

forum
CIMO

ciência e
desenvolvimento
2012

Livro de atas

..... novembro 2012

Fórum CIMO - Ciência e Desenvolvimento 2012
Centro de Investigação de Montanha

Titulo: Livro de Atas do Fórum CIMO - Ciência e Desenvolvimento 2012

Editores: Centro de Investigação de Montanha

Editor: Instituto Politécnico de Bragança

Apartado 1038, 5301-854 Bragança

<http://www.ipb.pt/>

ISBN: 978-972-745-146-3

Design: Atilano Suarez, Serviços de Imagem do Instituto Politécnico de Bragança

Fórum CIMO - Ciência e Desenvolvimento 2012

Centro de Investigação de Montanha

Livro de atas

Auditório Dionísio Gonçalves
Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança
20 e 21 de novembro de 2012
Bragança

Índice	Página
Prefácio	
Gestão de ecossistemas e qualidade ambiental	
Projecto BIOURB - Análise do clima urbano e o seu contributo para o planeamento urbano sustentável - estudo da cidade de Bragança <i>Manuel Feliciano, Artur Gonçalves, Filipe Maia, Alfredo Rocha & António Castro Ribeiro</i>	1
Degradação física do solo em áreas queimadas de matos no nordeste transmontano <i>Tomás de Figueiredo, Felícia Fonseca & Anabela Queirós</i>	8
O uso dos herbívoros na prevenção dos incêndios: uma nova oportunidade para a sustentabilidade da floresta <i>Marina Castro & Esther Fernández-Núñez</i>	16
Estimação da concentração e do transporte de sedimentos em suspensão em cursos de água de montanha: um estudo preliminar na Ilha da Madeira <i>Luiz Guerreiro Lopes & Raquel Ladeira Lobo</i>	24
Sustentabilidade de sistemas florestais e agroflorestais	
Fatores moleculares da doença da “tinta” do castanheiro <i>Altino Choupina</i>	33
Crescimento e sobrevivência de espécies florestais instaladas na região Mediterrânica: efeito da intensidade de preparação do terreno <i>Felícia Fonseca, Tomás de Figueiredo & Afonso Martins</i>	40
Idosos agricultores em Trás-os-Montes: análise da resposta à florestação das terras agrícolas no Planalto Mirandês e na Terra Fria <i>Sílvia Nobre</i>	49
Tecnologia e qualidade dos produtos de montanha	
Irradiação gama e feixe de eletrões: uma alternativa viável no tratamento pós- colheita promotora da qualidade da castanha <i>Amílcar L. Antonio, João C.M. Barreira, Márcio Carochó, Albino Bento, Isabel C.F.R. Ferreira</i>	57
Cogumelos silvestres portugueses: valorização como alimentos funcionais e fonte de nutracêuticos <i>Isabel C.F.R. Ferreira, Josiana A. Vaz, Lillian Barros, Gabriela M. Almeida, Anabela Martins & M. Helena Vasconcelos FIGURA</i>	64
Valorização dos sistemas agro-pecuários de montanha - pastagens e produção animal	
Produção e valor nutritivo de pastagens de montanha <i>Jaime M. Pires, Esther Fernández Nuñez, Adelaide Fernandes, João Pires, Adelino Bernardo, Carlos F. Aguiar, Lurdes Galvão & Nuno Moreira</i>	70
Fertilização de pastagens de sequeiro em modo de produção biológico <i>Esther Fernández Nuñez, Manuel A. Rodrigues, Margarida Arrobas, Carlos F. Aguiar, R. Cuiña-Cotarelo, M. Rosa Mosquera-Losada, A. Rigueiro-Rodríguez, Nuno Moreira & Jaime M. Pires</i>	79
Melhoria da eficiência reprodutiva de ovinos das raças Churra Galega Bragançana e Churra da Terra Quente e de caprinos da Raça Serrana e de caprinos da raça Serrana <i>Teresa M. Correia & Ramiro Valentim</i>	87

