Jiang, Leung, Fung, & Lau, 2009)</p> <p>(Delmanto et al., 2001)</p>
<i>Antrodia cinnamomea</i>	<ul style="list-style-type: none"> • O extrato dos corpos de frutificação <i>Antrodia cinnamomea</i> suprime o podel invasivo da linhagem celular PLC/PRF/5 de cancro de fígado humano através da inibição de um fator nuclear. 	<p>(Y.-L. Hsu et al., 2007)</p>
<i>Antrodia camphorata</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Verificou-se inibição da enzima ciclo-oxigenase-2 e a indução de apoptose em células cancerosas, não recetoras de estrogénio • Extratos combinados de <i>A. camphorata</i> com agentes anti-tumorais apresentam efeitos coadjuvantes na terapia do hepatoma humano, em células cancerosas multirresistentes. • Efeitos apoptóticos, de uma fracção de micélio de <i>A. camphorata</i> isolada por HPLC, em células de carcinoma de pulmão. 	<p>(Hseu et al., 2007)</p> <p>(C.-Y. Chang et al., 2008)</p> <p>(Chang et al., 2010)</p>

Espécies de cogumelos	Efeitos bioativos dos seus biocompostos (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>)	Referências
<i>Ganoderma lucidum</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Atividade antivírica dos extratos no vírus do papiloma Humano (HPV). 	(Lai et al., 2010)
<i>Ganoderma tsugae</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Inibição do crescimento de células de cancro do colon retal através da interrupção do ciclo celular em G2/M, com extratos deste cogumelo. 	(S.-C. Hsu et al., 2008)
<i>Grifola frondosa</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Considerado medicinal por aumentar a vitalidade de um modo geral. • O B-glucano purificado, a partir deste cogumelo, aumenta a eficácia do agente anticancerígeno cisplatina, verificando-se um aumento no número de células imunocompetentes, como macrófagos, DCs e células “natural.killer” em camundongos tratados com cisplatina. • Indução de apoptose em células de SGC-7901, por um péptido polissacarídeo, GFPS1b, do micélio cultivado, GF9801. 	(Masuda, Inoue, Miyata, Mizuno, & Nanba, 2009) (F.-J. Cui et al., 2007)
<i>Hericiium erinaceus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Efeito antitumoral e efeito imunomodulador • Efeitos anti-tumorais de extractos em ratinhos portadores de tumores. 	(Wang, Luo, & Liang, 2004) (S. P. Kim, Kang, Kim, Nam, & Friedman, 2011)
<i>Hericiium erinaceus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • O extrato aumenta a apoptose em células de carcinoma hepatocelular humano, induzida por doxorrubicina.. 	(J. S. Lee & Hong, 2010).
<i>Flammulina velutipes</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Possui uma proteína imunomoduladora fúngica- FIP-E-ativadora dos linfócitos T humanos. Verificou-se efeito anti-tumoral, através de administração oral, no modelo de hepatoma de <i>Murino</i>. • A partir do extrato aquoso dos carpóforos foi purificada a substância anti-tumoral, flammulina. 	(H.-H. Chang, Hsieh, Yeh, Tu, & Sheu, 2010)
<i>Coprinus comatus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Demonstrados, <i>in vitro</i>, efeitos antiproliferativos de células de cancro da mama, de apoptose e de inibição na formação de colónias de células de cancro da mama, por 3 espécies de cogumelos selecionados: <i>Coprinellus sp.</i>, <i>Coprinus comatus</i> e <i>Flammulina velutipes</i>. • Possui substâncias que interferem na indução de H₂O₂ na via NF-kB através da inibição da fosforilação da IKa células MCF7 do cancro da mama. 	(Gu & Leonard, 2006) (Asatiani et al., 2011)

Espécies de cogumelos	Efeitos bioativos dos seus biocompostos (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>)	Referências
<i>Lentinula edodes</i> “Shiitake”	<ul style="list-style-type: none"> • Indução de apoptose seletiva de células de carcinoma de pele (CH72) de murino, por um extrato etanólico • Produz lentinano. Este β-glucano é conhecido por suprimir a proliferação das células da leucemia. 	(Gu e Belury, 2005)
<i>Schizophillum commune</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Contém esquizofilano – ATCC- um homopolissacarídeo não-iônico, solúvel em água. Este é constituído por uma cadeia linear de β- D- (1→3) com grupos de glucopiranosil e cadeias de β – D(1 → 6) com grupos-glucopiranosil por ele produzidos. • O ATCC tem atraído o interesse nos últimos anos da indústria farmacêutica como potencial biofármaco imunomodulador e agente antineoplásico. 	(Kumari, Survase, & Singhal, 2008)
<i>Leucopaxillus giganteus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Testadas propriedades bioativas do micélio do cogumelo medicinal, obtido na presença de diferentes fontes de azoto. 	(Barros, Baptista, Estevinho, & Ferreira, 2007)
<i>Phellinus igniarius</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Efeitos anticancerígenos. O extrato etanólico foi utilizado para avaliar os efeitos antiproliferativos e antimetastáticos em hepatocarcinoma humano. 	(Song, Lin, Yang, & Hu, 2008) .
<i>Phellinus linteus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Um polissacarídeo com ligação proteica induz paragem do ciclo celular na fase G2/M e apoptose em células cancerígenas do cólon humano SW480; apresentando também propriedades anti-inflamatórias e anti-angiogénicas. • Hispolon, composto fenólico induz a apoptose de células cancerígenas: da mama da bexiga e de células epidermóides do cancro gástrico. • Micélio administrado por via oral exibiu efeitos anti-tumorais em ratinhos portadores de células de hepatoma. • A fração obtida a partir de carpóforos secos foi testada <i>in vitro</i> em culturas de células A549, HT-29 e C6, respetivamente linhagens celulares de carcinoma de pulmão humano, de adenocarcinoma do cólon e de glioma de rato. 	(G. Li et al., 2004) (S.-H. Kim et al., 2004) (Lu et al., 2009) (Huang et al., 2011) (Y.-G. Li et al., 2011)
<i>Phellinus linteus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • A fração provocou efeitos anticancerígenos, como foi a diminuição da proliferação de células tumorais, da motilidade e a indução de alterações morfológicas. Além disso testou-se a toxicidade produzida em células normais, constatando-se ser nula ou quase. • Registaram-se efeitos antitumorais de proteoglicano de <i>Phellinus linteus</i> por via imunomoduladora por inibição da sinalização da via Akt /Reg IV / EGFR / ,em carcinoma colorretal. 	(M. Lemieszek et al., 2009)

Espécies de cogumelos	Efeitos bioativos dos seus biocompostos (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>)	Referências
<i>Pleurotus ostreatus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Indução de efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos sobre células, HT-29, de cancro do cólon, com o extrato aquoso com o polissacarídeo (POPS-1), solúvel em água, obtido dos carpóforos, por extração com água quente, precipitação em etanol e fracionamento por DEAE-celulose, cromatografia de troca iónica e filtração em gel com Sepharose CL-6B. • (Lavi, Friesem, Geresh, Hadar, & Schwartz, 2006) relataram que um polissacárido a partir de extracto aquoso de <i>Pleurotus ostreatus</i> induz efeitos anti-proliferativos pró-apoptóticos em células HT-29 do cancro do cólon. Um novo extrato polissacarídico solúvel em água (POPS-1) foi obtido a partir dos corpos de frutificação de <i>Pleurotus</i> 	(Tong et al., 2009) (Lavi et al., 2006)
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Uma nova lectina com potente atividade antitumoral, e anti mitogénica na presença de HIV-1 atua como inibidora da transcriptase reversa. • Isolaram uma lectina homodimérica do carpóforo fresco, que exerceu actividade antitumoral em ratinhos portadores de sarcoma 180, e causou aproximadamente 80% de inibição do crescimento do tumor. 	(Li et al., 2008)
<i>Pleurotus tuber-regium</i>	<ul style="list-style-type: none"> • O extrato do cogumelo mostrou ter forte citotoxicidade a aproximadamente 25 µg/ml e exerceu atividade antiproliferativa eficaz a 200 µg/ml contra células de leucemia promielocítica aguda humana, (HL-60) por paragem do ciclo celular e / ou indução de apoptose. 	(Wong, Wong, Chiu, & Cheung, 2007)
<i>Polyozellus multiplex</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Este cogumelo selvagem, da Coreia, possui potente agente químico, preventivo do cancro do estômago. Controla a proliferação destas células, detetada pelo aumento da expressão das proteínas p53. • Polyozellin, isolado deste cogumelo, induz fase desintoxicante de enzimas com ação potencial preventiva de cancro (células de hepatoma de rato). 	(Lee e Nishikawa, 2003) (JKim et al., 2004)
<i>Psilocybe</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> • Estudo piloto sobre o tratamento da psilocibina, extraída de <i>Psilocybe</i> spp-, para tratamento da ansiedade em pacientes cancerosos em estado avançado. 	(Grob et al., 2011)
<i>Xerocomus badius</i> ou <i>Boletus badius</i>	<ul style="list-style-type: none"> • A L-teanina (gama – glutamiletilamida, produzida por fermentação submersa de <i>Boletus badius</i>) tem efeito sinérgico com compostos anti-tumorais como a doxorubicina, outras antraciclinas, cisplatina e irinotecano. É esperado que o efeito modulador de L-teanina sobre os agentes antitumorais e citostáticos seja aplicável em quimioterapia clínica. 	(J.Li et al., 2008).

Espécies de cogumelos	Efeitos bioativos dos seus biocompostos (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>)	Referências
Gênero <i>Clitocybe</i>	<ul style="list-style-type: none"> Algumas espécies do género <i>Clitocybe</i> têm potencial anti-cancerígeno. 	(Pohleven et al., 2009)
<i>Clitocybe nebularis</i>	<ul style="list-style-type: none"> Uma proteína imunomoduladora CNL, tem efeito anti-proliferativo, induzido através da ligação a receptores, de hidratos de carbono, em células leucémicas T humanas. CNL também tem aplicações terapêuticas potenciais no tratamento de doenças malignas hematopoiéticas A enzima lacase de extrato de <i>Clitocybe</i> máximos exibiu actividade anti-proliferativa em linhas celulares tumorais Hep G2 e MCF-7. 	(G.-Q. Zhang, Wang, Zhang, Ng, & Wang, 2010)
<i>Clitocybe maxima</i>	<ul style="list-style-type: none"> O extracto etanólico considerado inibidor muito potente do crescimento do cancro do pulmão humano (teste em células NCI-H460), da mama, do cólon, e linhas celulares de cancro gástrico 	
<i>Clitocybe alexandri</i>	<ul style="list-style-type: none"> Extracto de um <i>Clitocybe</i> induziu a paragem do ciclo celular na fase S e um aumento da apoptose, melhorando os níveis de p53. O ácido cinâmico mostrou ser o composto mais potente sobre a inibição do crescimento celular. 	(Vaz et al., 2010)

1.3 A melanina dos cogumelos como possível biocomposto antitumoral

É possível que estejam envolvidos, na ação anticancerígena, biomoléculas de cogumelos até agora não isoladas nem identificadas, pois o número de novas substâncias descobertas é crescente nas últimas décadas.

É observável uma forte pigmentação em muitos carpóforos de cogumelos com efeitos nutracêuticos, pigmentação essa que varia ao longo do desenvolvimento no seu ciclo de vida mas que é característica de cada espécie e do estado de maturação do carpóforo (Dominguez, 2008).

Existem ensaios feitos e descritos para medir a atividade enzimática de enzimas extraídas de cogumelos. É o caso da tirosinase, uma importante enzima responsável pela formação de melanina em cogumelos (Oliveira, Rocha, & Guillo, 2004).

As melaninas são biomoléculas de estrutura química complexa e apesar de ainda não estar completamente definida a sua estrutura, composição e funções específicas (S Ito, Wakamatsu, d' Ischia, Napolitano, & Pezzella, 2011) sabe-se que o principal papel das melaninas tem sido associado à fotoproteção contra as radiações ultravioleta (UV). Estudos recentes têm-nas associado a muitos outros mecanismos de proteção biológicos ainda não muito bem conhecidos (Ito e Wakamatsu, 2007). As melaninas são assim consideradas pigmentos de estrutura e origem variada. Podem resultar da oxidação e polimerização da tirosina, em animais, ou de compostos fenólicos, em organismos inferiores. Classificam-se em vários subtipos, sendo as eumelaninas (de cor preta a castanho e insolúveis) um subgrupo de pigmentos de melanina resultantes, pelo menos em parte, da polimerização oxidativa de L-DOPA através de intermediários como 5,6-dihidroindole. São exemplos a melanina do choco (*Sepia officinalis*) e a melanina do cabelo preto. A melanina do Reino Fungi, feomelanina, de cor castanha a amarelo-avermelhado, alcalino-solúvel, contendo enxofre é um subgrupo de pigmentos de melanina, derivados da oxidação de precursores da dopacisteína através de intermediários como benzotiazina e de benzotiazol. A melanina do cabelo ruivo é a feomelanina, raramente pura no cabelo (S Ito et al., 2011). Quanto às neuromelaninas, são pigmentos escuros produzidos dentro de neurónios através da oxidação de dopamina e outros precursores da catecolamina, a designada “substância negra” nos neurónios. As feomelaninas são, maioritariamente, pigmentos escuros produzidos por

microrganismos, mas não exclusivamente. Além disso, para todos os tipos de pigmentos naturais, o termo 'melanina' deve ser precedido pelo termo que indica a fonte natural, por exemplo melanina sépia (do choco), melanina do cabelo, enquanto para os pigmentos sintéticos o termo "melanina" deve ser precedido pelo precursor de, por exemplo, a melanina de 5,6-dihidroindole, a cisteinildopa-melanina.

1.4 Apresentação do trabalho experimental

O presente trabalho tem como principais objetivos extrair, isolar, purificar, caracterizar e avaliar a atividade antitumoral de biocompostos (possivelmente melaninas), extraídos das películas dos carpóforos de *Boletus edulis* e *Boletus pinophilus*, uma vez que se estima existir concentração elevada de melaninas nas películas destas frutificações (Bell & Wheeler, 1986; Henson, Butler, & Day, 1999). Pretende-se investigar se a fração *BE3*, com atividade anticancerígena (M. K. Lemieszek et al., 2013), contém ou não essencialmente melaninas, e, na hipótese contrária, determinar então qual será a natureza química essencial desta fração. O objetivo geral incide no isolamento e caracterização de biocompostos anticancerígenos em fungos da ordem Boletales (*Boletus edulis* e *Boletus pinophilus*), dando continuidade a trabalhos de investigação nestas espécies (Cardoso, 2011).

Boletus edulis, uma das espécies, objeto do nosso estudo, pertence a uma espécie de cogumelos silvestres, comestível e muito apreciada, apresentando também potencialidades muito interessantes como biofármaco (Ey, Schömig, & Taubert, 2007; Kandefer-Szersen, Kawecki, Salata, & Witek, 1980; Krzyczkowski et al., 2009; Lamaison & Polese, 2005; Li Dan, Zhao WenHong, Kong BaoHua, Ye Min, & Chen HaiRu, 2009; Lukas et al., 1957; Mattila, Lampi, Ronkainen, Toivo, & Piironen, 2002; Pirano, 2006; Ribeiro et al., 2008; Tsai, Tsai, & Mau, 2007; Zheng, Li, Ng, & Wang, 2007).

1.4.1 As espécies em estudo, *Boletus edulis* e *Boletus pinophilus*

Os cogumelos são estruturas macroscópicas reprodutoras, produzidas por alguns fungos durante certas épocas do ano (outono e primavera). A sua formação depende de características abióticas como temperatura, humidade, concentração de CO₂, e de condições bióticas, nomeadamente a relação simbiótica ou saprófita com plantas hospedeiras.

Os cogumelos têm uma função semelhante aos frutos nas plantas superiores, ou seja, a produção, proteção e dispersão das estruturas celulares reprodutoras: os esporos. Heterotróficos por absorção, muitos são micorrízicos, ou seja, vivem em simbiose com as raízes das plantas (Fig. 9). Apresentam estrutura celular micelial e paredes celulares de quitina, um polissacarídeo complexo, também presente no exoesqueleto dos Artrópodes.

São constituídos por um conjunto de filamentos de células, designadas de hifas, ramificadas ou não tendo comprimentos variados. O conjunto das hifas é o micélio, que desempenha importantes funções como a sustentação, absorção de nutrientes e a reprodução (Fig. 5).

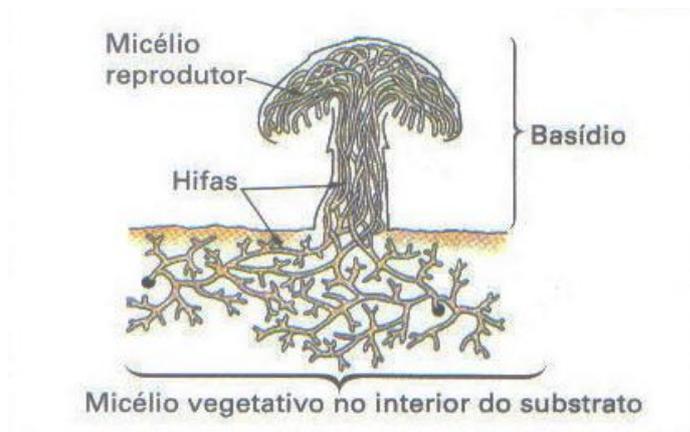


Figura 5: Organização das hifas num Basidiomicete
(fonte:www.cientific.com)

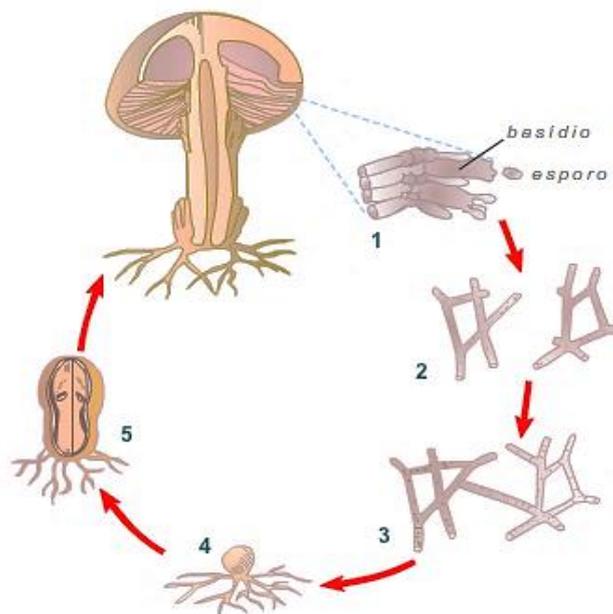


Figura 6: Ciclo de vida de um Basidiomicete; 1. Esporulação; 2. Germinação; 3. Fusão de hifas compatíveis; 4. Primórdio; 5. Frutificação. (fonte :www.cientific.com)

Os fungos reproduzem-se através, de esporos que germinam, e da conjugação de hifas compatíveis (Fig. 6) A designação cogumelo refere-se à estrutura de frutificação do fungo, formada por várias hifas que crescem e se elevam do solo crescendo na vertical, produzindo e dispersando mais tarde os esporos quando atingem a maturação (Fig. 7).

Esses esporos (Fig. 7) são invisíveis a olho nu; caem no solo e espalham-se com o vento, com a água ou até mesmo agarrados ao corpo de animais.

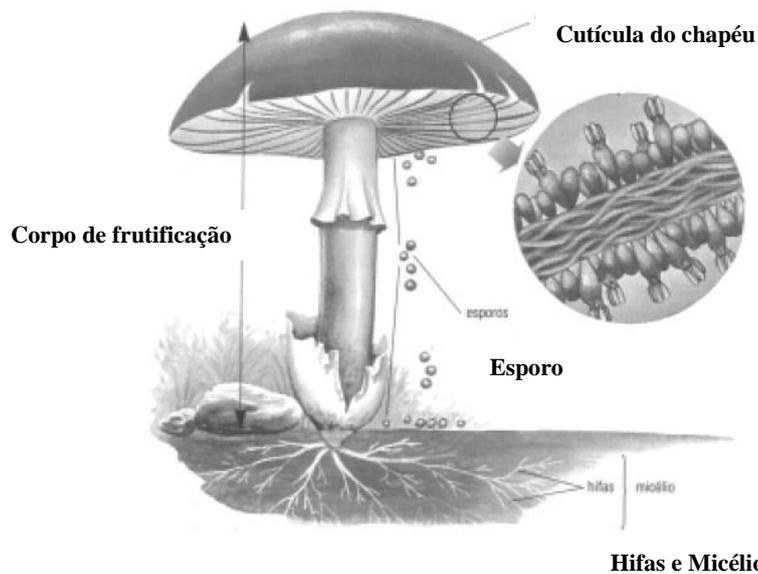


Figura 7: Constituição básica de um cogumelo e liberação de esporos maduros (figura adaptada de (Paulino, 1998) página 77).

A espécie *Boletus edulis* é colhida no estado silvestre. É um cogumelo comestível, colhido para comercialização, dado o seu elevado valor gastronómico. Durante a época de frutificação podem ser comprados frescos e podem também ser comercializados secos, congelados ou submetidos a outro processamento.



Figura 8: Carpóforo de *Boletus edulis* (Foto de G. Marques).

O seu chapéu de cor castanho-escuro ou castanho-avelã apresenta o bordo da margem com uma linha branca (Fig. 8). Apresenta chapéu com cutícula de revestimento viscosa quando está molhada. O estipe ou pé, inicialmente branco ou bege claro, nunca é muito colorido ou escuro.

