

Crescimento e caracterização química de fungos micorrízicos e plantas de *Pinus pinaster* na presença e ausência do simbiote

Filipa Sofia Dinis Reis

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança
para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia*

Orientado por

Anabela Rodrigues Lourenço Martins

Isabel Cristina Fernandes Rodrigues Ferreira

**Bragança
2010**

Aos meus pais...

AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras, a Doutora Anabela Martins e a Doutora Isabel Ferreira, pelo apoio e dedicação que sempre demonstraram. Agradeço igualmente a confiança que depositaram em mim e a amizade. Obrigada por tudo o que fizeram pela minha evolução e conhecimento. Serão sempre uma referência para mim.

Ao Grupo de Investigación en Polifenoles (GIP-USAL) da Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, liderado pelo Professor Doutor Celestino Santos-Buelga, pela análise dos compostos fenólicos.

Ao Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada, da Escola Superior Agrária de Bragança, a todas pessoas que lá trabalham, por toda a simpatia e bons momentos proporcionados.

Aos docentes e funcionários do Laboratório de Biologia, da Escola Superior Agrária de Bragança, por possibilitarem a realização deste trabalho e pela disponibilidade.

À Lillian, por todo o apoio e disponibilidade que tanto ajudaram na realização deste trabalho. Obrigada por tudo.

A todos os meus amigos, obrigada por fazerem parte da minha vida. Graças ao vosso apoio e boa disposição foi possível dar este passo com maior ânimo.

Ao meu namorado Márcio, simplesmente por ser quem é. Não há palavras que consigam exprimir a gratidão que tenho por todo o apoio ao longo desta fase. Obrigada por me fazeres sentir capaz de alcançar todos os meus sonhos e nunca desistir perante as adversidades. Ao atingir esta etapa da minha vida contigo, mais uma vez chego à conclusão que o amor está nas nossas atitudes e nas sensações que estas provocam nas outras pessoas, que o amor não é cego, o amor não é fogo...o amor é amor.

À minha irmã, pelo amor e confiança. Obrigada por cuidares de mim, me apoiares, por teres a capacidade de, mesmo longe, estares bem pertinho de mim.

Ao meu cunhado, pelo apoio técnico.

Ao meu sobrinho, cuja inocência me faz sentir sempre bem, conseguindo esquecer, mesmo que por momentos, quaisquer problemas ou ansiedades. É sempre maravilhoso poder contar com a ternura de uma criança aquando do regresso a casa e poder desfrutar do maior abraço de saudade.

Aos meus pais, a quem dedico esta tese, pelo amor incondicional, pelos valores que me inculcaram e fizeram de mim a pessoa que sou hoje. Obrigada por sempre me apoiarem e acreditarem em mim. Adoro-vos.

Este trabalho insere-se no projecto de investigação PTDC/AGR-ALI/110062/2009, financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT, Portugal) e pelo Programa COMPETE/QREN/EU.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	ii
ÍNDICE DE TABELAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ABREVIATURAS	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiv
I. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Os fungos	1
1.1.1. <i>Paxillus involutus</i> e <i>Pisolithus arhizus</i>	7
1.2. <i>Pinus pinaster</i>	9
1.3. Micorrizas e micorrização	12
1.4. Stresse oxidativo e actividade antioxidante.....	15
1.5. Compostos antioxidantes.....	19
1.6. Objectivos	22
II. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
2.1. Material biológico e preparação das amostras	23
2.1.1. <i>Material biológico</i>	23
2.1.2. <i>Produção in vitro do micélio e germinação in vitro de Pinus pinaster</i>	23
2.1.3. <i>Indução da simbiose micorrízica</i>	26
2.2. Padrões e Reagentes	27
2.3. Determinação da actividade antioxidante.....	28
2.3.1. <i>Preparação dos extractos</i>	28
2.3.2. <i>Determinação de fenóis totais</i>	28
2.3.3. <i>Actividade captadora de radicais DPPH</i>	29

2.3.4. Poder redutor	29
2.3.5. Inibição da descoloração do β -caroteno.....	30
2.4. Determinação de compostos antioxidantes	30
2.4.1. Determinação de tocoferóis	30
2.4.2. Determinação de compostos fenólicos	31
2.5. Análise estatística.....	32
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
3.1. Crescimento do material biológico.....	33
3.2. Actividade antioxidante e compostos antioxidantes em fungos micorrízicos e plantas germinadas in vitro na presença e ausência do simbionte.....	36
3.2.1. Produção de tocoferóis e actividade antioxidante dos fungos micorrízicos in vivo (corpos de frutificação) e in vitro (micélios), na ausência de simbionte	36
3.2.2 Perfil fenólico e actividade antioxidante dos fungos micorrízicos e das plantas germinadas na presença e ausência do simbionte	41
3.2.3. Efeito do tempo de inoculação na actividade antioxidante dos fungos micorrízicos e plantas germinadas na presença e ausência do simbionte	47
IV. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	55
4.1. Conclusões	55
4.2. Perspectivas futuras.....	58
V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
VI. ANEXOS	69