Conservação e monitorização da biodiversidade

CONBI: Biodiversidade e Conservação de Bivalves – Informação Ecogeográfica, Genética e Fisiológica <i>Amílcar Teixeira, Simone Varandas, Ronaldo Sousa, Elsa Froufe, Manuel Lopes-Lima</i>	92
Monitorização das comunidades zooplanctónicas de albufeiras: aplicações e perspetivas <i>Ana Maria Geraldés & Pedro Silva-Santos</i>	100
Política de recursos naturais e finanças locais <i>Nina Aguiar</i>	107

Valorização dos sistemas agro-pecuários de montanha: outros sistemas

Análise de Insolvência das cooperativas de crédito agrícola em Portugal <i>Paula Cabo & João Rebelo</i>	114
Compostagem de espécies invasoras <i>Luis Miguel Brito</i>	123
Fertilizantes “especiais” na agricultura transmontana <i>Manuel Ângelo Rodrigues, Isabel Q. Ferreira & Margarida Arrobas</i>	132

Cogumelos silvestres Portugueses: valorização como alimentos funcionais e fonte de nutraceuticos

Isabel C.F.R. Ferreira^{1,2}, Josiana A. Vaz^{1,3}, Lillian Barros¹, Gabriela M. Almeida³, Anabela Martins² & M. Helena Vasconcelos^{3,4}

1–Centro de Investigação de Montanha, Instituto Politécnico de Bragança.

2–Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança.

3–Grupo de Resistência à Terapêutica Anti-neoplásica, IPATIMUP – Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto.

4–Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto.

iferreira@ipb.pt

Resumo – Os cogumelos silvestres possuem grande diversidade de biomoléculas com valor nutricional e/ou propriedades medicinais. Neste trabalho, apresentam-se resultados do estudo de espécies do Nordeste de Portugal. Os extratos fenólicos de *Clitocybe alexandri*, *Lepista inversa* e *Suillus collinitus* foram caracterizados e mostraram potenciais efeitos anti-tumorais em linhas celulares tumorais humanas, que se traduzem especificamente na indução de paragem do ciclo de divisão celular e na indução de morte celular programada (apoptose) em linhas celulares modelo, derivadas de diferentes tipos de tumores humanos. Verificou-se que extratos de *C. alexandri* induzem paragem no ciclo celular e apoptose numa linha celular de cancro do pulmão, constituindo-se assim como fonte potencial de novos agentes citotóxicos. Descobriu-se ainda que o extrato metanólico de *S. collinitus* aumenta a expressão da proteína supressora de tumores p53, causa paragem no ciclo de divisão celular e aumenta a apoptose numa linha celular modelo de cancro da mama. Tendo em conta o potencial anti-tumoral evidenciado em condições *in vitro* pelas espécies mencionadas, os extratos/compostos fenólicos prefiguram-se como potenciais fontes de agentes citotóxicos e poderão encontrar, caso estudos futuros o comprovem, potencial utilização no tratamento do cancro, a segunda causa de morte nos países desenvolvidos. Em específico, podem potencialmente servir para acrescentar e diversificar os “pipelines” de desenvolvimento de fármacos da indústria farmacêutica ou de alimentos funcionais.

Palavras-chave: Cogumelos silvestres; Ácidos fenólicos; Atividade antioxidante; Atividade anti-tumoral; Ciclo celular; Apoptose; Cancro; Alimentos funcionais

1 Introdução

Os cogumelos silvestres possuem grande diversidade de biomoléculas com valor nutricional [1] e/ou propriedades medicinais [2]. Têm sido reconhecidos como alimentos funcionais e como fonte de compostos para o desenvolvimento de fármacos e nutraceuticos, incluindo compostos com propriedades antioxidantes [3], antimicrobianas [4] e anti-tumorais [5]. Já foram realizados vários estudos pré-clínicos em linhas celulares tumorais humanas e alguns compostos isolados de cogumelos estão em fase de ensaios clínicos. Exemplos disso são os β -glucanos “Lentinan” (do cogumelo *Lentinus edodes*) e “Schizophyllan” (do meio de cultura de *Schizophyllum commune*) ou os glucopéptidos PSP e “Krestin” (PSK) (do micélio de *Coriolus versicolor*) [6,7].