Os chapéus deste cogumelo têm 7 a 30 cm de largura. Com cutícula ligeiramente pegajosa ao toque, é convexo quando jovem e vai aplanando com a idade. A cor é geralmente castanho desaparecendo para branco em áreas próximas à margem, e continua a escurecer à medida que amadurece. O estipe ou pé tem 8-25 cm de altura e até 7 cm de espessura; é finamente reticulado na porção superior, mas alisa ou é irregularmente estriada na parte inferior. A superfície inferior do chapéu é feita de tubos finos, local de produção de esporos, de cor esbranquiçada quando jovem, apresentando-se de um amarelo-esverdeado quando maduros. Os poros angulares, que não mancham quando machucados, são pequenos - cerca de 2 a 3 poros por milímetro. A carne do corpo frutífero é branca, espessa e firme quando jovem, mas torna-se um pouco esponjosa com a idade. Quando machucado ou corte, ou não muda de cor, ou fica castanho muito claro ou vermelho claro. Os espécimes totalmente maduros podem pesar cerca de 1 kg, e em alguns casos podem chegar aos 3 kg.

O seu habitat natural (Fig. 9) consiste em áreas florestais ou mistas, dominadas por pinheiros (*Pinus* spp.), pseudotsugas (*Pseudotsuga* spp.), abeto (*Abies* spp.), castanheiro (*Castanea* spp), faia (*Fagus*) e carvalhos (*Quercus* spp.). Dependem da presença de árvores hospedeiras para o seu desenvolvimento, uma vez que são espécies micorrízicas (Fig. 10).



Figura 9: *Boletus* no seu habitat.

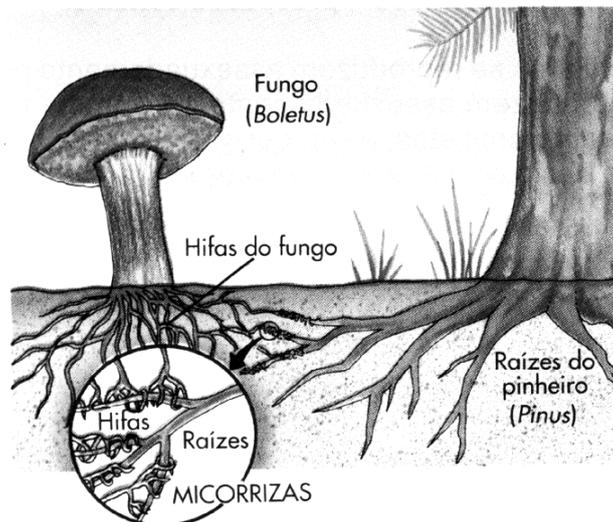


Figura 10: Ilustração de um Basidiomycete do género *Boletus* em simbiose com *Pinus*.

A espécie *Boletus pinophilus*, igualmente comestível é também comercializada; apresenta cutícula brilhante oleada parecendo envernizada. Em tempo de chuva, por vezes é francamente viscosa. O chapéu um pouco áspero ao toque apresenta a cutícula enrugada. A coloração apresenta-se vermelha-acastanhada.



Figura 11: Carpóforo de *Boletus pinophilus* (Foto de G. Marques).

O estipe ou pé, ocre, castanho ou castanho- avermelhado, especialmente de silhueta obesa. Os poros são de cor ferruginosa, particularmente visíveis em vista tangencial. Esta espécie é também micorrízica (Fig. 10) e cresce numa grande diversidade de tipo de florestas, preferindo os solos pobres, ácidos, arenosos e associados com florestas de coníferas. No entanto, a sua associação não se limita a coníferas e podem também ser encontradas frutificações, em florestas caducifólias, como castanheiros, onde é muito abundante.

1.5. Enquadramento e objetivos do trabalho

Na sequência de estudos sobre os polissacarídeos da parede celular de algumas espécies de cogumelos silvestres (Cardoso, 2011), resultou o isolamento de uma fração (*BE3*) da espécie *Boletus edulis* cuja ação antitumoral foi testada *in vitro*.

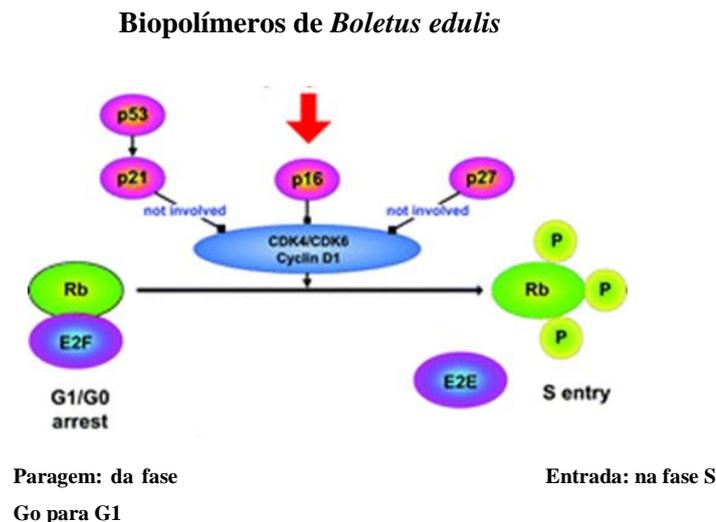


Figura 12: Indução, pelos biopolímeros, de BE3 e BE4, da paragem do ciclo celular na fase G0/G1 (Lemieszek et al., 2013).

Verificou-se que a fração designada BE3 exibiu elevada ação antiproliferativa em linhas celulares do carcinoma do cólon humano, HT-29 e LS180 (M. K. Lemieszek et al., 2013). Apenas 6% da composição química do material desta fração é conhecida, sendo supostamente açúcares. Estes dados levaram-nos a querer estudar mais aprofundadamente a composição química desta fração de modo a isolar e identificar o composto responsável pelos efeitos antiproliferativos de células cancerígenas. Sendo esta fração (BE3) portadora do mais baixo teor de polissacarídeos, de todas as frações testadas por (M. K. Lemieszek et al., 2013) os seus elementos com elevado peso molecular (> 12kDa determinada por AIR e diálise), solubilidade em água, apresentação de coloração castanha, sugerem que poderão estar envolvidos compostos do grupo minoritário das melaninas solúveis.

A fração BE3 apresentou atividade antiproliferativa anticancerígena, demonstrado pela paragem do ciclo celular nas células cancerosas (Fig. 12). O processo de divisão e multiplicação celular é interrompido. As células não se dividiram mais, não passaram para a fase S da Mitose, estagnando na fase G0. Segundo (M. K. Lemieszek et al., 2013) há indução pelos biopolímeros da paragem do ciclo celular na fase G0/G1. Também existe interação com proteínas envolvidas no ciclo celular. A ação da p16 na fosforilação da Rb fica inibida, há modulação da via da proteína p16/ciclina D1 /CDK4-6/pRb, sobre a fosforilação da proteína Rb (Fig. 12).

As frações compostas por uma mistura de polissacarídeos (BE1) e de glicoproteínas com diferentes teores de açúcar e carga aniónica diferente (BE2, BE3, BE4 e BE5) foram eluídas

através da coluna de troca aniônica com diferentes concentrações de sal. A purificação foi feita por eluição em cromatografia de alta eficiência de troca aniônica em *Q-Sepharose*. As frações dos extratos BE3 e BE4 foram as frações retidas na coluna de troca aniônica que apresentaram menor quantidade de açúcares, 6 % e 8%, respectivamente (Cardoso, 2011; M. K. Lemieszek et al., 2013).

Estes dois extratos, BE3 e BE4, apresentaram um perfil cromatográfico dum “composto desconhecido”. As frações BE3 e BE4 foram as mais eficazes na ação antiproliferativa, parando o processo de divisão das células cancerígenas, LS180, sobretudo a fração BE3. Esse bioproducto detetado foi o dobro na fração BE3 comparando com BE4. A fração BE3 induziu a paragem do ciclo celular, na fase G0/G1, em células *in vitro* LS180, tendo também um efeito inibidor, sobre as proteínas reguladoras do ciclo celular. Principalmente a fração BE3 inibe o crescimento de linha de células, LS180, de adenocarcinoma do cólon, sem qualquer efeito indesejável em células normais epiteliais do cólon. Biocompostos de BE3, BE4 e BE5 provocaram um efeito antiproliferativo, sendo os de BE3 os/mais/ativos. É também esta a fração que possui o mais baixo teor de polissacarídeos das amostras testadas (BE1, BE2, BE3, BE4) (M. K. Lemieszek et al., 2013).

Embora se possa afirmar que a fração BE3 possui potencial anticancerígeno, impedindo as células cancerosas de se dividirem e multiplicarem, não se pode afirmar que os polissacarídeos de *Boletus edulis* (WSB), (apesar de serem os principais biopolímeros presentes no extrato solúvel de água quente) são os responsáveis pela eficácia antiproliferativa anticancerígena. Pois a fração BE3, entre todas, apresenta menor teor de polissacarídeos, sendo, no entanto, a mais eficaz na destruição das células cancerígenas. Os resultados indicaram também que a fração BE3, de *Boletus edulis*, causou uma inibição das proteínas, ciclina D1, CDK4, CDK6. Essas proteínas são, atualmente, objeto de intensa investigação, devido ao papel fundamental na proliferação celular e no fato de que a sua expressão e função anormal pode levar à malignicência (A. C. Silva & Jorge, 2011; Zaidman et al., 2005; M. Zhang et al., 2007).

De tudo o que foi dito, até agora, podemos inferir, com alguma certeza, que algum biopolímero de *Boletus edulis* possui forte potencial anticancerígeno e que a fração BE3 é que será a portadora desse biopolímero. Este, será uma biomolécula com caracterização química, certa, ainda por definir. Sabe-se, à partida, que apresentará elevado peso molecular

($\geq 12-14$ kDa), é insolúvel em álcool, tem carga iônica (sofreu eluição e isolamento por eluição em HPLC com diferentes concentrações de NaCl) e é solúvel em água. No presente trabalho procura-se isolar e caracterizar este biocomposto com ação antiproliferativa de linhas celulares de cultura (HT29 e LS180) com origem em células cancerosas do colon do intestino. Partindo da hipótese de ser do grupo das melaninas, incluiu-se a espécie *Boletus pinophilus* no estudo, devido às suas semelhanças, concretamente de pigmentação, com *Boletus edulis*.

Capítulo 2

Material e Métodos

2.1. Fungos em estudo

Neste trabalho foram utilizadas amostras de cogumelos de *Boletus edulis* e *Boletus pinophilus*, adquiridos à empresa Frutisilves, localizada no Sátão, Viseu, que foram mantidos congelados até à sua utilização. Embora estas espécies sejam silvestres e apenas existem na natureza, porque não podem ser cultivadas, já não era possível a sua recolha direta para o trabalho, pois tinha passado a época de frutificação.

2.2 Extração, isolamento e purificação dos biopolímeros

2.2.1 Extração e isolamento

O isolamento dos biopolímeros dos cogumelos foi realizado apenas a partir da película dos chapéus dos carpóforos, visto ser a parte do cogumelo que apresenta uma coloração mais escura (onde existirá maior concentração do pigmento). A película do chapéu dos carpóforos foi removida com um bisturi a partir de aproximadamente 3 kg de cogumelos congelados, de cada espécie. Após remoção da película esta foi liofilizada. Obtiveram-se 16 g de material liofilizado da espécie *Boletus edulis*, e 15 g de material liofilizado de *Boletus pinophilus*. Após liofilização o material foi triturado e o material insolúvel em álcool (AIR) foi obtido tratando 10 g do material liofilizado da película em 500 mL de etanol a 80% (v/v) fervendo durante 1 h. Após este período o material em suspensão foi filtrado e seco em estufa a 50 °C durante 24 h. Obtiveram-se 6,1 g de AIR para *Boletus edulis* e 5,2 g de AIR para *Boletus pinophilus*. Para a extração dos biopolímeros, o AIR (a totalidade) foi extraída com água a 100 °C durante 1 hora com agitação. Após este período, o material em suspensão foi removido por centrifugação (10.000 g, durante 20 min. a 4 °C). O sobrenadante foi recuperado e dialisado (MW cutoff 12-14 kDa, Medical, UK) durante 4 dias com a mudança de água duas

vezes por dia (volume de 5 L). Após a diálise, o material de elevado peso molecular solúvel em água (HMWM) foi obtido após liofilização, tendo-se obtido 1,1 g para *Boletus edulis* e 0,63 g para *Boletus pinophilus*.

2.2.2 Purificação dos biopolímeros

Para a purificação dos biopolímeros do HMWM, incluindo polissacarídeos, glicoproteínas, melaninas e ácidos nucleicos, foi utilizada a cromatografia em troca iônica utilizando a Q-Sepharose FF como fase estacionária, colocada numa coluna XK16/20 (Pharmacia), equilibrada com o tampão inicial de acetato de sódio 5 mM a pH 4,5 contendo ureia 3M e 0,02% de azida de sódio. O HMWM (800 mg) foi dissolvido em 50 ml do tampão inicial, e deixado durante a noite com agitação. O material insolúvel nestas condições foi removido por centrifugação, e o sobrenadante foi aplicado na coluna utilizando um fluxo de 0,1 ml/min. Após introdução da amostra, a coluna foi lavada com o tampão inicial com um volume correspondente a 4 vezes o volume da coluna ou até a absorvância, a 254 nm, recuperar o valor original. O material retido foi eluído com um gradiente de NaCl, utilizando um tampão de acetato de sódio 5 mM a pH 4,5 contendo 3 M de ureia e 2 M de NaCl. O fluxo foi de 0,25 ml/min e o gradiente ocorreu durante 14 h até a concentração de NaCl atingir 2M. O eluente saído da coluna foi recuperado utilizando um coletor de frações (2 ml/fração). A detecção foi realizada no ultravioleta utilizando um comprimento de onda de 254 nm. A presença de açúcares nas frações recolhidas foi determinada utilizando o método do ácido sulfúrico-fenol (ponto 2.3.2.). As frações apropriadas foram juntas e concentradas sob vácuo utilizando um evaporador rotativo, dialisadas através de membrana ,Mw cut-off 12-14 kDa., congeladas e liofilizadas. Obtiveram-se três frações, uma corresponde ao material não retido (BE1 – 14,6% ou BP1 – 4,6%), uma segunda fração correspondente ao material retido e eluído até 500 mM de NaCl (BE2 – 12,9% ou BP2 – 18,8%) e uma terceira fração correspondente ao material retido e eluído entre 250 e 500 mM (BE3 – 4,3% ou BP3 – 3,5%). As percentagens indicadas referem-se à quantidade de material recuperado após o fracionamento relativamente ao material inicialmente aplicado.

Segue-se em esquema o procedimento para a extração e purificação dos biopolímeros de *Boletus edulis* e *Boletus pinophilus*.

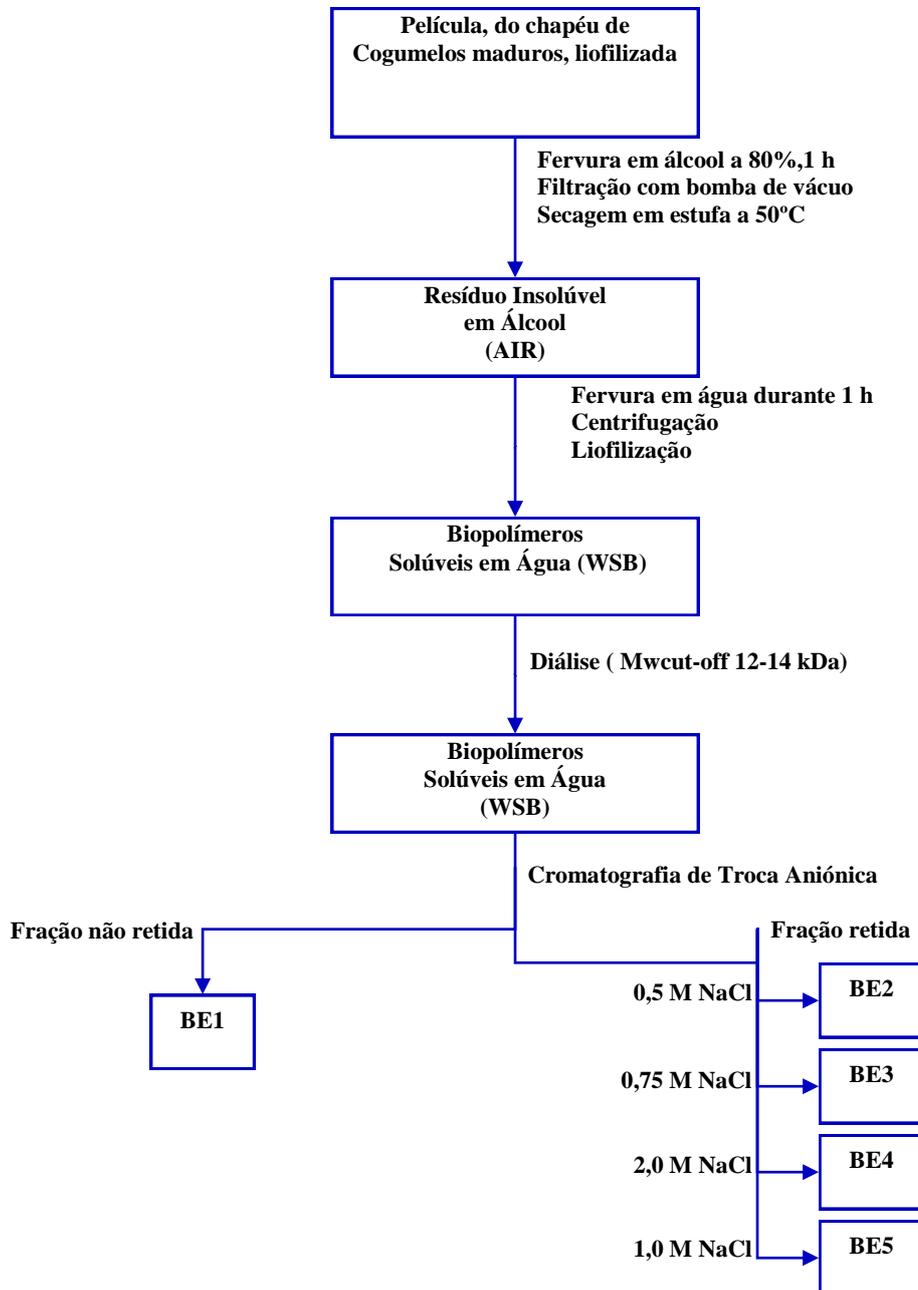


Figura 13: Esquema do procedimento para a extração e purificação dos biopolímeros de *Boletus edulis* e *Boletus pinophilus*.

2.3 Caracterização química das frações

As frações purificadas do HMWM foram caracterizadas de forma a determinar a sua natureza química, em especial a natureza da fração *BE3* e *BP3* a qual até ao momento permanecia desconhecida, sendo que para *Boletus edulis* se verificou uma atividade anti tumoral muito elevada (M. K. Lemieszek et al., 2013).

2.3.1 Análise da composição das amostras em açúcares

O teor em açúcares dos biopolímeros foi determinado após a hidrólise ácida. A figura 14 ilustra o procedimento realizado. Resumidamente, preparam-se as soluções necessárias, uma solução de ácido sulfúrico 72% assim como as soluções de padrão dos açúcares. Pesaram-se 5 mg de extrato bruto adicionando 400 µl de ácido sulfúrico para um tubo de vidro. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente durante 3 horas sendo constantemente agitadas em vórtex. Adicionaram-se 4 mL de água ultra pura, sendo colocadas num bloco de aquecimento (*Thermobloc Falc*) a 100 °C durante 2h 30 min. Deixaram-se as amostras arrefecer, adicionando-se 500 µl de padrão interno (2 desoxiglucose a 1mg /ml). Transferiu-se 400 µL de cada amostra para vials, assim como as soluções padrão, adicionando-se 4600 µL de água ultra pura.

Posteriormente foram injetadas e analisadas por cromatografia iónica de alta eficiência (HPAEC) com deteção de pulso amperométrico (*ICS-3000, Dionex*). Com uma coluna CarbonPac PA-20 (150 mm x 3 mm), com uma pré-coluna CarbonPac PA-20 (*Dionex*) utilizando o eluente A (1,25 mM de solução de NaOH contendo 2 mM Ba(OH)₂), o eluente B (400 mM de acetato de sódio contendo 2 mM Ba(OH)₂) e o eluente C (500 mM NaOH contendo 2 mM Ba(OH)₂). Foi injetado um volume de 5 µL, com uma taxa de fluxo de 0,3 mL/min sendo a temperatura da coluna de 35 °C durante a corrida.

A partir de cada cromatograma, retiraram-se os valores de área de cada pico respetivamente, apresentando-se os resultados em percentagem de açúcares. Para quantificação dos açúcares totais foram usados padrões de monossacarídeos (pentoses e hexoses), sendo estas oses: arabinose e xilose (pentoses), glucose, galactose, manose, fucose, ramnose e ácido galactúronico. A quantificação foi realizada utilizando o método do padrão interno. De seguida esquematiza-se a hidrólise ácida dos açúcares das amostras e seu manuseamento até

injeção na coluna de cromatografia de troca iônica para determinação da composição química em açúcares.