Para além dos cogumelos mencionados, existem muitos outros conhecidos como sendo medicinais e existe um potencial enorme nas espécies ainda não exploradas do Nordeste Português. De facto, o Nordeste de Portugal é uma das regiões Europeias com maior diversidade de cogumelos silvestres e, nesse sentido, o nosso grupo de investigação tem-se dedicado à caracterização química e avaliação das suas propriedades bioativas.

Neste trabalho, serão apresentados resultados da avaliação das propriedades antioxidantes e do potencial inibidor de crescimento de linhas celulares tumorais humanas, de cogumelos silvestres comestíveis provenientes do Nordeste de Portugal.

2 Metodologia

Após identificação taxonômica dos cogumelos, prepararam-se extratos metanólicos, etanólicos e aquosos a partir das amostras liofilizadas.

A caracterização em compostos fenólicos e mono e oligossacáridos foi efetuada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a um detetor de díodos (DAD) ou a um detetor de índice de refração (RI), respetivamente.

Os ensaios de atividade antioxidante, realizados nos extratos referidos, incluíram a avaliação da atividade captadora de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH), poder redutor e inibição da descoloração do β -caroteno.

A inibição do crescimento celular foi avaliada com o ensaio Sulforrodamina B em quatro linhas celulares tumorais humanas (NCI-H460 - pulmão, MCF-7- mama, HCT-15 - cólon e AGS - gástrico). Os efeitos sobre o perfil do ciclo celular e apoptose foram avaliados por citometria de fluxo e o efeito sobre os níveis de expressão de proteínas celulares relacionadas com o ciclo celular e a apoptose celular, foi investigado por Western blotting.

3 Resultados

Três espécies de cogumelos silvestres comestíveis revelaram atividade inibidora do crescimento de linhas celulares tumorais humanas. O extrato etanólico de *Clitocybe alexandri*, o extrato metanólico de *Lepista inversa* e o extrato metanólico de *Suillus collinitus* revelaram ser os mais potentes [8-10].

O extrato etanólico de *C. alexandri* induziu uma paragem do ciclo celular em fase S (Fig. 1) e promoveu um aumento da percentagem de células apoptóticas, na linha celular tumoral humana (de cancro do pulmão) testada [9].

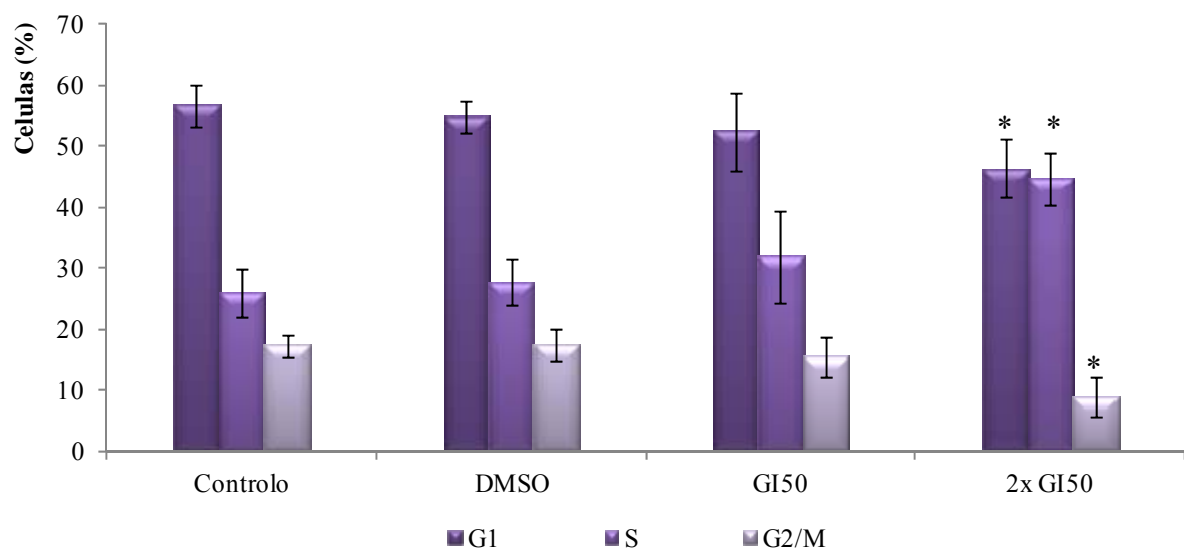


Figura 1. Análise do perfil do ciclo celular de células NCI-H460 tratadas durante 48h com duas concentrações do extrato etanólico de *Clitocybe alexandri*: GI₅₀ (24,8 µg/mL) ou 2xGI₅₀ (49,6 µg/mL). Foram utilizadas como controlo células não tratadas e tratadas com o solvente (DMSO). *Valores significativamente ($P < 0,05$) diferentes quando comparados ao branco ou DMSO. Adaptada da referência [9].

As espécies de cogumelos analisadas também revelaram um interessante potencial antioxidante, principalmente o extrato aquoso de *L. inversa* que apresentou a maior atividade captadora de radicais DPPH, poder redutor e inibição da descoloração do β -caroteno (Tabela 1) [8].

Tabela 1. Atividade antioxidante* dos extratos dos cogumelos.

Espécies	Extratos	Atividade captadora de DPPH	Poder redutor	Inibição da descoloração do β -caroteno
<i>Clitocybe alexandri</i>	Metanólico	28,7 \pm 3,2	7,0 \pm 0,4	4,5 \pm 0,2
	Etanólico	10,7 \pm 0,8	2,3 \pm 0,0	3,7 \pm 0,1
	Água em ebulição	2,5 \pm 0,0	0,9 \pm 0,0	1,2 \pm 0,0
<i>Lepista inversa</i>	Metanólico	10,6 \pm 1,1	2,9 \pm 0,1	1,1 \pm 0,1
	Etanólico	9,3 \pm 0,5	1,4 \pm 0,1	1,5 \pm 1,1
	Água em ebulição	1,8 \pm 0,1	0,7 \pm 0,0	0,9 \pm 0,1
<i>Suillus collinitus</i>	Metanólico	14,1 \pm 1,2	3,0 \pm 0,0	1,2 \pm 0,1
	Etanólico	7,3 \pm 0,7	1,3 \pm 0,0	1,2 \pm 0,1
	Água em ebulição	7,9 \pm 0,5	2,1 \pm 0,0	1,2 \pm 0,0

*Os resultados estão expressos em EC₅₀ (concentração de extrato em mg/mL correspondente a 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no ensaio do poder redutor).

O extrato metanólico de *S. collinitus* induziu um ligeiro aumento no número de células em G1, com uma concomitante diminuição na percentagem de células na fase S do ciclo celular e um aumento na percentagem de células apoptóticas (6,0 \pm 0,2% para 15,3 \pm 2,0%) na linha celular tumoral humana (de cancro de mama) testada. Verificou-se ainda um forte aumento dos níveis de p53, p21 e PARP clivada, associado a uma diminuição da Bcl-2 e XIAP [10].

O uso combinado do extrato metanólico de *S. collinitus* e de etoposídeo (fármaco anti-neoplásico) causou uma maior diminuição na percentagem de crescimento celular, quando comparado com qualquer um deles usados individualmente (Fig. 2), indicando o potencial benefício desta combinação [10].