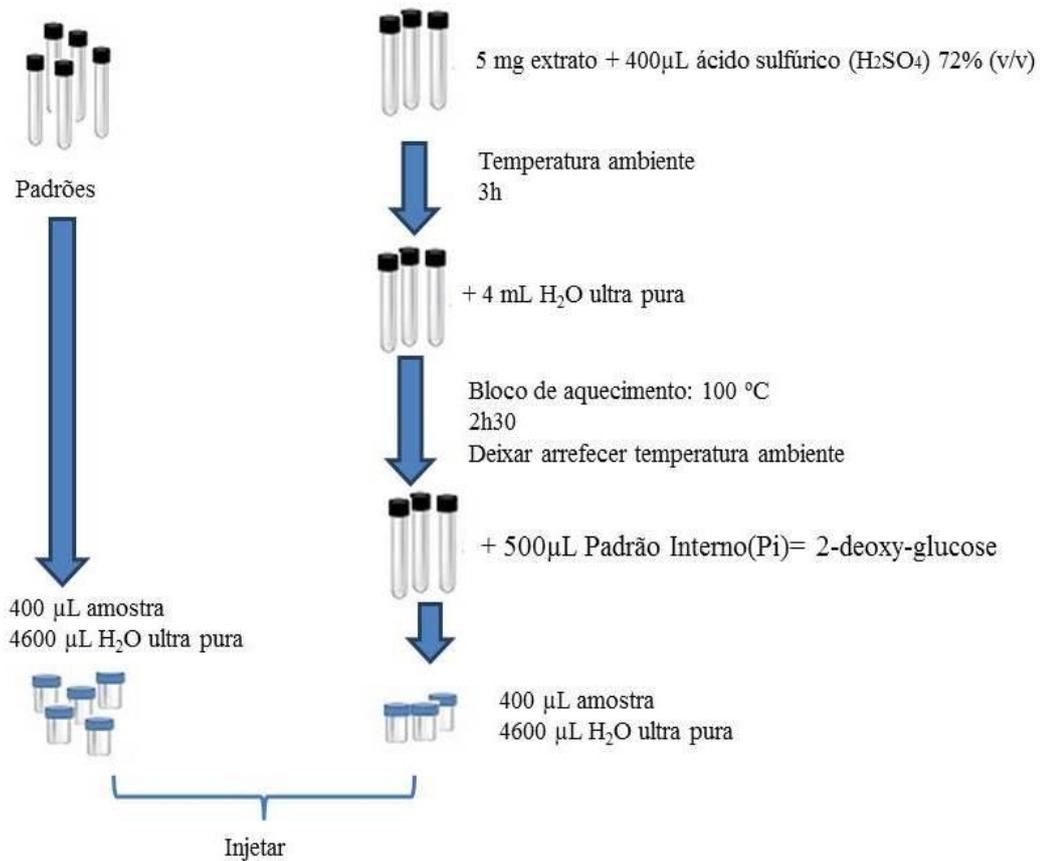


Figura 14: Esquema do procedimento da hidrólise ácida dos açúcares das amostras BE e BP até à injeção na coluna de troca iônica.

Para o isolamento do material de alto peso molecular, solúvel em água, da película dos carpóforos foi obtido em primeiro lugar o material insolúvel em álcool (AIR) seguido por extração do AIR com água quente e diálise do material através de uma membrana de 12-14 kDa.

Foram calculados os rendimentos para o isolamento do material, de alto peso molecular solúvel em água, dos carpóforos dos cogumelos.

A composição do HMWSM foi determinada inicialmente por análise cromatográfica dos açúcares constituintes após hidrólise ácida.

Foi obtida a composição em açúcares e calculou-se o total nas amostras BEic e BPic, do carpóforo, BEWM e BPWM (WM- material solúvel em água), BE3 e BP3 (fração 3 purificada no HPLC); as amostras BEi e BPi dos carpóforos só sofreram congelamento, trituração e liofilização, não sofrendo AIR).

Em seguida apresenta-se cromatograma obtido da análise dos açúcares em HPLC (Fig. 15).

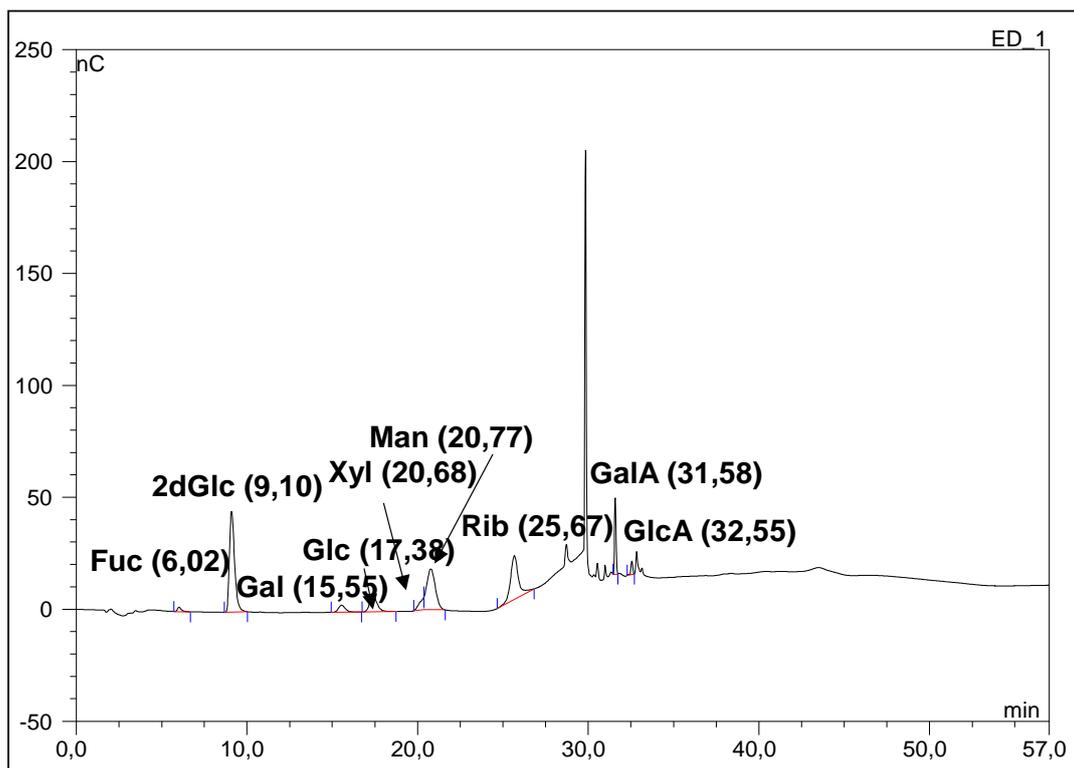


Figura 15: Cromatograma obtido para a análise de açúcares.

Tabela 2: Identificação dos açúcares constituintes da amostra.

Açúcares	Tempos de retenção identificativos (min)
Fucose (Fuc)	6,02
2dGlucose (2dGLlc)	9,10
Galactose(Gala)	15,55
GlucoseGlc	17,38
Xylose(Xyl)	(20,68)
Manose(Man)	20,77
Ribose(Rib)	25,67
GalA	31,58
GlcA	32,55

2.3.2 Determinação colorimétrica dos açúcares totais pelo método do fenol-ácido sulfúrico.

O método colorimétrico do fenol-ácido sulfúrico descrito por Dubois et al. (1956) foi utilizado para a monitorização de polissacarídeos nas diferentes frações recolhidas durante os processos preparativos de cromatografia em coluna de troca iónica. Este método é particularmente apropriado para a análise colorimétrica de polissacarídeos, já que permite num único passo a hidrólise do polissacarídeo e o desenvolvimento de cor devido às reações de desidratação dos monossacarídeos resultantes.

A temperatura elevada e a elevada acidez devido à presença de ácido sulfúrico levam à desidratação de pentoses e hexoses, originando o furfural e 5-hidroximetilfurfural, respetivamente, que na presença de fenol, por condensação, dão origem a cromóforos de cor alaranjada, cuja intensidade de cor é proporcional à quantidade de açúcares presentes na amostra.

A cada tudo de ensaio foram adicionados 200 µL de amostra a analisar, seguida da adição de 200 µL da solução de fenol a 5% (p/v) e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, que é adicionado diretamente sobre a superfície da solução e não por escorrimento da parede do tubo. A mistura foi deixada em repouso durante 30 minutos, após os quais a absorvância a 490 nm foi determinada numa célula de 1 ml de capacidade com 1 cm de percurso óptico.

2.4 Análise por espectroscopia de ultravioleta visível (UV-Vis)

Procedeu-se à leitura de absorvância das amostras de *Boletus edulis* e *Boletus pinophilus*, extracto solúvel de *Boletus* em água de alto peso molecular (HMWSB) a 490 nm.

Para a obtenção dos espectros de ultravioleta-visível do WSM bem como das frações BE3 e BP3, prepararam-se soluções aquosas de cada um dos materiais a uma concentração de 1mg/mL e obteve-se o espectro no intervalo de comprimentos de onda entre os 220 e 600 nm.

2.5 Análise de melaninas

Dada a natureza desconhecida das frações BE3 e BP3, e devido à sua coloração castanha escura, foi colocada a hipótese que estas seriam melaninas, dado que os fungos e especialmente os Basidiomicetes serem conhecidos por produzirem melaninas (Bell & Wheeler, 1986; Henson et al., 1999).

A pesquisa de melaninas envolve um processo de clivagem oxidativa destas macromoléculas, para validar o método utilizado no nosso laboratório foi isolada a melanina da tinta de choco (*Sepia officinalis*), para que este servisse de padrão para o método aplicado em termos de percentagem de recuperação dos monómeros. Os padrões de PTCA,(ácido pirrolo-2,3,5-tricarboxílico) e do PTCA , ácido pirrolo-2,3-carboxílico ,foram gentilmente cedidos pelo Professor Kazumasa Wakamatsu, do departamento de Química, da Escola das Ciências da Saúde da Universidade de Saúde de Fujita, Japão.

Na secção dos resultados apresentam-se os cromatogramas obtidos dos padrões do PDCA e PTCA.

2.5.1 Isolamento das eumelaninas da tinta do choco (*Sepia officinalis*)

O método utilizado para o isolamento e purificação das eumelaninas do choco foi o descrito por (Magarelli, Passamonti, & Renieri, 2010). Resumidamente, utilizaram-se as bolsas do ferrado, tendo-se aproveitado a tinta líquida extraída (28,41 g). Adicionou-se à tinta extraída 56,8 mL de uma solução de ácido clorídrico 0,5 M. A mistura foi agitada durante 30 minutos e mantida 24 h a 4°C. Separou-se os sólidos suspensos por centrifugação a 1000 rpm durante 15 minutos a 5°C. O sólido obtido foi lavado 3 vezes com HCl 0.5 M, seguindo de três lavagens com água, três lavagens com acetona e novamente três lavagens com água. Entre cada uma das lavagens o sobrenadante foi removido por centrifugação. O material sólido foi recuperado após liofilização, tendo-se obtido 0,1995 g de peso seco de material (Magarelli et al., 2010; Napolitano, Pezzella, d' Ischia, & Prota, 1996).

Degradação oxidativa da eumelanina

A melanina de *Sépia* é um copolímero da eumelanina constituído aproximadamente por 20% de unidades de 5,6 – dihidroxiindole (DHI) e 75% de unidades de 5,6 – dihidroxiindole -2-

ácido carboxílico (DHICA). Estes compostos constituem as unidades monoméricas das eumelaninas, tendo sido devidamente identificados através de ensaios de degradação oxidativa (H_2O_2 em meio alcalino) de melanina isolada da tinta de choco (Fig. 16). Os produtos resultantes destes ensaios foram o ácido pirrolo-2,3,5-tricarboxílico (PTCA) e o ácido pirrolo-2,3-carboxílico (PDCA) (Magarelli et al., 2010).

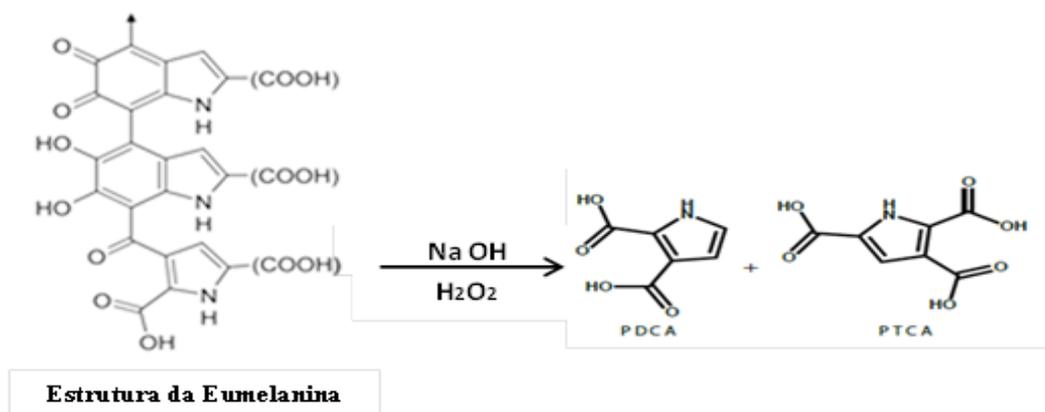


Figura 16: Degradação oxidativa da eumelanina em meio alcalino.

A identificação da possível presença de eumelaninas na fracção BE3 e BP3 foi realizada pela pesquisa de PDCA e PTCA (produtos resultantes da degradação oxidativa de eumelaninas).

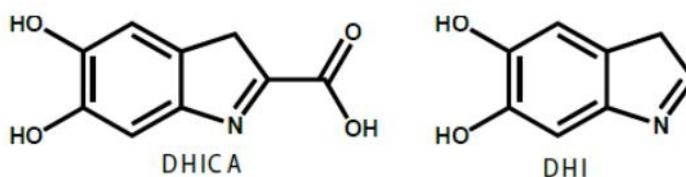


Figura 17: Monómeros (DHI e DHICA) do polímero eumelanina (S Ito et al., 2011).

Para tal utilizou-se o método descrito por (Napolitano et al., 1996). Resumidamente, pesaram-se 10 mg do material a analisar, aos quais se adicionaram 2 ml de uma solução de NaOH 1M, e 1 ml de peróxido de hidrogénio a 30% (para que a concentração final de peróxido de hidrogénio no meio reacional seja de 1,5%). A amostra foi agitada durante 48 h à temperatura ambiente num agitador orbital. Após este período ajustou-se o valor de pH com ácido fosfórico a 85%, e o peróxido de hidrogénio foi destruído por adição de 0,4 ml de uma

solução de metabissulfito de sódio a 5%. A solução final foi analisada por HPLC para a detecção dos ácidos pirrólicos acima referidos. Considera-se que o PDCA é um indicador da presença de unidades de DHI, enquanto o PTCA indica a presença de unidades derivadas de DHICA da eumelanina (Fig. 17) (S Ito et al., 2011).

2.5.2 Separação do PDCA e PTCA por cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC).

A separação, identificação e quantificação do PDCA e PTCA resultantes da degradação oxidativa das eumelaninas foi determinado por HPLC com um detector de conjunto de fotodiodos (DAD). Para tal utilizou-se uma coluna de fase reversa (C-18) de 25 cm de comprimento e 4,6 cm de diâmetro contendo partículas de 5 micrómetros (ACE, Escócia). A fase móvel era constituída por uma solução de ácido fórmico a 5% (eluente A) e metanol de HPLC (eluente B). O programa de eluição utilizado foi o seguinte: 0 min, 2% B, 20 min; 13% B. O fluxo foi de 0,8 mL/min e a temperatura da coluna foi mantida a 30°C durante a eluição. A detecção foi realizada entre 200 e 600 nm. A quantificação do PDCA e PTCA foi realizada utilizando o método da reta de calibração por injeção de soluções padrão de PDCA e PTCA na gama de concentrações entre 10 e 100 mg/L, utilizando o comprimento de onda de 253 nm. Na figura 26 encontra-se o cromatograma obtido para a degradação oxidativa da eumelanina do choco, e os respectivos tempos de retenção de cada uma das substâncias, bem como os espectros de UV-Vis do PDCA e PTCA e as respetivas calibrações.

2.6 Pesquisa de proteínas

2.6.1 Análise do teor de azoto

A determinação do teor de azoto das frações recuperadas foi realizada pelo método de Dumas, após cromatografia de troca iónica. A partir do teor de azoto determinado pode-se estimar o teor de proteína, por multiplicação da percentagem de azoto pelo fator de 6,25.

2.7 Pesquisa de ácidos nucleicos

2.7.1 Espectrofotometria de absorção UVvis (Ultra-Violeta visível)

As amostras BE_{HMWM} e BP_{HMWM}, (material solúvel em água de alto peso molecular (HMWM) obtido a partir dos carpóforos de *Boletus edulis* e *Boletus pinophilus*) foram analisadas por espectrofotometria de UV_{vis}.

Foram registados espectros de absorção na zona dos UVvis das amostras BE3_{HMWM} e BP3_{HMWM}. medidos por Nanodrop.

2.7.3 Electroforese em agarose

O ARN presente nas frações BE3 e BP3 após tratamento com a DNase (RapidOut DNA Removal, Thermo Scientific) foi analisado (20 µl) por eletroforese em gel de agarose a 1,2%. Para a coloração do ARN utilizou-se o brometo de etídio; cerca de 6 µl de uma solução aquosa comercial a 10 mg/ml (Ref. 04802511, Mp Biomedicals,) para um gel de 100 ml e os géis foram posteriormente visualizados por iluminação sob uma luz ultra- violeta.

2.7.4 Remoção rápida de ADN- K2981- descrição do Kit –

O KIT “*RapidOut ADN removal kit*” é projetado para a remoção rápida e segura de ADN genómico a partir de ARN total e de preparações de ARNm. O produto garante total digestão de ADN e a remoção segura da DNase I sem danificar o ARN pelo aquecimento ou extração orgânica.

A amostra de ARN recombinante é tratada com DNase I, livre de RNase, para níveis de ADN abaixo do limite de deteção pela PCR de rotina.

A DNase I é removida com segurança usando o reagente de remoção da DNase (DRR, DNase Removal Reagent). O DDR liga-se de forma eficiente com a DNase I e o complexo é então recolhido na parte inferior do tubo de centrifugação. O ARN purificado é recolhido como sobrenadante.

Recomendações gerais

O volume de reação recomendado é de 10-500 μ L, o material utilizado como tubos, luvas e pontas deve ser livre de RNase (RNase free). O Reagente de Remoção DNase deve ser misturado adequadamente antes de cada utilização. As condições da reação estão sumarizadas na tabela 3.

Tabela 3: Componentes e quantidades para remoção rápida de ADN- K2981.

Componente	Quantidade
Amostra de ARN	Até 8,5 μ l (5 pg – 2 μ g)
10X Tampão de DNase com MgCl ₂	1 μ l
DNase I	0,5 μ l (0,5U)
Água livre de nucleasse	Ajustar para o volume final
Total	10 μ l

Passos para a remoção da DNase:

1. Ressuspender com vórtex o reagente DRR antes de cada utilização;
2. Adicionar 2 μ L de DRR para cada unidade de DNase I utilizada.
3. Incubar à temperatura ambiente durante 2 minutos misturando suavemente 2-3 vezes para voltar a ressuspender o DRR. Evitar respingos.
4. Centrifugar o tubo a $\geq 800 \times g$ entre 0,5 a- 1 min. para sedimentar o DRR.
5. Transferir o sobrenadante, contendo o ARN, para um novo tubo. Precaução para não transferir o DRR. Procedeu-se à síntese do cADN para posterior sequenciação.

2.7.5 Transcrição reversa do ARN para posterior sequenciação

Fez-se a deposição de 18 μ l da reação de transcrição reversa para avaliação por eletroforese em gel de agarose.

A amostra purificada e contendo somente ARN foi seguidamente tratada com uma transcriptase reversa para gerar longas cadeias de cADN para posterior sequenciação *Next Generation*. Para tal, foi utilizado o kit da Thermo Scientific, Verso cADN

A tabela 4 resume a mistura de reação para um volume final de 20 µl e a tabela 5 as condições de temperatura para a transcrição reversa.

Tabela 4: Mistura de reação para transcrição reversa do ARN.

Mistura de reacção	Volume	Concentração
5 X Tampão de síntese cDNA	4 µl	1X
dNTP	2 µl	Cada 500 µM
Primer RNA	1 µl	
RT <i>enhancer</i>	1 µl	
Enzima Verso	1 µl	
Água ultrapura	Variável	
Molde (RNA)	1-5 µl	1 pg – 1 µg (80 ng)
Volume total	20 µl	

Tabela 5: Condições do termociclador.

	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Síntese de cDNA	42 °C	30 min.	1 ciclo

2.8 Análise da atividade antitumoral.

2.8.1. Cultura de células

A linha celular testada foi HT29 e LS180 (origem em células de adenocarcinoma de cólon humano) tendo sido obtida a partir de ECACC (Coleção Europeu de culturas celulares, Center for Applied Microbiology e Pesquisa, Salisbury, UK). A linha de células CCD 841 CoTr foi usada como um modelo normal do epitélio do cólon.

A linha de células CCD841 Cotr foi adquirida à ATCC (American Type Culture Collection, Menassas, VA, EUA). As células LS180 e HT29 foram cultivadas numa mistura 1: 1 de DMEM (Sigma) e mistura de nutrientes Ham F - 12 (Sigma). Células HT29 foram cultivadas em DMEM (Sigma). Todos os meios foram suplementados com 10 % de soro fetal bovino (FBS) (Sigma) , penicilina (100 u/ ml) (Sigma) e estreptomicina (100 µg/ ml) (Sigma) . As células foram mantidas numa atmosfera com humidade de 95 % de ar e 5 % de CO₂ a 33° C (CCD841 CoTr ou a 37°C (LS180,HT29). Os resultados foram obtidos com HT29 e LS180 (IC₅₀ 283 µg / ml).

Usaram-se testes comumente utilizados para avaliar a viabilidade celular/proliferação celular: BrdU e MTT

Soluções de trabalho de WSB

As soluções de reserva (10µg/ml) foram preparadas em PBS (solução salina tamponada) e armazenados a 4°C. As soluções de trabalho (10, 25, 50, 75, 100 e 250 µg/ml) foram preparadas por dissolução de uma solução de reserva adequada ao meio de cultura.

2.8.2. MTT - avaliação da proliferação celular

O método MTT foi utilizado com o intuito de avaliar a atividade metabólica das células quantificando a redução metabólica do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) por desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH, no que resulta a produção de cristais de formazano, intensamente coloridos, no interior das células. Estes podem ser observados ao microscópio ou extraídos e dissolvidos com solventes orgânicos, como por exemplo o DMSO, permitindo a sua quantificação através da espectrofotometria.