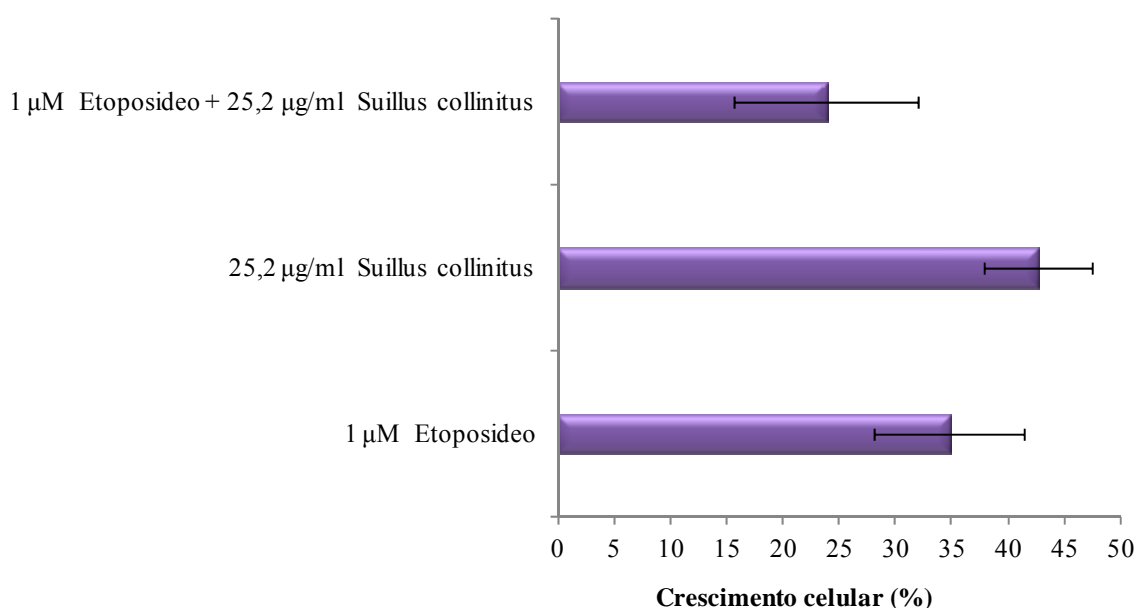


Figura 2. Tratamento de células MCF-7 com etoposídeo, *Suillus collinitus* (extrato metanólico) e combinação dos dois. Adaptada da referência [10].

Os extratos testados foram caracterizados quimicamente, tendo sido os ácidos protocatéuico, p-hidroxibenzóico, p-cumárico e cinâmico os principais compostos identificados nos extratos fenólicos

(metanólico e etanólico) (Fig. 3), enquanto o manitol, a trealose e a arabinose foram os principais açúcares encontrados no extrato polissacarídico (aquoso), após hidrólise (Fig. 4) [9,10].

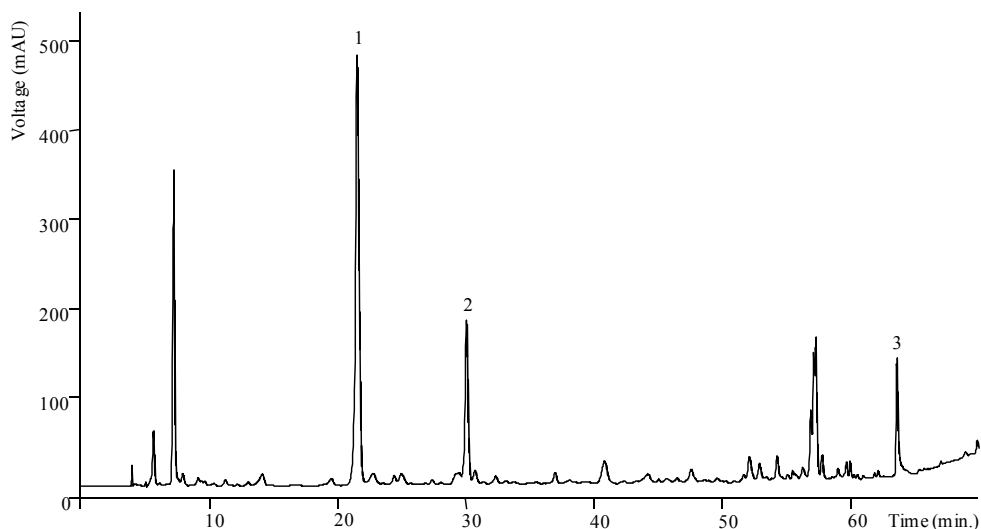


Figura 3. Perfil em compostos fenólicos de *Clitocybe alexandri* obtido por HPLC-DAD a 280 nm. Apenas foram assinalados os picos correspondentes a compostos fenólicos ou compostos relacionados. 1- Ácido protocatéuico; 2- Ácido *p*-hidroxibenzoico; 3- Ácido cinâmico.