O efeito de frações BP3 e BE3 na proliferação das células foi determinado com a utilização do teste de MTT. Amarelo MTT (3 - (4,5 dimetiltiazol - 2 - il) -2,5-difenil- , um tetrazole) foi metabolizado por células viáveis, metabolicamente ativas de cristais de formazano azul . Tampão SDS a pH 7,4 foi adicionado para dissolver os cristais de formazan azul insolúveis numa solução de cor. A absorvância desta solução de cor foi quantificada a 570 nm utilizando um espectrofotômetro. A densidade ótica foi diretamente proporcional à quantidade de células em proliferação.

Células LS180, HT29, foram semeadas em microplacas de 96 poços a uma densidade de 3×10^4 células por µl. No dia seguinte, o meio de cultura foi removido e as células foram expostas a uma série de diluições de soluções testadas no meio fresco suplementado com FBS a 10%. As frações foram utilizadas para as seguintes concentrações: 10, 25,50, 75,100 e 250 µg/ml. A proliferação celular foi avaliada com 96 h de incubação, sob condições padrão (5 % de CO₂, 37 C) por meio de um ensaio MTT. O período de incubação, com a solução de MTT (5 mg/ml em PBS) foi adicionado durante 3 h. Cristais resultantes foram solubilizados durante a noite em tampão de SDS, pH 7,4 (10 % de SDS (Sigma) em 0,01 N de HCl) e o produto foi quantificado espectrofotometricamente por medição da absorvância comprimento de onda a

570 nm usando o leitor de microplacas (BioTek ELx800, Highland Park, Winooski, Vermont, EUA).

Os resultados foram apresentados como uma percentagem de inibição do crescimento das células tratadas com as fracções investigados contra células cultivadas em meio de controlo (indicada como 100 %).

2.8.3. Ensaio BrdU - avaliação da proliferação celular

O teste BrdU foi realizado para avaliar a viabilidade celular. É um teste comumente utilizado para avaliar a proliferação celular.

O impacto da fração de polissacárido de BP3 na síntese de ADN nas células LS180 foi medido pelo imunoensaio colorimétrico, e a proliferação celular ELISA, BrdU (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Alemanha). O teste mede a proliferação celular por quantificação da BrdU (análogo da timidina, 5 - bromo-2 - desoxiuridina) incorporada no ADN, sintetizado de novo de células em replicação.

As células foram semeadas em microplacas de 96 poços a 5×10^4 células por ml de densidade. No dia seguinte, o meio de cultura foi removido e as células foram expostas a uma série de diluições da fração de BP3 em meio fresco suplementado com FBS a 10%. As concentrações investigadas seguintes foram as seguintes: 10, 25, 75, 100 e 250 mg/ ml.

Após um período de incubação de 48 h, sob as condições indicadas foi adicionado a solução padrão de BrdU, as etapas seguintes foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. A sequência da fração BP3 na síntese de ADN foi apresentada com uma percentagem de inibição da incorporação de BrdU contra as células de controlo (indicada como 100 %).

2.9. Análise estatística

Os dados foram apresentados como o valor médio e o erro padrão da média (SEM). A análise estatística foi realizada utilizando o one-way-ANOVA com as estatísticas de teste e de coluna post-hoc de Tukey usados para comparações. Com valor de significância aceite com $p < 0,05$.

Capítulo 3

Resultados e Discussão

3.1 Isolamento e composição do material de elevado peso molecular da película do carpóforo

Como referido anteriormente, devido às características dos compostos da fração *BE3*, isolada de *Boletus edulis* (cor castanha, alto peso molecular, solubilidade em água, carga aniónica, baixo teor de açúcares de apenas de 6%), colocou-se a hipótese desta fração ser na realidade, uma fração constituída por melaninas solúveis (um grupo minoritário dentro do grupo conhecido das melaninas). Desta forma concentrámo-nos na película do carpóforo de *Boletus edulis* dado esta apresentar maior pigmentação, na tentativa de obter alto rendimento nesta fração *BE3*. Também se incluiu neste estudo *Boletus pinophilus* dado este ser descrito como apresentar uma pigmentação intensa de acordo com a observação e a bibliografia (Dominguez, 2008). Na Tabela 6 apresentam-se os resultados obtidos para a medição de cor dos carpóforos destas duas espécies.

Tabela 6: Valores obtidos pela medição colorimétrica de liofilizado de *Boletus edulis* e *Boletus pinophilus*. Os valores apresentados correspondem à média \pm desvio padrão $p/n=3$. L^* , a^* , b^* são as coordenadas do espaço de cor (CIELAB) definido pela CIE.

	L^*	a^*	b^*
<i>Boletus edulis</i>	69,9 \pm 1,2	3,6 \pm 0,2	18,0 \pm 0,2
<i>Boletus pinophilus</i>	52,4 \pm 0,5	4,7 \pm 0,3	18,2 \pm 0,5
<i>t-Student; p</i> <	0,001	0,009	0,613

Como se pode observar na tabela 6 o carpóforo do *Boletus edulis* apresenta um brilho significativamente superior ao carpóforo do *Boletus pinophilus*, já o parâmetro a^* é significativamente superior em *Boletus pinophilus*, apresentando este uma tonalidade mais avermelhada. O parâmetro de b^* do carpóforo não foi significativamente diferente para as duas espécies. Estes resultados estão de acordo com o descrito na literatura para a cor das

duas espécies (Dominguez, 2008), sugerindo uma maior quantidade de melaninas no carpóforo do *Boletus pinophilus*.

Para o isolamento do material de alto peso molecular solúvel em água da película dos carpóforos foi obtido em primeiro lugar o material insolúvel em álcool (AIR) seguido por extração do AIR com água quente e diálise do material através de uma membrana de 12-14 kDa. Como se pode observar na Tabela 7, o rendimento de AIR e de HMWM não diferiu significativamente para os dois cogumelos. Como se pode observar ambos os cogumelos são constituídos maioritariamente por material insolúvel em álcool o que está de acordo com o elevado conteúdo de polissacarídeos provenientes das suas paredes celulares (Cardoso, 2011). No entanto uma grande parte deste material é insolúvel em água, tendo-se apenas obtido em média 16% de material de alto peso molecular solúvel em água quente (Tabela 7).

Tabela 7: Rendimentos obtidos para o isolamento do material, de elevado peso molecular, solúvel em água, dos carpóforos dos cogumelos.

	AIR (g/100g peso seco)	HMWM (g/100g peso seco do AIR)	Fração 3 (g/100g HMWM)
<i>Boletus edulis</i>	68,8	17,2	3,4
<i>Boletus pinophilus</i>	73,4	15,6	4,2

A composição do HMWM foi determinada inicialmente por análise dos açúcares constituintes após hidrólise ácida (Tabela 8). Como se pode observar ambos os carpóforos apresentavam um elevado teor em açúcares totais (38%), tendo sido observado novamente o “açúcar” desconhecido ao tempo de retenção de aproximadamente 25 min, previamente relatado na fração BE3 (Lemieszek, M.K,2013). O material solúvel em água de elevado peso molecular (HMWM) apresentou um teor de açúcares significativamente superior ao do carpóforo, de *Boletus edulis* e de *Boletus pinophilus*, (BEc, BPc) com um teor médio de 68% de açúcares, apresentando novamente na sua constituição o açúcar desconhecido, embora com um teor relativo mais baixo que o material original. A composição em açúcares do HMWM e do carpóforo original é significativamente diferente, observando um enriquecimento em manose e galactose no HMWM quando comparado com o material original.

Tabela 8: Composição em Açúcares (g/100g) das amostras iniciais(BEi≡BEc;BPi≡CBPc), BEWSM e BPWSM e das frações BE3 e BP3.

	Fuc	Gal	Glc	Man	Xyl	---	Total
BEi Inicial (BEc Carpóforo)	0,731 ± 0,006	3,12±0,03	25,4±0,7	5,62±0,05	0,269±0,095	2,22±0,02	37,4±0,7
BPi inicial (BPc Carpoforo)	0,941± 0,027	2,56±0,01	27,8±0,5	5,18±0,04	-	2,44±0,17	38,4±0,7
BEHWSM	2,48±0,17	11,0±0,8	30,6±0,9	19,9±1,6	-	2,78±0,27	66,7±3,1
BPHWSM	3,67±0,23	9,19±0,45	32,9±2,9	20,7±3,8	-	3,25±0,19	69,7±7,5
BE3	0,021	0,792	1,74	5,44	0,933	6,11	15,0
BP3	0,019	0,520	1,54	1,79	0,320	11,6	15,8

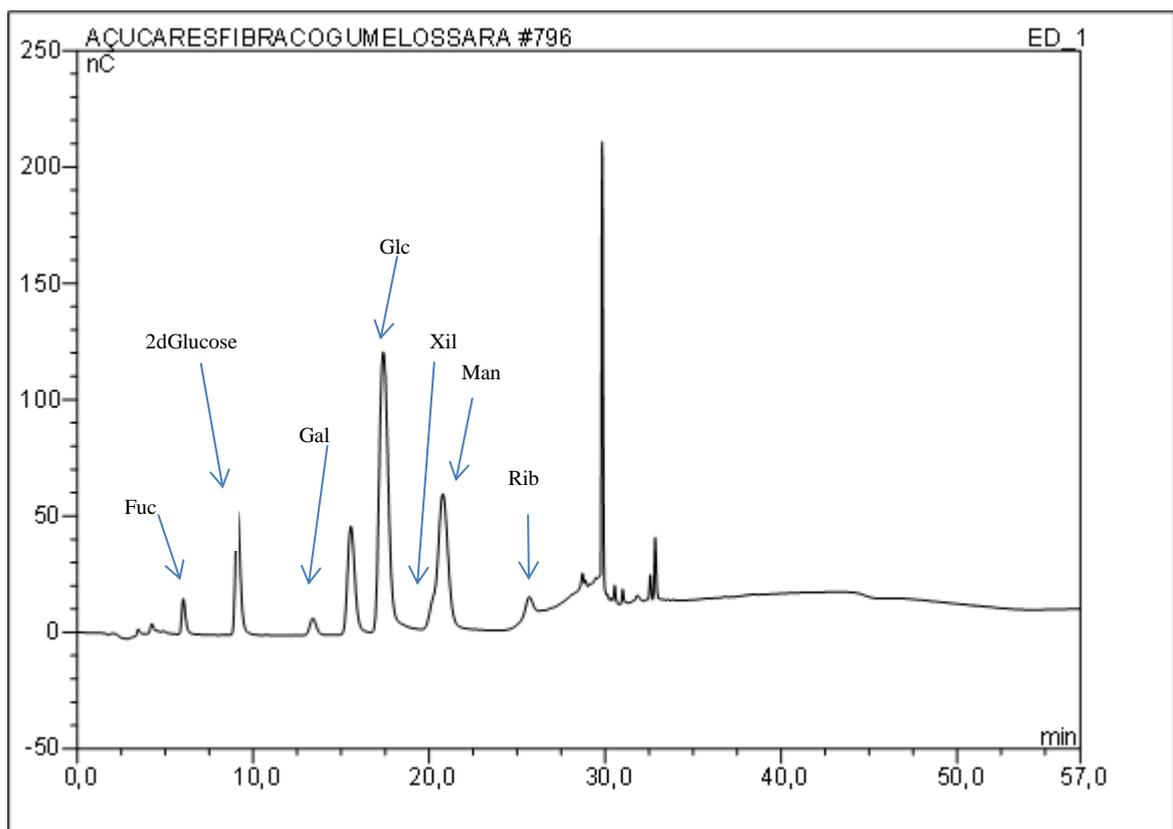


Figura 18: Cromatograma da análise de açúcares por HPAEC do HMWM de *Boletus edulis*.

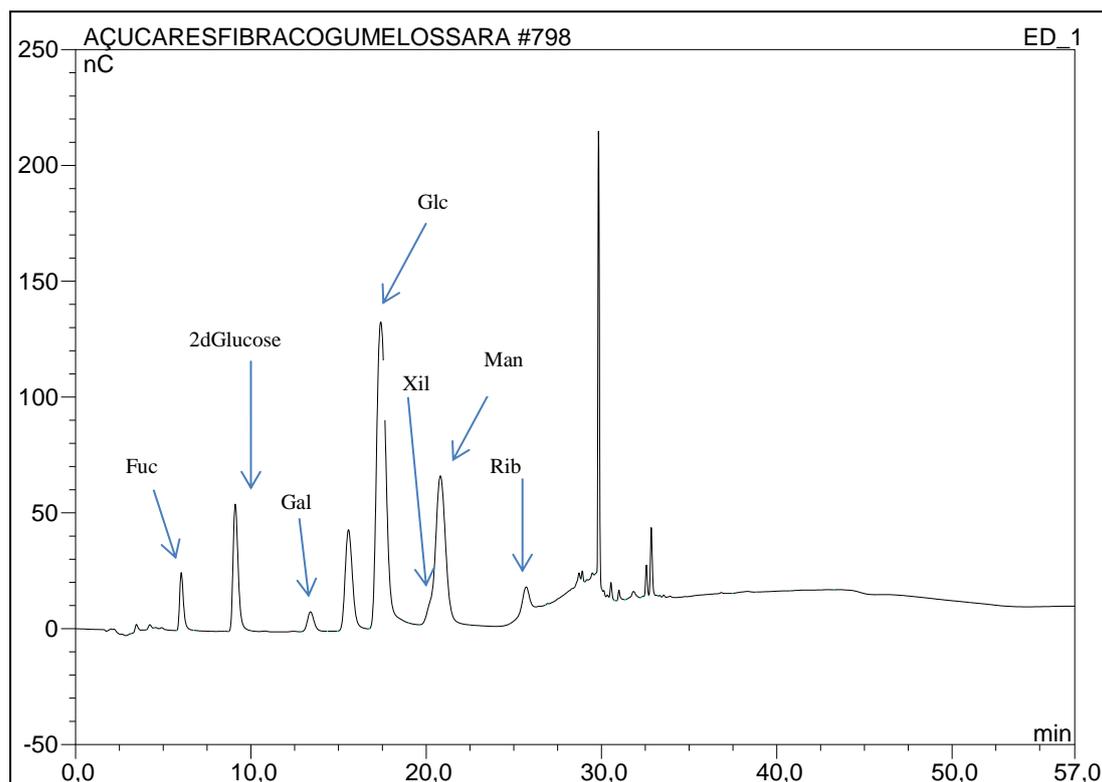


Figura 19: Cromatograma da análise de açúcares por HPAEC do material de elevado peso molecular solúvel em água do *Boletus pinophilus*.

Por forma a isolar a fração BE3 do HMWM de *Boletus edulis* e verificar a presença de uma fração semelhante no *Boletus pinophilus*, o HMWM foi sujeito a um fracionamento por cromatografia de troca aniônica de acordo com o procedimento descrito por (Lemieszek et al., 2013).

3.2 Fracionamento, do HMWM, por cromatografia de troca aniônica

Como se pode observar na Figura 20, o fracionamento do HMWM obtido por extração com água quente do carpóforo do *Boletus edulis*, resultou em três frações, uma não retida na coluna de troca aniônica (BE1) e outras duas frações retidas na coluna de troca aniônica e eluídas com concentrações crescentes de NaCl (BE2 e BE3). O cromatograma obtido para o HMWM do carpóforo de *Boletus edulis* (Fig. 20) é em tudo semelhante ao obtido para o HMWM obtido para o cogumelo inteiro descrito anteriormente (Lemieszek et al., 2013).

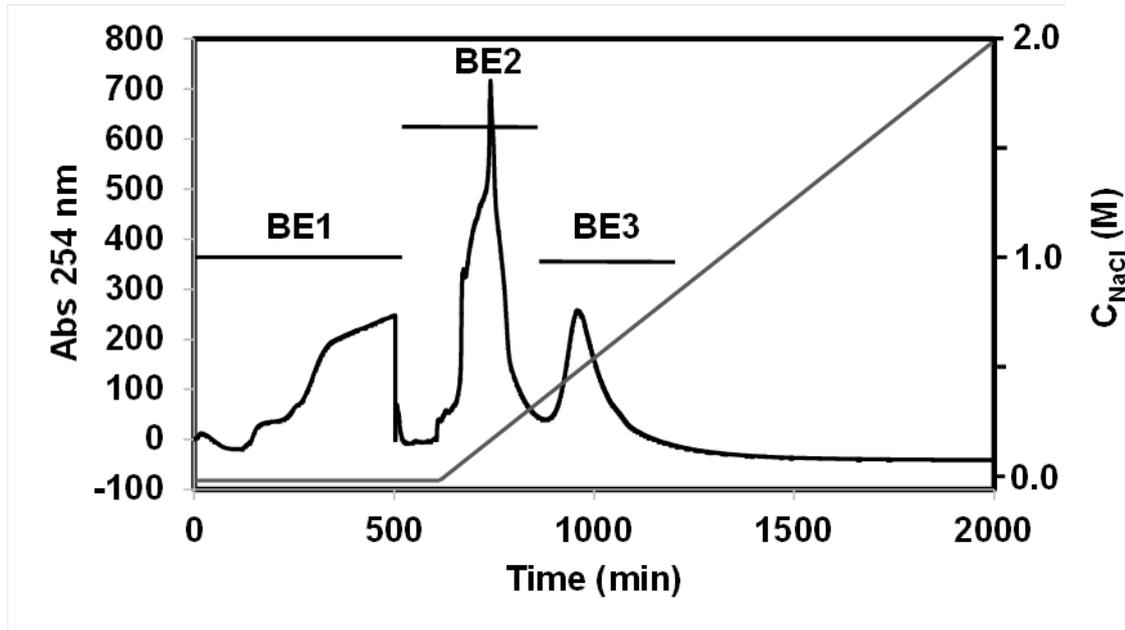


Figura 20: Cromatograma de cromatografia de troca iônica obtido no fracionamento do WSM de *Boletus edulis*.

Como se pode observar na Figura 21, as frações BE1 e BE2 apresentam um elevado teor em açúcares, sendo a abundância relativa de açúcares na fração 3 menor que nas anteriores.

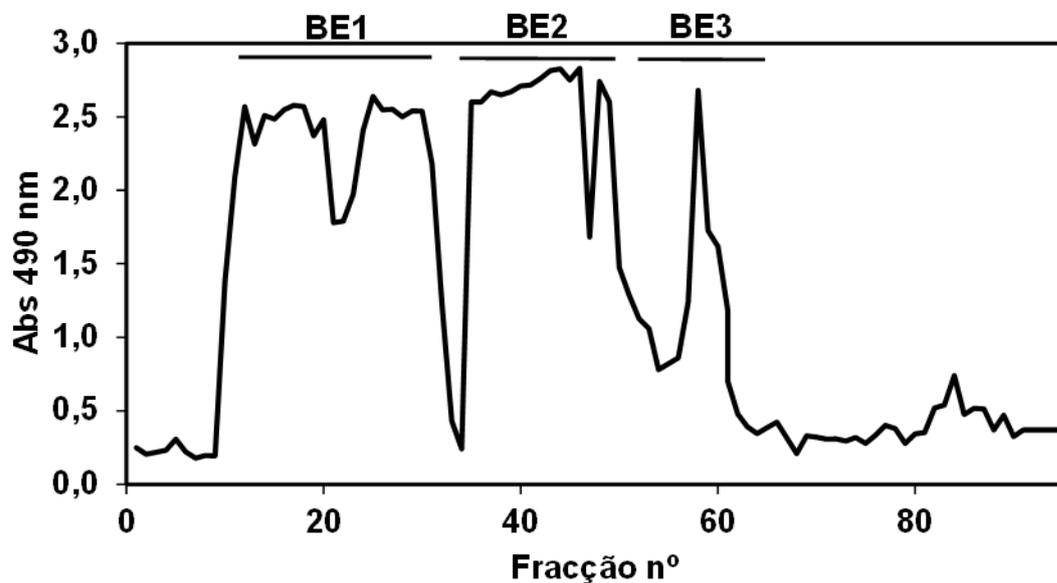


Figura 21: Cromatograma obtido por análise de açúcares das frações recolhidas após cromatografia de troca aniônica do WSM de *Boletus edulis*.

Como se pode observar na Figura 22, o fracionamento do HMWM obtido a partir do carpóforo de *Boletus pinophilus* originou um cromatograma em tudo idêntico ao obtido anteriormente para *Boletus edulis*, observando novamente uma fração não retida na coluna de troca aniônica (BP1) e outras duas frações retidas e eluídas com concentrações crescentes de NaCl (BP2 e BP3).

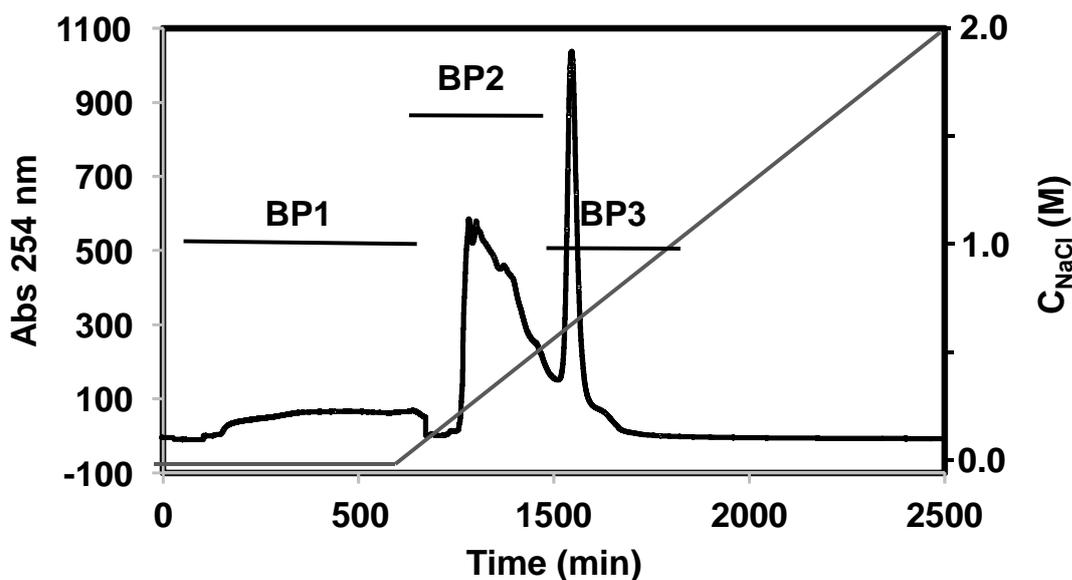


Figura 22: Cromatograma de cromatografia de troca iônica obtido no fracionamento do WSM de *Boletus pinophilus*.