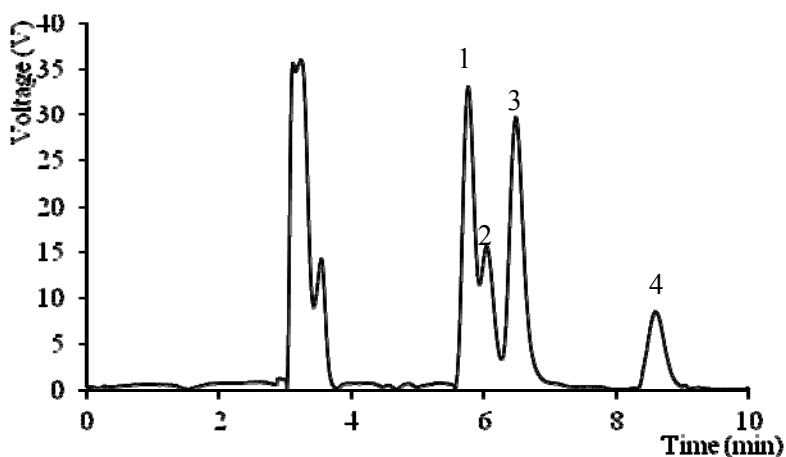


Figura 4. Perfil em açúcares de *Suillus collinitus* obtido por HPLC-RI. 1- Arabinose; 2- Frutose (padrão interno); 3- Manitol; 4- Trealose.

Os compostos individuais identificados nos extratos foram submetidos a uma avaliação da atividade inibidora de crescimento celular, mas apenas os ácidos fenólicos e um composto relacionado, o ácido cinâmico, apresentaram atividade. Este composto foi o mais potente em relação ao efeito de inibição de crescimento celular, na linha celular tumoral humana NCI-H460. O efeito do tratamento individual e combinado dos compostos identificados também foi avaliado. Os ácidos cinâmico e protocatéuico causaram uma redução estatisticamente significativa no número de células viáveis. Por sua vez, o ácido *p*-hidroxibenzoico não demonstrou efeito sobre as células testadas até à concentração máxima testada. No entanto, verificou-se que a utilização simultânea dos três compostos promoveu uma diminuição substancial no número de células viáveis, sugerindo um possível efeito concomitante dos referidos compostos (Fig. 5) [9].

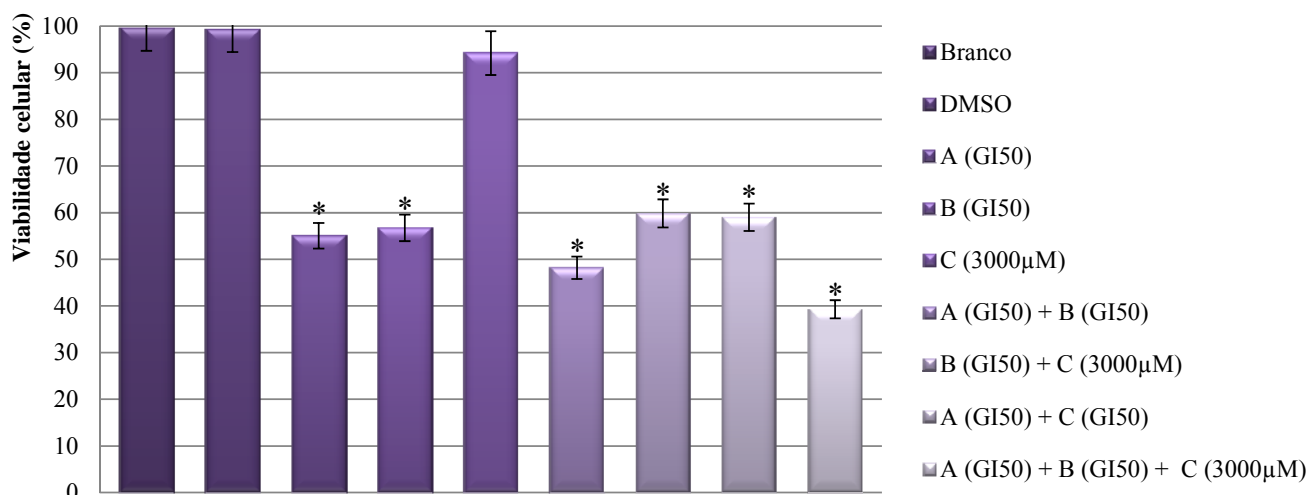


Figura 5. Número de células viáveis após tratamento durante 48h das células NCI-H460 com compostos fenólicos identificados nos extratos: A- ácido cinâmico (ao GI₅₀: 845,9 µM), B- ácido protocatéquico (ao GI₅₀: 1616,9 µM), C- ácido *p*-hidroxibenzoico (a 3000 µM). Foram utilizadas como controlo células não tratadas e tratadas com o solvente (DMSO). *Valores significativamente ($P < 0,05$) diferentes quando comparados ao branco ou DMSO. Adaptada da referência [9].

O presente trabalho contribui para uma melhor compreensão do potencial bioativo de cogumelos silvestres comestíveis do Nordeste de Portugal, tendo permitido identificar algumas espécies com propriedades antioxidantes ou inibidoras do crescimento de células tumorais.

Tendo em conta o potencial anti-tumoral evidenciado em condições *in vitro* pelas espécies mencionadas, os extratos/compostos fenólicos prefiguram-se como potenciais fontes de agentes citotóxicos e poderão encontrar, caso estudos futuros o comprovem, potencial utilização no tratamento do cancro, a segunda causa de morte nos países desenvolvidos. Em específico, podem potencialmente vir a servir para acrescentar e diversificar os “pipelines” de desenvolvimento de fármacos da indústria farmacêutica ou de alimentos funcionais.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) e ao COMPETE/QREN/UE pelo apoio financeiro a este trabalho (projeto de investigação PTDC/AGR-ALI/110062/2009) e ao CIMO (projeto estratégico PEst-OE/AGR/UI0690/2011). Agradecem também à Universidade do Porto e ao Totta pelo apoio financeiro e à Catarina Tavares pelo apoio técnico em algumas análises. J.A. Vaz e L. Barros agradecem à FCT, POPH-QREN e Fundo Social Europeu (FSE) pelas suas bolsas (BD/43653/2008 e BPD/4609/2008). G.M. Almeida é também apoiada pela FCT e FSE.

Referências

- [1] Kalač P. 2009. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry* 113:9–16.
- [2] Poucheret P., Fons, F. & Rapior, S. 2006. Biological and pharmacological activity of higher fungi: 20-Year retrospective analysis. *Mycologie* 27:311-333.
- [3] Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., & Abreu R.M.V. 2009. Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry* 16:1543-1560.
- [4] Alves, M.J., Ferreira, I.C.F.R., Dias, J., Teixeira, V., Martins, A. & Pintado, M. 2012. A review on antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds. *Planta Medica in press*. DOI: 10.1055/s-0032-1315370.

- [5] Ferreira, I.C.F.R. Vaz, J.A., Vasconcelos, M.H., & Martins, A. 2010. Compounds from wild mushrooms with antitumor potential. *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry* 10:424-436.
- [6] Zaidman, B.-Z., Yassin, M., Mahajana, J. & Wasser, S.P. 2005. Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67:453-468.
- [7] Luk, S.-U., Lee, T.K.-W., Liu, J., Lee, D.T.-W., Chiu, Y.-T., Ma, S., Ng, I.O.-L., Wong, Y.-C., Chan, F.L. & Ling, M.T. 2011. Chemopreventive effect of PSP through targeting of prostate cancer stem cell-like population. *PLoS ONE* 6:e19804.
- [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* 48:2881-2884.
- [9] Vaz, J.A., Almeida, G.M., Ferreira, I.C.F.R., Martins, A. & Vasconcelos, M.H. 2012. *Clitocybe alexandri* extract induces cell cycle arrest and apoptosis in a lung cancer cell line: identification of phenolic acids with cytotoxic potential. *Food Chemistry* 132:482-486.
- [10] Vaz, J.A., Ferreira, I.C.F.R., Tavares, C., Almeida, G.M., Martins, A., Vasconcelos, M.H. 2012. *Suillus collinitus* methanolic extract increases p53 expression and causes cell cycle arrest and apoptosis in a breast cancer cell line. *Food Chemistry* 135:596-602.