O perfil de açúcares observado anteriormente para as frações obtidas por cromatografia de troca aniônica do HMWM de *Boletus edulis* é também semelhante ao obtido para *Boletus pinophilus*, isto é, a fração não retida é rica em açúcares, no entanto não se consegue observar uma separação tão clara entre a fração BP2 e BP3, tendo a separação das frações sido determinadas pelo perfil de absorvância a 254 nm.

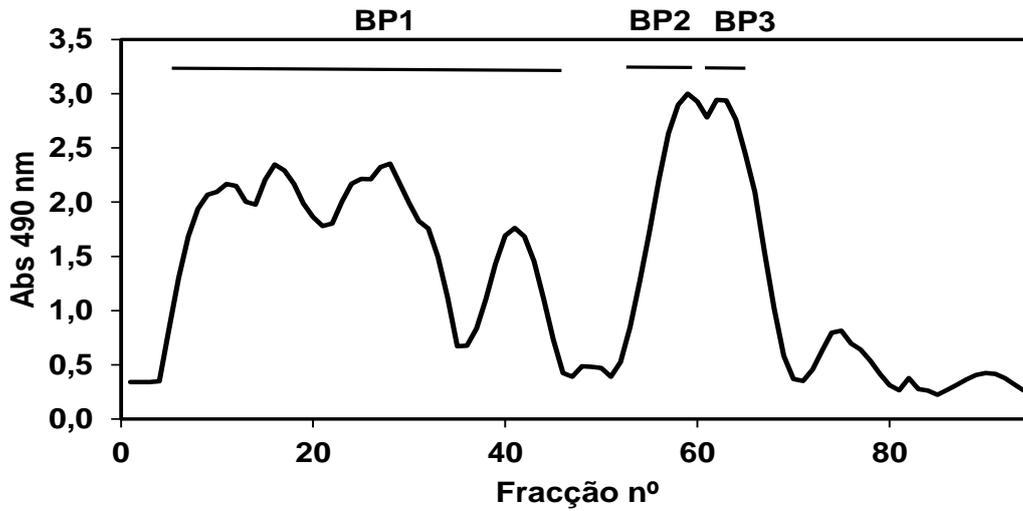


Figura 23: Cromatograma obtido por análise de açúcares das frações recolhidas após cromatografia de troca aniônica do WSM de *Boletus pinophilus*

As frações BE3 e BP3 foram recuperadas em percentagens relativamente semelhantes relativamente ao HMWM em média 4% (tabela 7) Na realidade o rendimento global do fracionamento por cromatografia de troca aniônica ficou longe da recuperação total tendo-se em médio recuperado apenas 32 a 35% do material aplicado.

A análise de açúcares da fração BE3 e BP3 mostrou que a abundância relativa em açúcares destas duas frações era semelhante e baixa, em média 15%, (Tabela 8), sendo o açúcar desconhecido o açúcar mais abundante em ambas as frações (6 e 12%, respetivamente), como também se pode observar nos cromatogramas de análise de açúcares destas duas frações (Figs. 24 e 25).

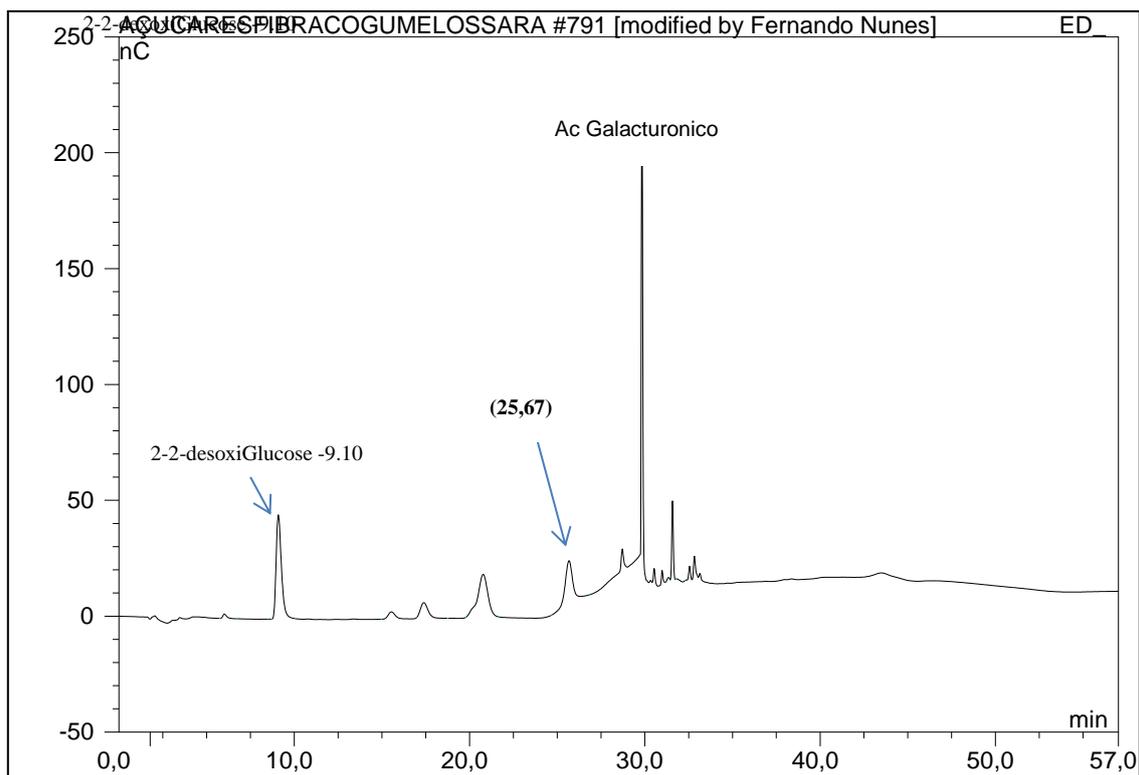


Figura 24: Cromatograma dos açúcares de BE3.

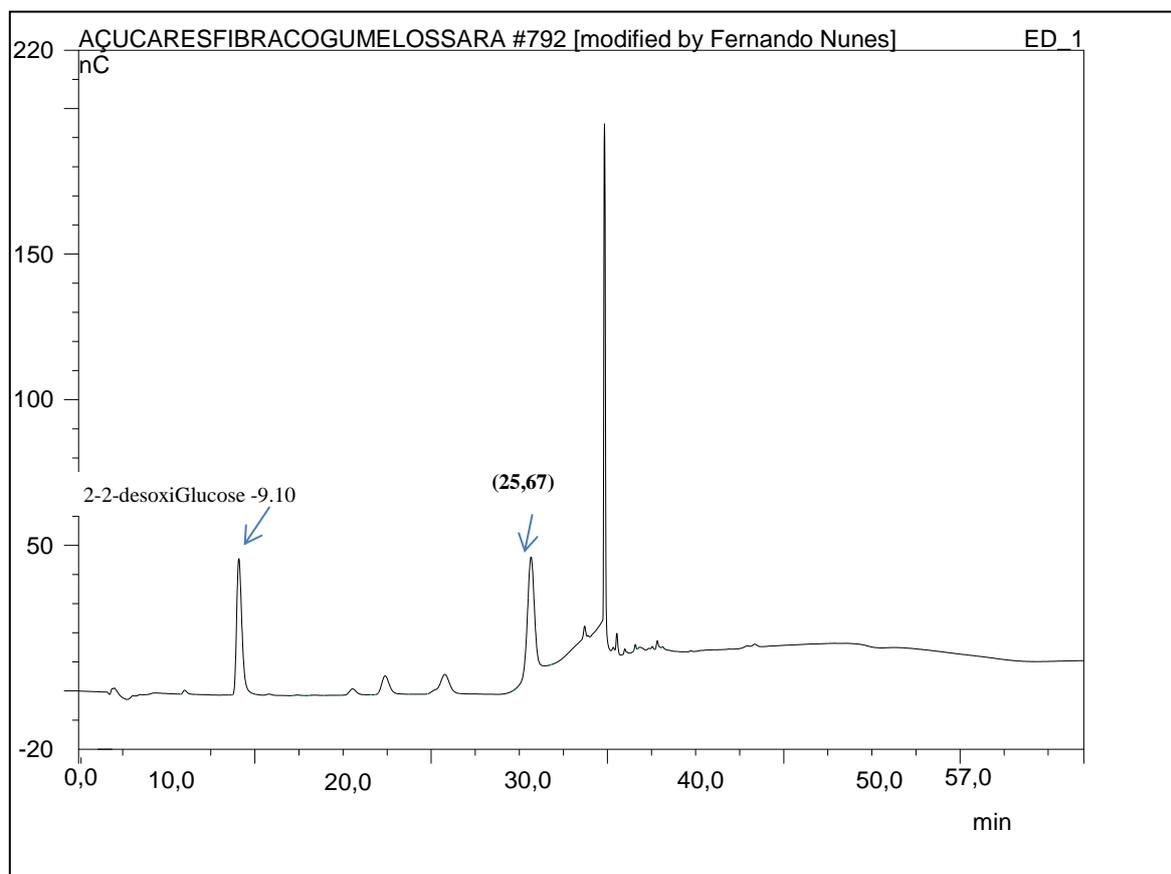


Figura 25: Cromatograma dos açúcares de BP3.

Como se pode observar dos resultados obtidos, o material BE3 e BP3 não apresenta um elevado teor de açúcares, apresentando no entanto uma coloração castanha, razão pela qual se decidiu pesquisar a presença de melaninas neste material.

3.3 Pesquisa de presença de melaninas, nas frações BE3 e BP3

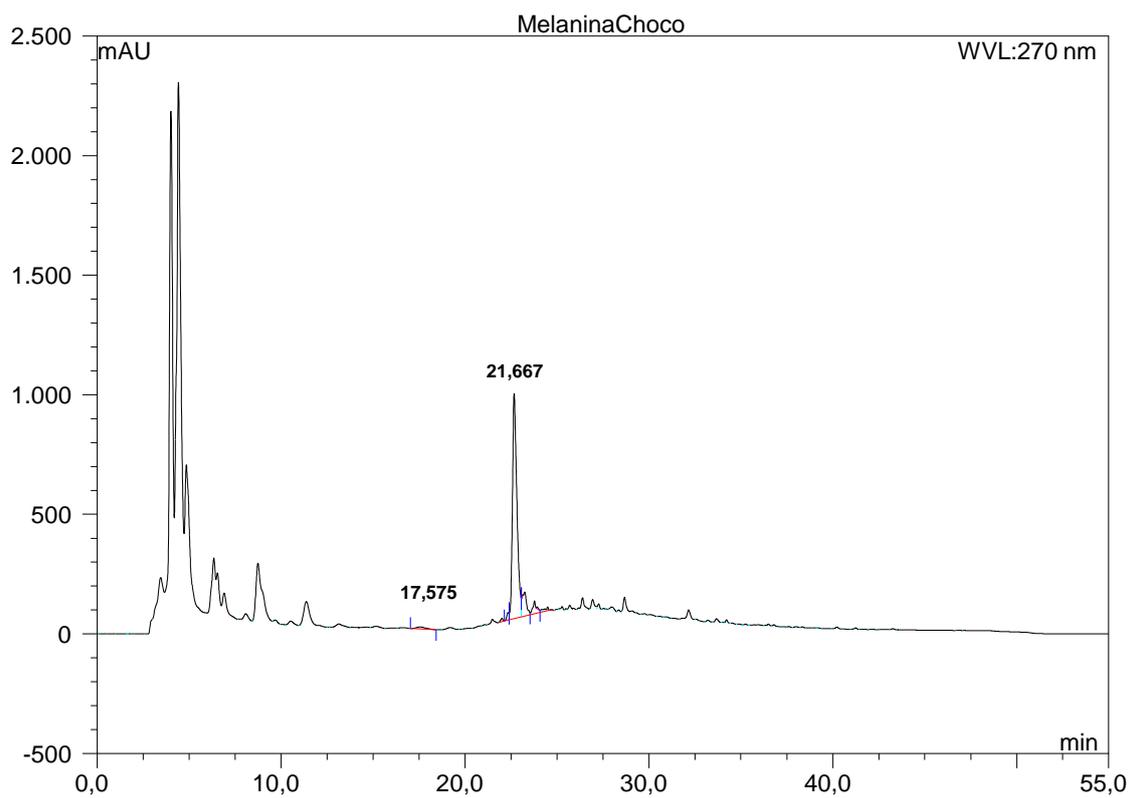
Como referido anteriormente, as frações BE3 e BP3 isoladas a partir dos carpóforos do *Boletus edulis* e *Boletus pinophilus* apresentavam um teor de polissacarídeos reduzidos, apresentando na sua composição um açúcar de natureza desconhecida.

Na tentativa de identificar e encontrar outras biomoléculas nestas fracções, com elevado peso molecular, com carga iónica, decidiu-se efetuar a análise do teor de azoto (Tabela 9). Como se pode observar as amostras de HMWM apresentam um elevado teor de azoto (~4%). De entre as macromoléculas conhecidas, contendo azoto, a estarem presentes nos cogumelos teríamos as proteínas e possivelmente as melaninas, como referido anteriormente.

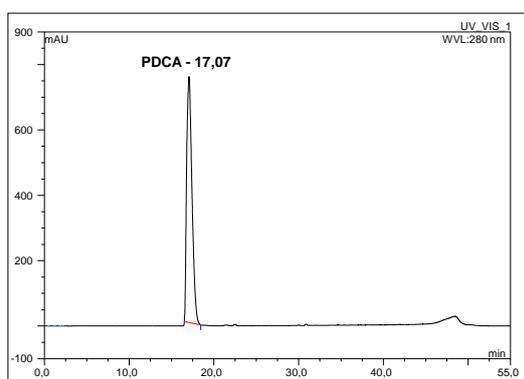
Tabela 9: Valores de Azoto nas amostras BE e BP no WSM, calculado pelo método de Dumas.

HMMW	(g) Azoto/ (100g) de Amostra
<i>Boletus edulis</i>	4,23
<i>Boletus pinophilus</i>	4,20

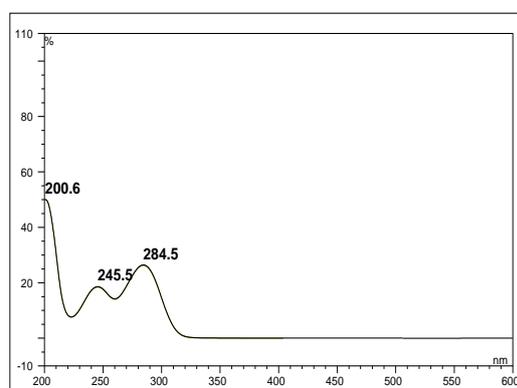
A análise do espectro de ultravioleta visível das frações de HMMW (Fig. 31) mostra que o material apresenta uma absorvância máxima a 254 nm; não apresentando então um espectro de ultravioleta típico de proteína, eliminou-se então a hipótese da presença destas no HMWM. Optou-se pois pela pesquisa da presença de eumelaninas no HMWM devido ao facto de estas moléculas conterem azoto e apresentarem carga negativa, o que poderia explicar a sua retenção na coluna de troca aniónica. Para a análise do conteúdo de eumelaninas no HMWM, este foi sujeito a oxidação alcalina (Napolitano et al., 1996). De forma a verificar se o método aplicado estava a funcionar corretamente, isolou-se a melanina da tinta de choco (*Sepia officinalis*) (Magarelli et al., 2010) e procedeu-se à oxidação simultânea desta melanina utilizando-a como referência. Como se pode observar na figura 26a, o processo de oxidação de melanina de *Sepia officinalis*, permitiu a libertação de PDCA e PTCA.



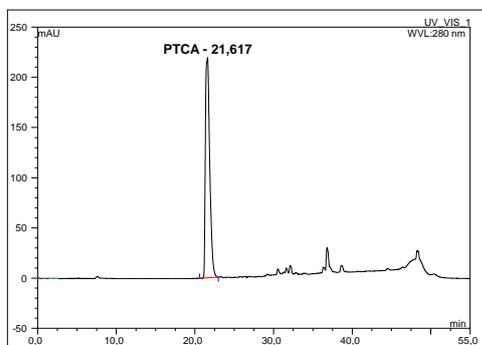
(a)



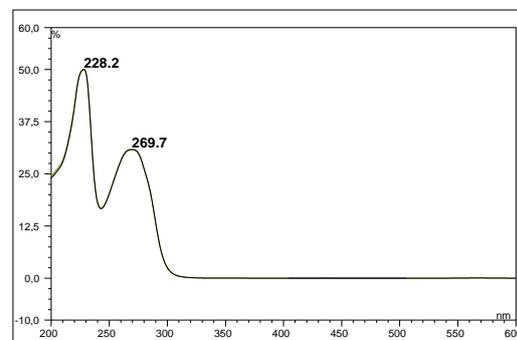
(b)



(c)



(d)



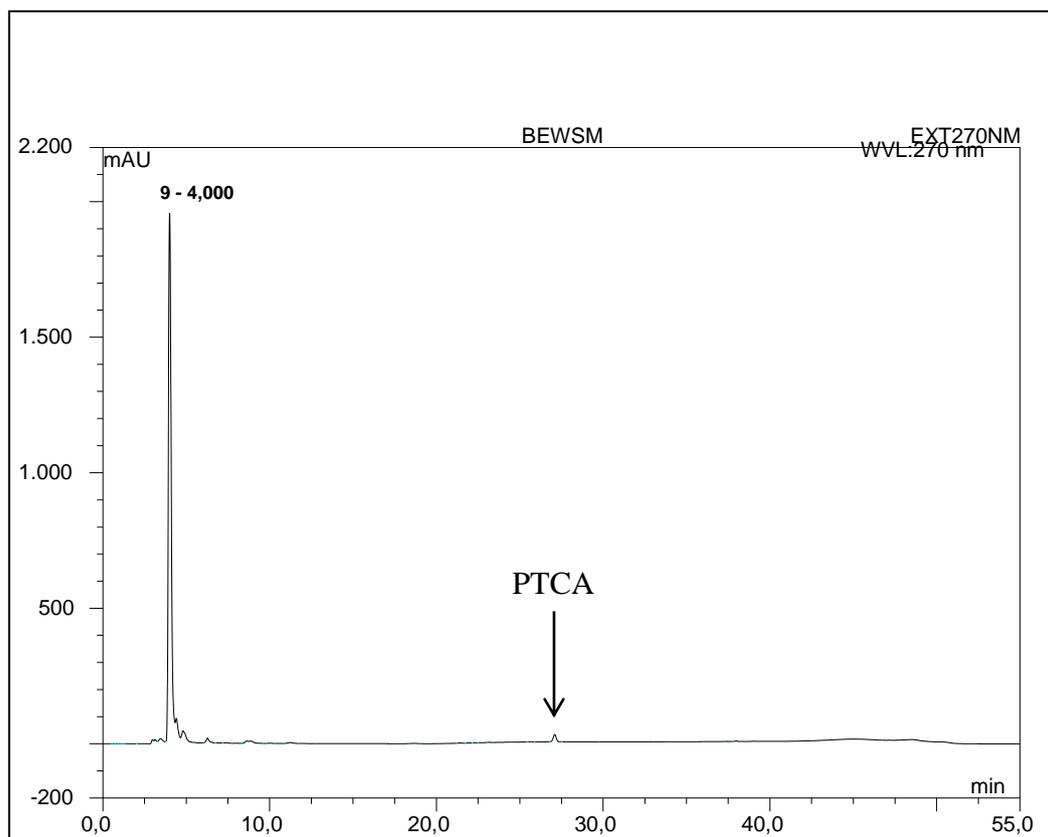
(e)

Figura 26: Cromatogramas obtidos para os produtos de oxidação da melanina do choco. (a) e padrões de PDCA e PTCA (b) e (c) e respectivos espectros de ultravioleta-visível (d) e (e).

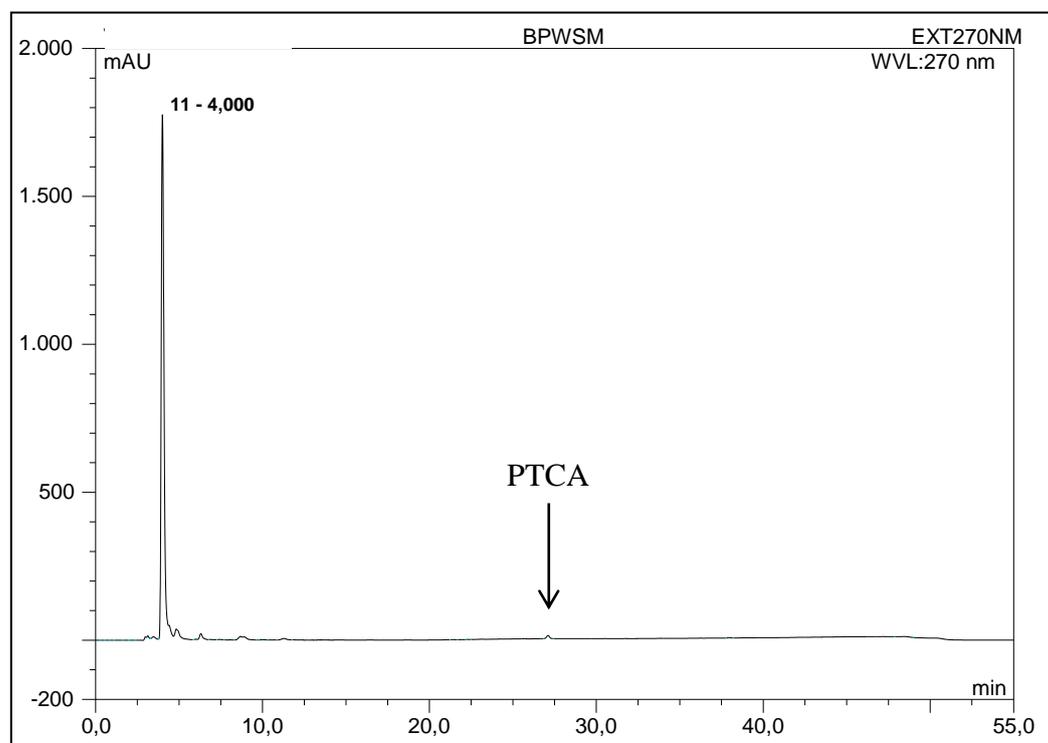
A identificação do PDCA e PTCA foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos picos obtidos por oxidação da melanina do choco com padrões de referência puros, e comparação do espectro de ultravioletas correspondentes, aos picos identificados na amostra oxidada de melanina de choco, com os espectros de ultravioleta dos mesmos padrões puros (Figs. 26 (b) e (d)).

O mesmo procedimento foi aplicado ao HMWM isolado dos carpóforos de *Boletus edulis* e *Boletus pinophilus* (figuras 27 (a) e (b)). Como se pode observar, não foi possível detectar os dois monómeros (PDCA e PTCA) resultantes do processo de oxidação das eumelaninas. Embora apareça um pico muito pequeno com um tempo de retenção aproximado ao padrão de PTCA, a sua baixa intensidade não permite a obtenção de um espectro com definição suficiente para a sua identificação inequívoca.

Desta forma conclui-se que o HMWM isolado dos carpóforos dos cogumelos *Boletus edulis* e *Boletus pinophilus* não apresenta quantidades detetáveis de eumelaninas.



(a)



(b)

Figura 27: (a) Cromatograma obtido para os produtos de oxidação do extrato de **BE3**.
(b) Cromatograma obtido para os produtos de oxidação do extrato de **PE3**.

3.4 Pesquisa de ácidos nucleicos nas frações BE3 e BP3

De entre as macromoléculas contendo azoto e carga negativa restam então os ácidos nucleicos. No caso de serem ácidos nucleicos, estes após hidrólise ácida deverão libertar açúcares, sendo a ribose no caso do ARN e a desoxirribose no caso do ADN (Zielonacka-lis, 1989). Desta forma foram injectados dois padrões dos respectivos açúcares para determinar o tempo de retenção de cada um deles no nosso sistema cromatográfico. (Figs. 28 e 29)

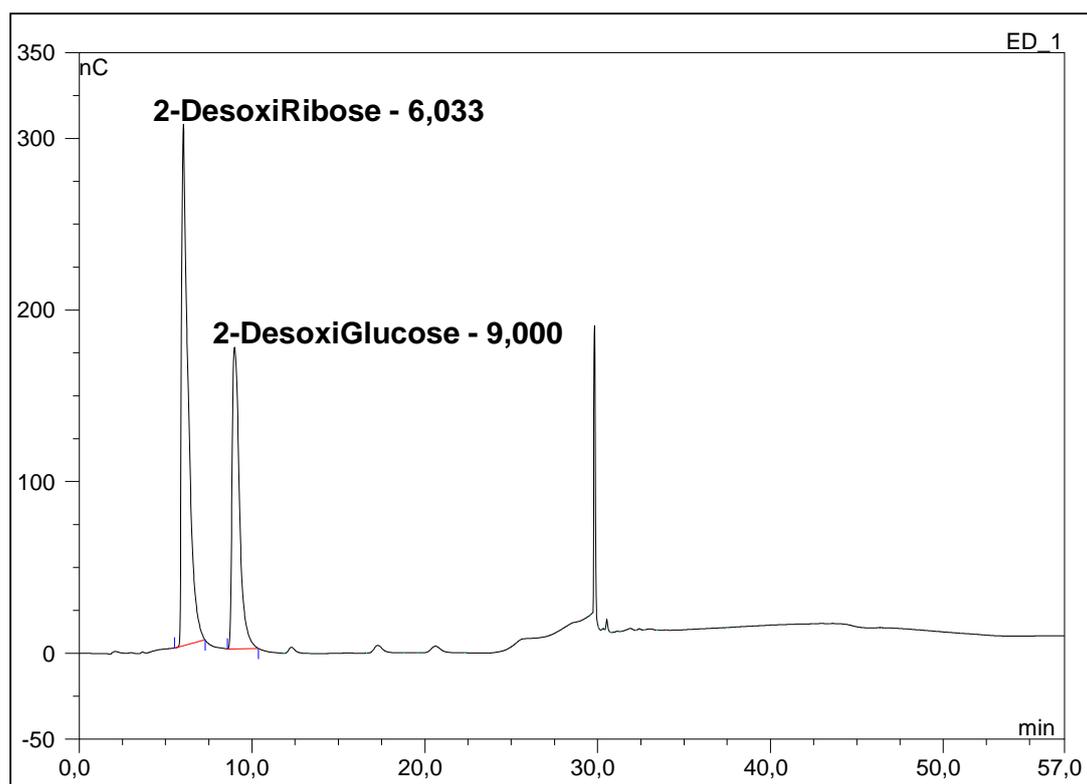


Figura 28: Tempo de retenção do padrão de desoxirribose no nosso sistema cromatográfico.

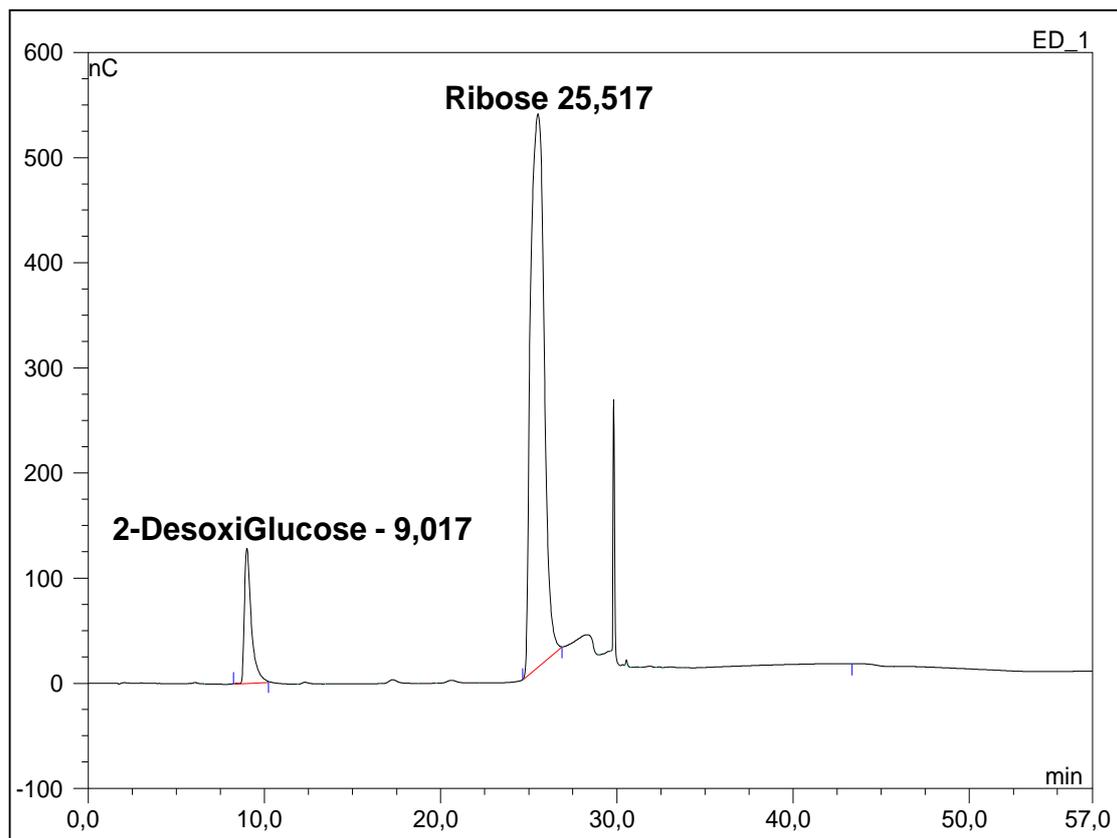


Figura 29: Tempo de retenção do padrão de ribose, no nosso sistema cromatográfico

Como se pode observar na Figura 29, o tempo de retenção da ribose é idêntico ao tempo de retenção do açúcar desconhecido presente na amostra de BE3 e BP3, não se observando a presença de 2-desoxiribose nas amostras de BE3 e BP3 (Figs. 24 e 25) sugerindo então a presença de ARN. De seguida foi-se testar o processo de hidrólise, utilizado para a análise de açúcares, para ver se se era capaz de libertar a ribose do ARN por utilização de uma amostra de ARN purificado (Fig. 30).

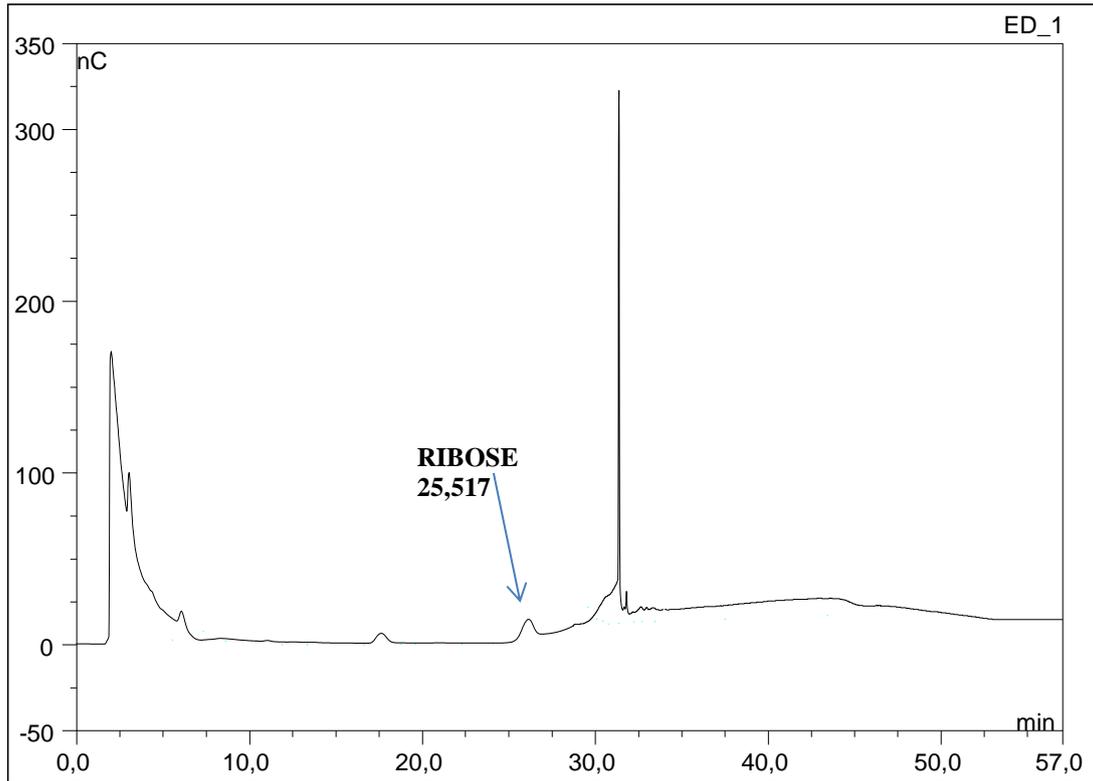


Figura 30: Cromatograma de ribose (identificativo da libertação de ribose, a partir de ARN).

Como se pode observar, o processo de hidrólise utilizando ARN puro permitiu a libertação da ribose. Este facto sugere então que o material presente nas frações BE3 e BP3 é na realidade ARN, dado que o açúcar desconhecido foi identificado como ribose.

Obteve-se, por *nanodrop*, o espectro de ultravioleta das frações, por forma a identificar a natureza química dos ácidos nucleicos, bem como, a sua concentração e pureza (Figura 31 e Tabela 10). A leitura registada (valor máximo de absorvância, para as duas amostras, para radiação incidente de 260 nm) é indicativa da presença de ácidos nucleicos, que constituirão, então, as amostras BE3 e BP3 (Campos, 2005).

Como se pôde observar a concentração de ARN em ambas as fracções foi bastante elevada (a solução original continha 1 mg da fração por mL de água ultrapura). Embora a razão A_{260}/A_{280} apresente um valor indicativo de um grau de pureza baixo. Esta afirmação é consubstanciada, na literatura científica, por ser referido que o ADN puro apresenta uma razão A_{260}/A_{280} de 1,8 e o ARN puro apresenta um valor de 2,0 para esta mesma razão. No entanto sabe-se que o pH da água e a sua força iónica tem um efeito considerável nesta razão

(Wilfinger, Mackey, & Chomczynski, 1997), não sendo, na realidade, possível atestar com certeza a pureza do ARN presente nestas frações.

Como se pode observar na figura 31 registaram-se valores máximos de absorção para radiação incidente A260, nas amostras BE3 e BP3.

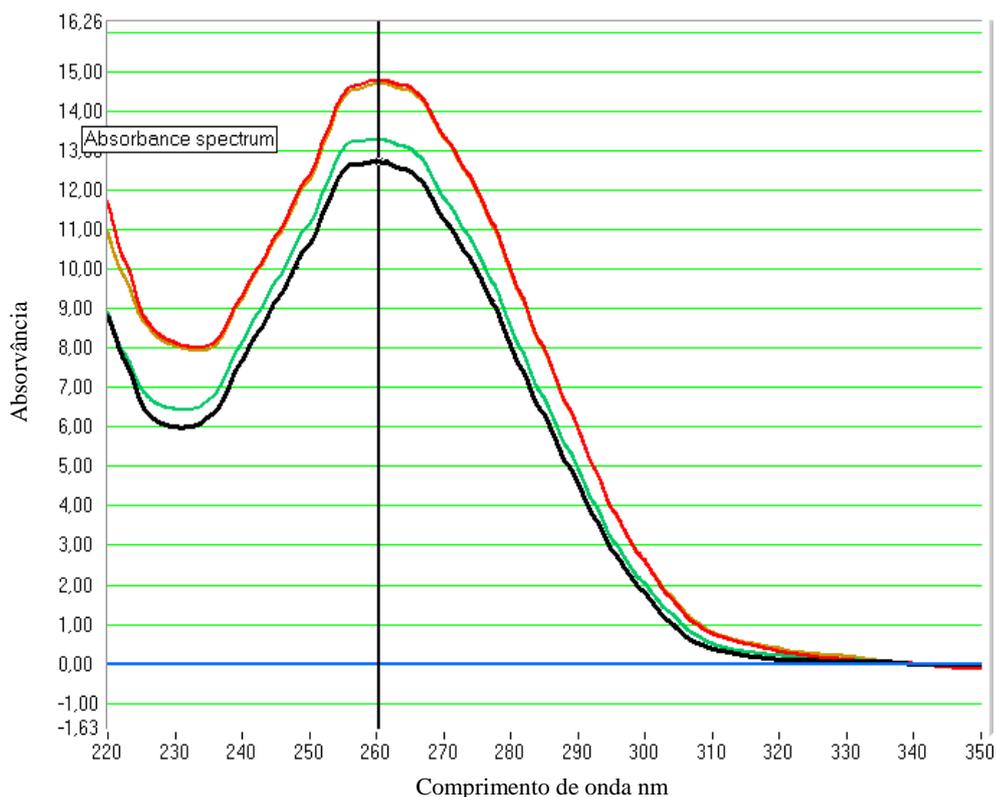


Figura 31: Espectros de Absorvância em, espectroscopia de Ultravioleta Visível (UV-Vis), das amostras BE3 (linhas pretas e verdes) e BP3 (linha vermelha).

Tabela 10: Valores de absorvância das Amostras BE3 e BP3 obtidos a 260 e a 280 nm e relações entre valores obtidos.

Sample ID	ng/ μ l	A260	A280	260/280	260/230	Constant.
BE3	532 \pm 16	12,99 \pm 0,40	8,07 \pm 0,34	1,57 \pm 0,02	2,09 \pm 0,04	40
BP3	589 \pm 2	14,73 \pm 0,06	9,97 \pm 0,05	1,48 \pm 0	2,09 \pm 0,04	40

De seguida as frações BE3 e BP3 foram sujeitas a eletroforese em gel de agarose, e analisadas, tendo sido coradas com brometo de etídio (corante específico para ácidos nucleicos por intercalação das bases dos ácidos nucleicos). Como se pode observar na figura 32, foi possível visualizar duas bandas de grande intensidade com um tamanho inferior a 100 pares de base (pb).

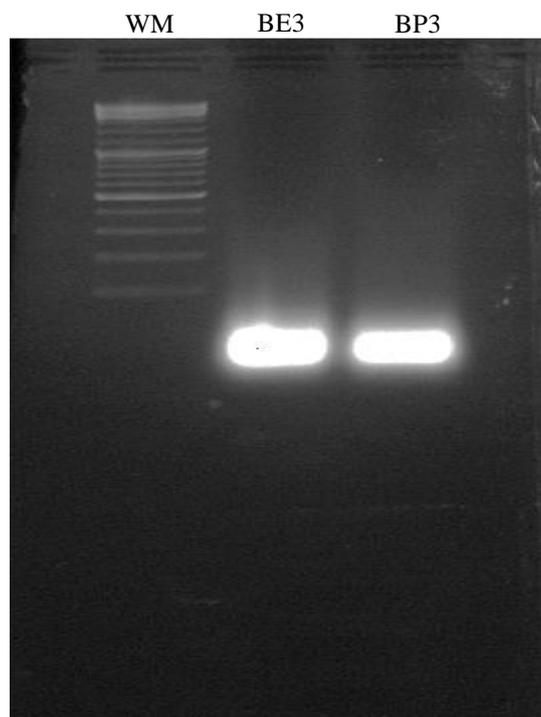


Figura 32: Eletroforese em Gel de Agarose WM banda BE3 e banda BP3, respetivamente da esquerda para direita.

Os resultados obtidos para o gel de agarose demonstram a presença de ácidos nucleicos. Para confirmar a identidade dos ácidos nucleicos como ARN, como sugerido pelos resultados da análise de açúcares (elevada % de ribose registada em HPLC e não de desoxirribose), o material foi tratado com DNase I.

Não se tendo verificado alteração do perfil de ácidos nucleicos, confirmou-se assim, não se tratar de ADN e por exclusão de partes será ARN.

O A O A

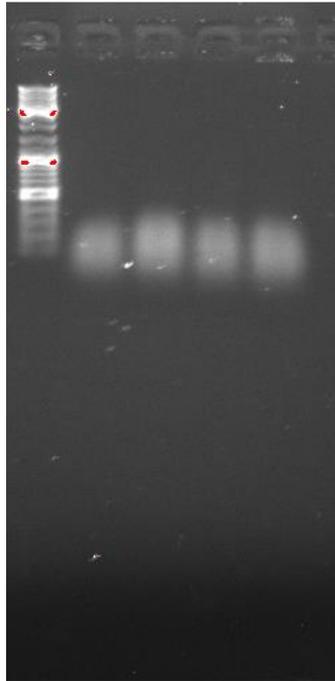


Figura 33: Eletroforese em Gel de Agarose de *BE3* e *BP3*, respectivamente, original (O) e após (A) tratamento com a DNase.

De forma a conhecer a sequência do ARN de ambas as espécies, *Boletus edulis* e de *Boletus pinophilus*, e qual a identidade que existirá entre as sequências de ARN das duas espécies, bem como para perceber qual a razão para a fração BE3 apresentar tão elevada atividade antitumoral, procedeu-se à síntese do cDNA para posterior sequenciação (Fig. 34)

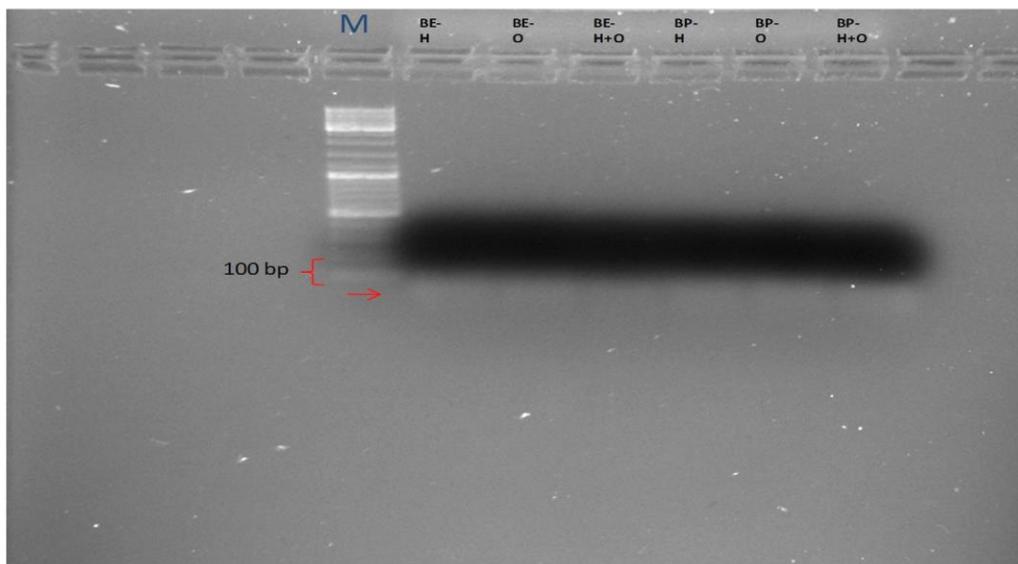


Figura 34: Transcrição reversa do ARN assinalado com a seta a vermelho. A nomenclatura *BE* e *BP* corresponde à amostra utilizada e a nomenclatura, O e/ou H corresponde ao tipo de priming utilizado, O- Oligo-dT e H- Random Hexamer.

Foi possível sintetizar com sucesso o cDNA com os dois tipos de primers utilizados. Como os primers utilizados foram de sequência aleatória (random hexamer e oligo-dT), já que a sequência das amostras BE3 e BP3 não é conhecida, a técnica de sequenciação utilizada terá de ser NexGen (NextGeneration), razão pela qual ainda não temos os resultados.

3.4.1 Atividade Anti Tumoral das frações BE3 e BP3 para as células de carcinoma de cólon, HT29

As frações obtidas da purificação do material solúvel em água (WSM_{dial}) foram testadas no que diz respeito à sua atividade antiproliferativa *in vitro* numa linha celular tumoral, células cancerosas HT29, derivadas de células de cancro do cólon. O efeito de frações BP3 e BE3, medido através do teste de MTT, foi diferenciado.

Pelos resultados obtidos constata-se que a fração de ARN isolado a partir do *Boletus edulis* apresenta uma atividade proliferativa muito significativa, à medida que a concentração aumenta a atividade proliferativa das células tumorais diminui, dependendo assim a capacidade de inibição da atividade proliferativa da quantidade de extrato aplicado, resultando numa redução de quase 90% das células HT29 para a concentração de 250µg/mL (Fig. 35 (a)). No entanto a fração de ARN isolada a partir do *Boletus pinophilus* não apresenta a mesma capacidade antiproliferativa (Fig. 35 (b)). A Inibição das células HT29 pelo BP3 foi fraca (IC₅₀ 1364,7 µg/ml) no teste de MTT, contudo, no ensaio BrdU demonstrou inibição estatisticamente significativa da proliferação de células cancerígenas HT29 para 250 µg/ml de BP3. O teste revelou também a estimulação da proliferação de células após o tratamento com 25 µg/ml e 75 µg/ml de BP3.

Os gráficos que se seguem (Fig. 35 (a) e (c)) referem-se à actividade antiproliferativa de BE3 e BS4, respetivamente, *in vitro*, na linha celular tumoral HT29 testadas em (Cardoso, 2011). O gráfico da figura 35 (b) refere-se à actividade antiproliferativa de BP3, no teste MTT, efetuado na nossa pesquisa.

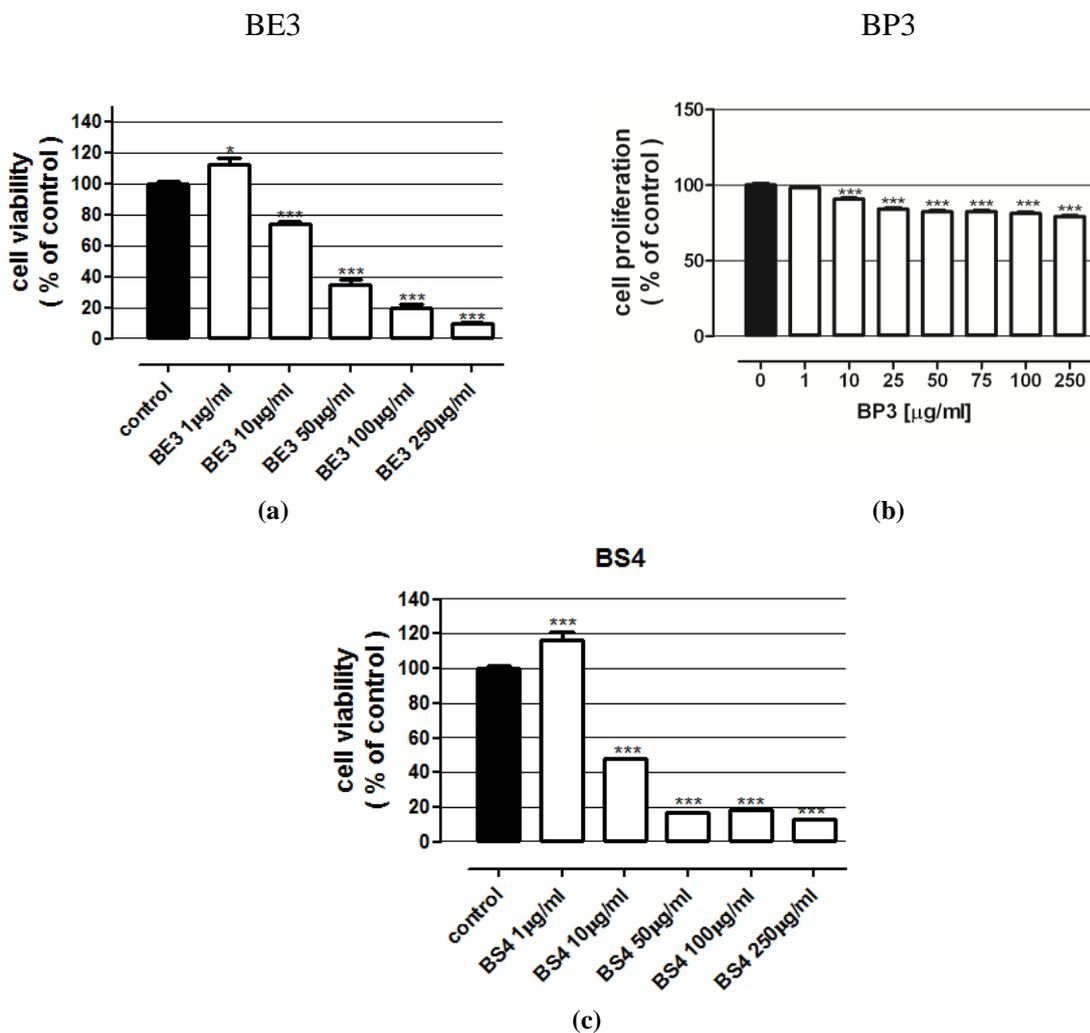


Figura 35: (a) Ação antiproliferativa nas linhas celulares HT29 de BE3. (b) Ação antiproliferativa nas linhas celulares HT29 de BP3. (c) Ação antiproliferativa nas linhas celulares HT29 de BS4. Nota: Utilização do método MTT.

Estes resultados mostram que apesar de as duas frações isoladas dos carpóforos dos cogumelos de *Boletus edulis* e *Boletus pinophilus* serem ARN, estes não apresentam a mesma ação antiproliferativa nas linhas celulares HT29, sugerindo que a sua estrutura química seja importante, para a sua ação antiproliferativa. Retomando os dados obtidos por Cardoso (2012), verifica-se que o cogumelo *Boletus spretus* também contem ARN com uma atividade antiproliferativa muito elevada para a mesmas concentrações de extrato (Fig. 35 (a) e (c)) e na mesma linha celular. Constata-se que para BS4 a composição em açúcares (tabela 11) é muito semelhante à obtida para as frações BE3 e BP3 (tabela 8).

Tabela 11: Composição e rendimento em açúcares da fração BS4, isolada, do *Boletus spretus* (Cardoso, 2011).

Frações	(%) ^a	Açúcares (%)						Total
		Fuc	GluN	Gal	Glc	Man	Desc.	
BS4	7,0 ^a	Vest.	Vest.	2,0	2,1	2,2	11	17,3

Estes resultados mostram que a fração de ARN com atividade antitumoral não é exclusiva do *Boletus edulis*, já que está também presente em *Boletus spretus*; no entanto nem todos os *Boletus* parecem apresentar este ARN, com atividade antitumoral, já que *Boletus pinophilus* não a evidencia. Este facto reforça a ideia de que a estrutura química do ARN será fundamental para a sua ação antitumoral, sendo por isso necessários mais estudos.

Anteriormente foi descrito na literatura o isolamento de um complexo ARN -proteína a partir do extrato solúvel do *Agaricus blazei* (Takashi Mizuno et al., 1990). Esta fração obtida após purificação por diálise, cromatografia de troca aniónica, cromatografia de filtração em gel e cromatografia de afinidade, apresentou uma atividade antitumoral elevadíssima (95.44%) em ratos ICR/JCL implantados com o Sarcoma 180 quando administrado intraperitonealmente. Esta fração designada por FA-2-b-β apresenta um espectro de ultravioleta-visível em tudo semelhante ao obtido nas frações BE3 e BP3, apresentado também como açúcar maioritário a ribose. Adicionalmente tem sido também reportado na literatura o isolamento de ARN de cadeia dupla em cogumelos, concretamente em *Agrocybe aegerita* (Barroso & Labarère, 1990) e em cogumelos e esporos de *Lentinus edodes* (Ushiyama, Nakai, & Ikegami, 1977) e, com atividades carcinoestáticas e antivirais (Tsunoda & Ishida, 1970). Alguns destes RNAs demonstraram possuir atividades biológicas entre as quais atividade antivírica (Takehara, Kuida, & Mori, 1979), estimulação do sistema imunitário (Mizoguchi, Katoh, Kobayashi, Yamamoto, & Morisawa, 1987).

3.5 Conclusões

Não se encontraram melaninas (PDCA e PTCA em quantidades detetáveis) nas fracções extraídas de *Boletus*. Por outro lado pode-se dizer que a fracção BE3, extraída do cogumelo *Boletus edulis*, e que apresentou uma elevada atividade anticancerígena (~90%), contém ARN.

Foi possível também isolar ARN duma outra espécie, *Boletus pinophilus*, mas neste caso este não apresentava atividade antitumoral significativa, no Teste BrdU. Este facto indica que, muito provavelmente, a sequência ou conformação apresentada, pela molécula de ARN, isolado a partir destes dois cogumelos, será importante para a sua atividade antitumoral.

Serão necessários estudos posteriores para confirmar esta hipótese.

Nesses estudos será essencial a sequenciação e análise do ARN dos diferentes *Boletus* (*B. edulis*, *B. pinophilus* e *B. spretus*), a repetição dos testes de inibição da proliferação de células cancerígenas, podendo também o estudo ser estendido a outras linhagens de células cancerosas.

Referências

- Adams, L. S., Phung, S., Wu, X., Ki, L., & Chen, S. (2008). White button mushroom (*Agaricus bisporus*) exhibits antiproliferative and proapoptotic properties and inhibits prostate tumor growth in athymic mice. *Nutrition and Cancer*, 60(6), 744–756. doi:10.1080/01635580802192866
- Akiyama, H., Endo, M., Matsui, T., Katsuda, I., Emi, N., Kawamoto, Y., ... Beppu, H. (2011). Agaritine from *Agaricus blazei* Murrill induces apoptosis in the leukemic cell line U937. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1810(5), 519–525. doi:10.1016/j.bbagen.2011.02.010
- Asatiani, M. D., Wasser, S. P., Nevo, E., Ruimi, N., Mahajna, J., & Reznick, A. Z. (2011). The Shaggy Inc Cap medicinal mushroom, *Coprinus comatus* (O.F.Mull.: Fr.) Pers. (Agaricomycetidae) substances interfere with H₂O₂ induction of the NF-kappaB pathway through inhibition of Ikappaalpha phosphorylation in MCF7 breast cancer cells. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 13(1), 19–25.
- Barros, L., Baptista, P., Estevinho, L. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2007). Bioactive properties of the medicinal mushroom *Leucopaxillus giganteus* mycelium obtained in the presence of different nitrogen sources. *Food Chemistry*, 105(1), 179–186. doi:10.1016/j.foodchem.2007.03.063
- Barroso, G., & Labarère, J. (1990). Evidence for viral and naked double-stranded RNAs in the basidiomycete *Agrocybe aegerita*. *Current Genetics*, 18(3), 231–237. doi:10.1007/BF00318386
- Begell, W. (2005). International Journal of Medicinal Mushrooms: Celebrating Seven Years. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 7(3). Retrieved from <http://www.dl.begellhouse.com/journals/708ae68d64b17c52,0d0f121956dd501b,1de6362256f0d395.html>
- Bell, A., & Wheeler, M. (1986). Biosynthesis and Functions of Fungal Melanins. *Annual Review of Phytopathology*, 24, 411–451. doi:10.1146/annurev.py.24.090186.002211
- Borchers, A. T., Krishnamurthy, A., Keen, C. L., Meyers, F. J., & Gershwin, M. E. (2008). The Immunobiology of Mushrooms. *Experimental Biology and Medicine*, 233(3), 259–276. doi:10.3181/0708-MR-227
- Cai, X., Pi, Y., Zhou, X., Tian, L., Qiao, S., & Lin, J. (2010). Hepatoma Cell Growth Inhibition by Inducing Apoptosis with Polysaccharide Isolated from Turkey tail Medicinal Mushroom, *Trametes versicolor* (L.: Fr.) Lloyd (Aphyllophoromycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 12(3), 257–263. doi:10.1615/IntJMedMushr.v12.i3.40
- Campos, L. S. (2005). *Entender a bioquímica* (5th ed.). Escolar Editora.
- Capasso, L. (1998). 5300 years ago, the Ice Man used natural laxatives and antibiotics. *The Lancet*, 352(9143), 1864. doi:10.1016/S0140-6736(05)79939-6

- Cardoso, C. S. P. (2011). *Isolamento, Caracterização Química e Avaliação da Actividade Anti-Tumoral de Polissacarídeos de Cogumelos Silvestres Comestíveis* (Tese de Mestrado em Biotecnologia e Qualidade Alimentar). Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.
- Chan, Y.-Y., Chang, C.-S., Chien, L.-H., & Wu, T.-F. (2010). Apoptotic effects of a high performance liquid chromatography (HPLC) fraction of *Antrodia camphorata* mycelia are mediated by down-regulation of the expressions of four tumor-related genes in human non-small cell lung carcinoma A549 cell. *Journal of Ethnopharmacology*, *127*(3), 652–661. doi:10.1016/j.jep.2009.12.008
- Chang, C.-Y., Huang, Z.-N., Yu, H.-H., Chang, L.-H., Li, S.-L., Chen, Y.-P., ... Chuu, J.-J. (2008). The adjuvant effects of *Antrodia Camphorata* extracts combined with anti-tumor agents on multidrug resistant human hepatoma cells. *Journal of Ethnopharmacology*, *118*(3), 387–395. doi:10.1016/j.jep.2008.05.001
- Chang, H.-H., Chien, P.-J., Tong, M.-H., & Sheu, F. (2007). Mushroom immunomodulatory proteins possess potential thermal/freezing resistance, acid/alkali tolerance and dehydration stability. *Food Chemistry*, *105*(2), 597–605. doi:10.1016/j.foodchem.2007.04.048
- Chang, H.-H., Hsieh, K.-Y., Yeh, C.-H., Tu, Y.-P., & Sheu, F. (2010). Oral administration of an Enoki mushroom protein FVE activates innate and adaptive immunity and induces anti-tumor activity against murine hepatocellular carcinoma. *International Immunopharmacology*, *10*(2), 239–246. doi:10.1016/j.intimp.2009.10.017
- Chang, H.-M., & But, P. P. H. (1993). *Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica* (Vol. 1). World Scientific.
- Chen, J., & Seviour, R. (2007). Medicinal importance of fungal β -(1→3), (1→6)-glucans. *Mycological Research*, *111*(6), 635–652. doi:10.1016/j.mycres.2007.02.011
- Chen, N.-H., & Zhong, J.-J. (2011). p53 is important for the anti-invasion of ganoderic acid T in human carcinoma cells. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, *18*(8-9), 719–725. doi:10.1016/j.phymed.2011.01.011
- Chen, W., Zhao, Z., Chen, S.-F., & Li, Y.-Q. (2008). Optimization for the production of exopolysaccharide from *Fomes fomentarius* in submerged culture and its antitumor effect in vitro. *Bioresource Technology*, *99*(8), 3187–3194. doi:10.1016/j.biortech.2007.05.049
- Chen, W., Zhao, Z., & Li, Y. (2011). Simultaneous increase of mycelial biomass and intracellular polysaccharide from *Fomes fomentarius* and its biological function of gastric cancer intervention. *Carbohydrate Polymers*, *85*(2), 369–375. doi:10.1016/j.carbpol.2011.02.035
- Chu, K. K. W., Ho, S. S. S., & Chow, A. H. L. (2002). *Coriolus versicolor*: a medicinal mushroom with promising immunotherapeutic values. *Journal of Clinical Pharmacology*, *42*(9), 976–984.

- Coetze, J. C., & Wyk, A. van. (2009). The genus *Calvatia* (“Gasteromycetes”, Lycoperdaceae): A review of its ethnomycology and biotechnological potential. *African Journal of Biotechnology*, 8(22). doi:10.4314/ajb.v8i22.66089
- Cui, F.-J., Li, Y., Xu, Y.-Y., Liu, Z.-Q., Huang, D.-M., Zhang, Z.-C., & Tao, W.-Y. (2007). Induction of apoptosis in SGC-7901 cells by polysaccharide-peptide GFPS1b from the cultured mycelia of *Grifola frondosa* GF9801. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 21(3), 417–427. doi:10.1016/j.tiv.2006.10.004
- Cui, J., & Chisti, Y. (2003). Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production. *Biotechnology Advances*, 21(2), 109–122.
- DaSilva, E. J. (2005). Mushrooms in Medicine and Culture. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 7(1-2), 75–78. doi:10.1615/IntJMedMushr.v7.i12.80
- Delmanto, R. D., de Lima, P. L., Sugui, M. M., da Eira, A. F., Salvadori, D. M., Speit, G., & Ribeiro, L. R. (2001). Antimutagenic effect of *Agaricus blazei*, Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. *Mutation Research*, 496(1-2), 15–21.
- Denisova, N. P. (2010). History of the Study of Thrombolytic and Fibrinolytic Enzymes of Higher Basidiomycetes Mushrooms at the V.L. Komarov Botanical Institute in Saint Petersburg, Russia. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 12(3), 317–325. doi:10.1615/IntJMedMushr.v12.i3.110
- Dominguez, A. C. (2008). *Guia de los boletos de España y Portugal*. Medina del Campo: Nayade Producciones, S.L.
- Ebina, T., & Fujimiya, Y. (1998). Antitumor effect of a peptide-glucan preparation extracted from *Agaricus blazei* in a double-grafted tumor system in mice. *Biotherapy (Dordrecht, Netherlands)*, 11(4), 259–265.
- Ebrahimzadeh, M. A., Nabavi, S. M., Nabavi, S. F., & Eslami, S. (2010). Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of Culinary-Medicinal Mushrooms, Golden Chanterelle *Cantharellus cibarius* and Angel’s Wings *Pleurotus porrigens*. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 12(3), 265–272. doi:10.1615/IntJMedMushr.v12.i3.50
- Ey, J., Schömig, E., & Taubert, D. (2007). Dietary Sources and Antioxidant Effects of Ergothioneine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6466–6474. doi:10.1021/jf071328f
- Fantuzzi, E., Anastacio, L. R., Nicoli, J. R., de Paula, S. O., Arantes, R. M. E., da Matta, S. L. P., & Vanetti, M. C. D. (2010). Aqueous Extract of Culinary-Medicinal Royal Sun Mushroom, *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. (Agaricomycetidae) Effects on Immunodepression in Mice. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 12(3), 227–234. doi:10.1615/IntJMedMushr.v12.i3.10
- Grob, C. S., Danforth, A. L., Chopra, G. S., Hagerty, M., McKay, C. R., Halberstadt, A. L., & Greer, G. R. (2011). Pilot study of psilocybin treatment for anxiety in patients with

- advanced-stage cancer. *Archives of General Psychiatry*, 68(1), 71–78. doi:10.1001/archgenpsychiatry.2010.116
- Gu, Y.-H., & Belury, M. A. (2005). Selective induction of apoptosis in murine skin carcinoma cells (CH72) by an ethanol extract of *Lentinula edodes*. *Cancer Letters*, 220(1), 21–28. doi:10.1016/j.canlet.2004.06.037
- Gu, Y.-H., & Leonard, J. (2006). In vitro effects on proliferation, apoptosis and colony inhibition in ER-dependent and ER-independent human breast cancer cells by selected mushroom species. *Oncology Reports*, 15(2), 417–423.
- Henson, J. M., Butler, M. J., & Day, A. W. (1999). THE DARK SIDE OF THE MYCELIUM: Melanins of Phytopathogenic Fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 37, 447–471. doi:10.1146/annurev.phyto.37.1.447
- Hobbs, C. (1995). *Medicinal mushrooms: an exploration of tradition, healing & culture*.
- Hseu, Y.-C., Chen, S.-C., Tsai, P.-C., Chen, C.-S., Lu, F.-J., Chang, N.-W., & Yang, H.-L. (2007). Inhibition of cyclooxygenase-2 and induction of apoptosis in estrogen-nonresponsive breast cancer cells by *Antrodia camphorata*. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 45(7), 1107–1115. doi:10.1016/j.fct.2006.12.012
- Hsieh, T. C., & Wu, J. M. (2001). Cell growth and gene modulatory activities of Yunzhi (Windsor Wunxi) from mushroom *Trametes versicolor* in androgen-dependent and androgen-insensitive human prostate cancer cells. *International Journal of Oncology*, 18(1), 81–89.
- Hsu, S.-C., Ou, C.-C., Li, J.-W., Chuang, T.-C., Kuo, H.-P., Liu, J.-Y., ... Kao, M.-C. (2008). *Ganoderma tsugae* extracts inhibit colorectal cancer cell growth via G(2)/M cell cycle arrest. *Journal of Ethnopharmacology*, 120(3), 394–401. doi:10.1016/j.jep.2008.09.025
- Hsu, Y.-L., Kuo, P.-L., Cho, C.-Y., Ni, W.-C., Tzeng, T.-F., Ng, L.-T., ... Lin, C.-C. (2007). *Antrodia cinnamomea* fruiting bodies extract suppresses the invasive potential of human liver cancer cell line PLC/PRF/5 through inhibition of nuclear factor κB pathway. *Food and Chemical Toxicology*, 45(7), 1249–1257. doi:10.1016/j.fct.2007.01.005
- Huang, H.-Y., Chieh, S.-Y., Tso, T. K., Chien, T.-Y., Lin, H.-T., & Tsai, Y.-C. (2011). Orally administered mycelial culture of *Phellinus linteus* exhibits antitumor effects in hepatoma cell-bearing mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2), 460–466. doi:10.1016/j.jep.2010.10.015
- Ito, S., & Wakamatsu, K. (2007). Chemistry of Melanins. In J. J. Nordlund, R. E. Boissy, V. J. Hearing, R. A. King, W. S. Oetting, & J.-P. Ortonne (Eds.), *The Pigmentary System* (pp. 282–310). Blackwell Publishing Ltd. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470987100.ch15/summary>

- Ito, S., Wakamatsu, K., d' Ischia, M., Napolitano, A., & Pezzella, A. (2011). Structure of melanins. In *Melanins and Melanosomes: Biosynthesis, Biogenesis, Physiological, and Pathological Functions* (pp. 167–185). Jan Borovansky, Patrick A. Riley.
- Jander-Shagug, G., & Masaphy, S. (2010). Free Radical Scavenging Activity of Culinary-Medicinal Morel Mushrooms, *Morchella Dill. ex Pers.* (Ascomycetes): Relation to Color and Phenol Contents. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 12(3), 299–307. doi:10.1615/IntJMedMushr.v12.i3.90
- Kandefer-Szersen, M., Kawecki, Z., Salata, B., & Witek, M. (1980). Mushrooms as a source of substances with antiviral activity. *Acta Mycol*, 16, 215–220.
- Kim, C.-F., Jiang, J.-J., Leung, K.-N., Fung, K.-P., & Lau, C. B.-S. (2009). Inhibitory effects of *Agaricus blazei* extracts on human myeloid leukemia cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 122(2), 320–326. doi:10.1016/j.jep.2008.12.025
- Kim, H. S., Kim, J. Y., Kang, J. S., Kim, H. M., Kim, Y. O., Hong, I. P., ... Han, S.-B. (2010). Cordlan polysaccharide isolated from mushroom *Cordyceps militaris* induces dendritic cell maturation through toll-like receptor 4 signalings. *Food and Chemical Toxicology*, 48(7), 1926–1933. doi:10.1016/j.fct.2010.04.036
- Kim, J. H., Lee, J. S., Song, K.-S., Kwon, C.-S., Kim, Y. K., & Kim, J.-S. (2004). Polyozellin Isolated from *Polyozellus multiplex* Induces Phase 2 Enzymes in Mouse Hepatoma Cells and Differentiation in Human Myeloid Leukaemic Cell Lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3), 451–455. doi:10.1021/jf034748n
- Kim, S. P., Kang, M. Y., Kim, J. H., Nam, S. H., & Friedman, M. (2011). Composition and Mechanism of Antitumor Effects of *Hericium erinaceus* Mushroom Extracts in Tumor-Bearing Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(18), 9861–9869. doi:10.1021/jf201944n
- Kim, S.-H., Song, Y.-S., Kim, S.-K., Kim, B.-C., Lim, C.-J., & Park, E.-H. (2004). Anti-inflammatory and related pharmacological activities of the n-BuOH subfraction of mushroom *Phellinus linteus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 93(1), 141–146. doi:10.1016/j.jep.2004.03.048
- Krzyczkowski, W., Malinowska, E., Suchocki, P., Kleps, J., Olejnik, M., & Herold, F. (2009). Isolation and quantitative determination of ergosterol peroxide in various edible mushroom species. *Food Chemistry*, 113(1), 351–355. doi:10.1016/j.foodchem.2008.06.075
- Kumari, M., Survase, S. A., & Singhal, R. S. (2008). Production of schizophyllan using *Schizophyllum commune* NRCM. *Bioresource Technology*, 99(5), 1036–1043. doi:10.1016/j.biortech.2007.02.029
- Lai, L. K., Abidin, N. Z., Abdullah, N., & Sabaratnam, V. (2010). Anti-Human Papillomavirus (HPV) 16 E6 Activity of Ling Zhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllophoromycetideae) Extracts. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 12(3), 279–286. doi:10.1615/IntJMedMushr.v12.i3.70

- Lam, Y. W., Ng, T. B., & Wang, H. X. (2001). Antiproliferative and Antimitogenic Activities in a Peptide from Puffball Mushroom *Calvatia caelata*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289(3), 744–749. doi:10.1006/bbrc.2001.6036
- Lamaison, J.-L., & Polese, J.-M. (2005). *Great encyclopaedia of mushrooms*. Koenemann, Koenigswinter.
- Lavi, I., Friesem, D., Geresh, S., Hadar, Y., & Schwartz, B. (2006). An aqueous polysaccharide extract from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects on HT-29 colon cancer cells. *Cancer Letters*, 244(1), 61–70. doi:10.1016/j.canlet.2005.12.007
- Lee, I.-S., & Nishikawa, A. (2003). *Polyozellus multiplex*, a Korean wild mushroom, as a potent chemopreventive agent against stomach cancer. *Life Sciences*, 73(25), 3225–3234. doi:10.1016/j.lfs.2003.06.006
- Lee, J. S., & Hong, E. K. (2010). *Hericium erinaceus* enhances doxorubicin-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Letters*, 297(2), 144–154. doi:10.1016/j.canlet.2010.05.006
- Lee, Y. S., Kim, Y. H., Shin, E. K., Kim, D. H., Lim, S. S., Lee, J.-Y., & Kim, J.-K. (2010). Anti-angiogenic activity of methanol extract of *Phellinus linteus* and its fractions. *Journal of Ethnopharmacology*, 131(1), 56–62. doi:10.1016/j.jep.2010.05.064
- Lemieszek, M. K., Cardoso, C., Nunes, F. H. F. M., Barros, A. I. R. N. A. de, Marques, G., Pożarowski, P., & Rzeski, W. (2013). *Boletus edulis* biologically active biopolymers induce cell cycle arrest in human colon adenocarcinoma cells. *Food & Function*, 4(4), 575–585. doi:10.1039/C2FO30324H
- Lemieszek, M., Langner, E., Kaczor, J., Kandefor-Szerszen, M., Sanecka, B., Mazurkiewicz, W., & Rzeski, W. (2009). Anticancer Effect of Fraction Isolated from Medicinal Birch Polypore Mushroom, *Piptoporus betulinus* (Bull.: Fr.) P. Karst. (Aphyllphoromycetidae): In Vitro Studies. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 11(4), 351–364. doi:10.1615/IntJMedMushr.v11.i4.20
- Li Dan, Zhao WenHong, Kong BaoHua, Ye Min, & Chen HaiRu. (2009). Inhibition effects of the extract and polysaccharide in macrofungus on TMV. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 24(2), 175–180.
- Li, G., Kim, D.-H., Kim, T.-D., Park, B.-J., Park, H.-D., Park, J.-I., ... Yoon, W.-H. (2004). Protein-bound polysaccharide from *Phellinus linteus* induces G2/M phase arrest and apoptosis in SW480 human colon cancer cells. *Cancer Letters*, 216(2), 175–181. doi:10.1016/j.canlet.2004.07.014
- Li, J., Li, P., & Liu, F. (2008). Production of theanine by *Xerocomus badius* (mushroom) using submerged fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, 41(5), 883–889. doi:10.1016/j.lwt.2007.05.020
- Li, Y. R., Liu, Q. H., Wang, H. X., & Ng, T. B. (2008). A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible

- mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1780(1), 51–57. doi:10.1016/j.bbagen.2007.09.004
- Li, Y.-G., Ji, D.-F., Zhong, S., Zhu, J.-X., Chen, S., & Hu, G.-Y. (2011). Anti-tumor effects of proteoglycan from *Phellinus linteus* by immunomodulating and inhibiting Reg IV/EGFR/Akt signaling pathway in colorectal carcinoma. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48(3), 511–517. doi:10.1016/j.ijbiomac.2011.01.014
- Liu, J., Jia, L., Kan, J., & Jin, C. (2013). In vitro and in vivo antioxidant activity of ethanolic extract of white button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Food and Chemical Toxicology*, 51, 310–316. doi:10.1016/j.fct.2012.10.014
- Lorenzen, K., & Anke, T. (1998). Basidiomycetes as a source for new bioactive natural products. *Curr. Org. Chem.*, (2), 329–364.
- Lukas, E., Ringler, R., Byerrum, R., Stevens, J., Clarke, D., & Stock, C. (1957). Tumor inhibitors in *Boletus edulis* and other holobasidiomycetes. *Antibiotic Chemotherapy*, 7, 1–14.
- Magarelli, M., Passamonti, P., & Renieri, C. (2010). Purification, characterization and analysis of sepia melanin from commercial sepia ink (*Sepia officinalis*). *Rev CES Med Vet Zootec*, 5(2), 18–28.
- Masuda, Y., Inoue, M., Miyata, A., Mizuno, S., & Nanba, H. (2009). Maitake beta-glucan enhances therapeutic effect and reduces myelosuppression and nephrotoxicity of cisplatin in mice. *International Immunopharmacology*, 9(5), 620–626. doi:10.1016/j.intimp.2009.02.005
- Mattila, P., Lampi, A.-M., Ronkainen, R., Toivo, J., & Piironen, V. (2002). Sterol and vitamin D2 contents in some wild and cultivated mushrooms. *Food Chemistry*, 76(3), 293–298. doi:10.1016/S0308-8146(01)00275-8
- Mizoguchi, Y., Katoh, H., Kobayashi, K., Yamamoto, S., & Morisawa, S. (1987). Effects of extract of cultured *Lentinus edodes* mycelia (LEM) on polyclonal antibody response induced by pokeweed mitogen. *Gastroenterologia Japonica*, 22(5), 627–632. doi:10.1007/BF02776724
- Mizuno, T. (1996). Development of antitumor polysaccharides from mushroom fungi. *Foods Food Ingrid J Jpn.*, (167), 69–85.
- Mizuno, T. (1999). The Extraction and Development of Antitumor-Active Polysaccharides from Medicinal Mushrooms in Japan (Review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1(1). Retrieved from <http://www.dl.begellhouse.com/journals/708ae68d64b17c52,6f35eacf6176a1b5,14d0601215093423.html>
- Mizuno, T., Hagiwara, T., Nakamura, T., Tro, H., Shimura, K., Sumiya, T., & Asakura, A. (1990). Antitumor Activity and Some Properties of Water-soluble Polysaccharides from “Himematsutake,” the Fruiting Body of *Agaricum blazei* Murill. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(11), 2889–2896. doi:10.1271/bbb1961.54.2889

- Napolitano, A., Pezzella, A., d' Ischia, M., & Prota, G. (1996). New pyrrole acids by oxidative degradation of eumelanins with hydrogen peroxide. Further hints to the mechanism of pigment breakdown. *Tetrahedron*, 52(26), 8775–8780. doi:10.1016/0040-4020(96)00418-8
- Ng, T. B., Lam, Y. W., & Wang, H. (2003). Calcaelin, a new protein with translation-inhibiting, antiproliferative and antimitogenic activities from the mosaic puffball mushroom *Calvatia caelata*. *Planta Medica*, 69(3), 212–217. doi:10.1055/s-2003-38492
- Oliveira, L. J. N., Rocha, I. M., & Guillo, L. A. (2004). Enzymatic activity assay of tyrosinase. *Rev. Bras. Farm.*, 85(1), 5–6.
- Ooi, V. E. C., & Liu, F. (1999). A Review of Pharmacological Activities of Mushroom Polysaccharides. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1(3). Retrieved from <http://www.dl.begellhouse.com/journals/708ae68d64b17c52,2c98ac0f52c728ab,769d99f35c042b93.html>
- Patel, S., & Goyal, A. (2012). Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review. *3 Biotech*, 2(1), 1–15. doi:10.1007/s13205-011-0036-2
- Paulino, W. R. (1998). *Biologia Actual* (10th ed., Vols. 1-3, Vol. 2). São Paulo, Ática.
- Pereira, E. A. P. C. (2011). *Contribuição para a inventariação química e nutricional de cogumelos do nordeste de Portugal* (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar). Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária, Bragança. Retrieved from <http://bibliotecadigital.ipb.pt/handle/10198/7644>
- Pillai, T. G., Nair, C. K. K., & Janardhanan, K. K. (2010). Enhancement of repair of radiation induced DNA strand breaks in human cells by Ganoderma mushroom polysaccharides. *Food Chemistry*, 119(3), 1040–1043. doi:10.1016/j.foodchem.2009.08.013
- Pirano, F. F. (2006). Emerging Antiviral Drugs from Medicinal Mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 8(2), 101–114. doi:10.1615/IntJMedMushr.v8.i2.20
- Pohleven, J., Obermajer, N., Sabotic, J., Anzlovar, S., Sepčić, K., Kos, J., ... Brzin, J. (2009). Purification, characterization and cloning of a ricin B-like lectin from mushroom *Clitocybe nebularis* with antiproliferative activity against human leukemic T cells. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1790(3), 173–181. doi:10.1016/j.bbagen.2008.11.006
- Radic, N., Jevnikar, Z., Obermajer, N., Kristl, J., Kos, J., Pohleven, F., & Strukelj, B. (2010). Influence of Culinary-Medicinal Maitake Mushroom, *Grifola frondosa* (Dicks.: Fr.) S.F. Gray (Aphyllophoromycetidae) Polysaccharides on Gene Expression in Jurkat T Lymphocytes. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 12(3), 245–255. doi:10.1615/IntJMedMushr.v12.i3.30
- Reshetnikov, S. V., & Tan, K.-K. (2001). Higher Basidiomycota as a Source of Antitumor and Immunostimulating Polysaccharides (Review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 3(4), 34. doi:10.1615/IntJMedMushr.v3.i4.80

- Ribeiro, B., Lopes, R., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Gonçalves, R. F., Baptista, P., ... Valentão, P. (2008). Comparative study of phytochemicals and antioxidant potential of wild edible mushroom caps and stipes. *Food Chemistry*, *110*(1), 47–56. doi:10.1016/j.foodchem.2008.01.054
- Saritha, B., & Pandey, M. (2010). Evaluation of Alternate Substrate Pasteurization Techniques for Culinary-Medicinal White Oyster Mushroom, *Pleurotus ostreatus* var. *florida* (Agaricomycetidae) Cultivation. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, *12*(3), 309–316. doi:10.1615/IntJMedMushr.v12.i3.100
- Silva, A. C., & Jorge, N. (2011). Cogumelos: compostos bioativos e propriedades antioxidantes. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde*, *13*(ESP), 375–384.
- Silva, D. D. D., Rapior, S., Fons, F., Bahkali, A. H., & Hyde, K. D. (2012). Medicinal mushrooms in supportive cancer therapies: an approach to anti-cancer effects and putative mechanisms of action. *Fungal Diversity*, *55*(1), 1–35. doi:10.1007/s13225-012-0151-3
- Singh, R. S., Bhari, R., & Kaur, H. P. (2010). Mushroom lectins: Current status and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, *30*(2), 99–126. doi:10.3109/07388550903365048
- Song, T.-Y., Lin, H.-C., Yang, N.-C., & Hu, M.-L. (2008). Antiproliferative and antimetastatic effects of the ethanolic extract of *Phellinus igniarius* (Linneaus: Fries) Quelet. *Journal of Ethnopharmacology*, *115*(1), 50–56. doi:10.1016/j.jep.2007.09.001
- Stamets, P. (2005). *Mycelium Running: How Mushrooms Can Help Save the World*. Ten Speed Press.
- Standish, L. J., Wenner, C. A., Sweet, E. S., Bridge, C., Nelson, A., Martzen, M., ... Torkelson, C. (2008). Trametes versicolor mushroom immune therapy in breast cancer. *Journal of the Society for Integrative Oncology*, *6*(3), 122–128.
- Sullivan, R., Smith, J. E., & Rowan, N. J. (2002). *Medicinal Mushrooms: Their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments*. CancerResearchUK. Retrieved from: https://www.academia.edu/305933/Medicinal_Mushrooms_Their_therapeutic_properties_and_current_medical_usage_with_special_emphasis_on_cancer_treatments
- Takehara, M., Kuida, K., & Mori, K. (1979). Antiviral activity of virus-like particles from *Lentinus edodes* (Shiitake). *Archives of Virology*, *59*(3), 269–274. doi:10.1007/BF01317423
- TePLYakova, T. V., Psurtseva, N. V., Kosogova, T. A., Mazurkova, N. A., Khanin, V. A., & Vlasenko, V. A. (2012). Antiviral Activity of Polyporoid Mushrooms (Higher Basidiomycetes) from Altai Mountains (Russia). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, *14*(1), 37–45. doi:10.1615/IntJMedMushr.v14.i1.40
- Tomomatsu, H. (1994). Health effects of oligosaccharide. *Food Technol.*, (9), 61–65.

- Tong, H., Xia, F., Feng, K., Sun, G., Gao, X., Sun, L., ... Sun, X. (2009). Structural characterization and in vitro antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. *Bioresource Technology*, 100(4), 1682–1686. doi:10.1016/j.biortech.2008.09.004
- Tsai, S.-Y., Tsai, H.-L., & Mau, J.-L. (2007). Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea*, and *Boletus edulis*. *LWT - Food Science and Technology*, 40(8), 1392–1402. doi:10.1016/j.lwt.2006.10.001
- Tsunoda, A., & Ishida, N. (1970). A mushroom extract as an interferon inducer. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 173, 719–726.
- Ushiyama, R., Nakai, Y., & Ikegami, M. (1977). Evidence for double-stranded RNA from polyhedral virus-like particles in *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Virology*, 77(2), 880–883. doi:10.1016/0042-6822(77)90512-8
- Vaz, J. A., Heleno, S. A., Martins, A., Almeida, G. M., Vasconcelos, M. H., & Ferreira, I. C. F. R. (2010). Wild mushrooms *Clitocybe alexandri* and *Lepista inversa*: in vitro antioxidant activity and growth inhibition of human tumour cell lines. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 48(10), 2881–2884. doi:10.1016/j.fct.2010.07.021
- Wang, Z., Luo, D., & Liang, Z. (2004). Structure of polysaccharides from the fruiting body of *Herichium erinaceus* Pers. *Carbohydrate Polymers*, 57(3), 241–247. doi:10.1016/j.carbpol.2004.04.018
- Wasser, S. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(3), 258–274. doi:10.1007/s00253-002-1076-7
- Wasser, S. P. (2010). Medicinal Mushroom Science: History, Current Status, Future Trends, and Unsolved Problems. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 12(1), 1–16. doi:10.1615/IntJMedMushr.v12.i1.10
- Wasser, S. P. (2011). Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(5), 1323–1332. doi:10.1007/s00253-010-3067-4
- Wasser, S. P., & Weis, A. L. (1999). Medicinal Properties of Substances Occurring in Higher Basidiomycetes Mushrooms: Current Perspectives (Review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1(1). Retrieved from: <http://www.dl.begellhouse.com/journals/708ae68d64b17c52,6f35eacf6176a1b5,3265072d688f53ee.html>
- Wilfinger, W. W., Mackey, K., & Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*, 22(3), 474–476, 478–481.
- Wong, S.-M., Wong, K.-K., Chiu, L. C.-M., & Cheung, P. C.-K. (2007). Non-starch polysaccharides from different developmental stages of *Pleurotus tuber-regium* inhibited the growth of human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells by cell-

- cycle arrest and/or apoptotic induction. *Carbohydrate Polymers*, 68(2), 206–217. doi:10.1016/j.carbpol.2006.12.018
- Yang, S. (1998). *The Divine Farmer's Materia Medica: A Translation of the Shen Nong Ben Cao Jing*. Blue Poppy Enterprises, Inc.
- Ye, L., Zhang, J., Zhou, S., Wang, S., Wu, D., & Pan, Y. (2009). Preparation of a novel sulfated glycopeptide complex and inhibiting L1210 cell lines property in vitro. *Carbohydrate Polymers*, 77(2), 276–279. doi:10.1016/j.carbpol.2008.12.031
- Zaidman, B.-Z., Yassin, M., Mahajna, J., & Wasser, S. P. (2005). Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(4), 453–468. doi:10.1007/s00253-004-1787-z
- Zeise, L., Murr, B. L., & Chedekel, M. R. (1992). Melanin standard method: particle description. *Pigment Cell Research / Sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society*, 5(3), 132–142.
- Zhang, G.-Q., Wang, Y.-F., Zhang, X.-Q., Ng, T. B., & Wang, H.-X. (2010). Purification and characterization of a novel laccase from the edible mushroom *Clitocybe maxima*. *Process Biochemistry*, 45(5), 627–633. doi:10.1016/j.procbio.2009.12.010
- Zhang, M., Cui, S. W., Cheung, P. C. K., & Wang, Q. (2007). Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science & Technology*, 18(1), 4–19. doi:10.1016/j.tifs.2006.07.013
- Zheng, S., Li, C., Ng, T. B., & Wang, H. X. (2007). A lectin with mitogenic activity from the edible wild mushroom *Boletus edulis*. *Process Biochemistry*, 42(12), 1620–1624. doi:10.1016/j.procbio.2007.09.004
- Zielonacka-lis, E. (1989). The Acidic Hydrolysis of Nucleosides and Nucleotides. *Nucleosides and Nucleotides*, 8(3), 383–405. doi:10.1080/07328318908054183