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos fungos do Filo Basidiomycota (Kirk <i>et al.</i> , 2008).	6
Tabela 2. Classificação sistemática das espécies em estudo.	23
Tabela 3. Composição do meio de cultura Melin-Norkans modificado; pH 6,6.	24
Tabela 4. Composição em tocoferóis ($\mu\text{g/g dw}$) das amostras de carpóforos, micélios e meios de cultura das espécies <i>Paxillus involutus</i> e <i>Pisolithus arhizus</i> ; média \pm SD (n = 9). Em cada coluna, letras diferentes representam diferenças significativas entre os resultados ($p < 0,05$).	37
Tabela 5. Rendimentos de extracção (%), composição em fenóis (mg EAG/g extracto) e actividade antioxidante (valores de EC50, mg/mL); média \pm SD (n = 9). Em cada coluna, letras diferentes representam diferenças significativas entre os resultados ($p < 0,05$).	40
Tabela 6. Ácidos fenólicos e compostos relacionados ($\mu\text{g/g}$ de extracto) das amostras de <i>Paxillus involutus</i> , <i>Pisolithus arhizus</i> e <i>Pinus pinaster</i> após 45 dias de crescimento, em meio de cultura MMNm, na ausência e presença de simbiote (média \pm SD; n = 9). Em cada coluna, letras diferentes representam diferenças significativas entre os resultados ($p < 0,05$).	42
Tabela 7. Rendimentos de extracção (%), composição em fenóis (mg EAG/g extracto) e actividade antioxidante (valores de EC50, mg/mL) das amostras de <i>Paxillus involutus</i> , <i>Pisolithus arhizus</i> e <i>Pinus pinaster</i> após 45 dias de crescimento, em meio de cultura MMNm, na ausência e presença de simbiote (média \pm SD; n = 9). Em cada coluna, letras diferentes representam diferenças significativas entre os resultados ($p < 0,05$)...	44
Tabela 8. Rendimentos de extracção (%), concentrações de fenóis totais (mg EAG/g extracto) e actividade antioxidante (valores de EC50, mg/mL) das amostras de <i>Paxillus involutus</i> , <i>Pisolithus arhizus</i> e <i>Pinus pinaster</i> após 45 dias de crescimento, em meio de cultura MMNm, na ausência e presença de simbiote (média \pm SD; n = 9). Em cada coluna, letras diferentes representam diferenças significativas entre os resultados ($p < 0,05$).	48

Tabela 9. Rendimentos de extracção (%), concentrações de fenóis totais (mg EAG/g extracto) e actividade antioxidante (valores de EC50, mg/mL) das amostras em estudo, após 22 dias de crescimento (no caso das espécies ectomicorrízicas) e 48 horas de interacção fungo - planta, em meio de cultura MMNm, (média \pm SD; n = 9). Em cada coluna, letras diferentes representam diferenças significativas entre os resultados ($p < 0,05$)..... 52

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação da molécula de DPPH na sua forma de radical livre e não-radical respectivamente (Molyneux, 2004). 17
- Figura 2.** Estrutura da molécula de β -caroteno..... 18
- Figura 3.** Estrutura química dos tocoferóis ($R^1=R^2=Me$, α -tocoferol; $R^1= Me$, $R^2=H$, β -tocoferol; $R^1=H$, $R^2=Me$, γ -tocoferol e $R^1=R^2=H$, δ -tocoferol). 19
- Figura 4.** A – Corpos de frutificação de *Paxillus involutus* (Roody, 2003); B, C – Micélio de *Paxillus involutus*; D – Corpos de frutificação de *Pisolithus arhizus* (Metzler & Metzler, 1992); E, F – Micélio de *Pisolithus arhizus*. 25
- Figura 5.** Germinação *in vitro* de sementes de *Pinus pinaster*, desde os momentos iniciais de abertura da semente (A – E) até à formação da planta completa: folhas, caules (F – J) e raízes (K – N). 25
- Figura 6.** A – Ensaio (A), *Paxillus involutus* + *Pinus pinaster* no momento da inoculação; B – Ensaio (A), *Pisolithus arhizus* + *Pinus pinaster* no momento da inoculação; C – Ensaio (A), *Paxillus involutus* + *Pinus pinaster*; D – Ensaio (A), *Pisolithus arhizus* + *Pinus pinaster*; E – Ensaio (B), *Paxillus involutus* + *Pinus pinaster* (inoculação das plantas sobre os fungos, já em desenvolvimento, por um período de 20 dias em meio MMNm, promovendo-se a simbiose durante 48 horas); F - Ensaio (B), *Pisolithus arhizus* + *Pinus pinaster*; G – Ensaio (B), *Paxillus involutus* controlo; H – Ensaio (B), *Pisolithus arhizus* controlo; I, J – Ensaio (A), *Pinus pinaster* controlo, K, L – Ensaio (B), *Pinus pinaster* controlo. 26
- Figura 7.** Média do crescimento radial dos fungos *Paxillus involutus* e *Pisolithus arhizus* isolados em meio de cultura MMNm, ao longo do período de inoculação. 34
- Figura 8.** Média do crescimento radial dos fungos *Paxillus involutus* e *Pisolithus arhizus* que cresceram juntamente com *Pinus pinaster* em meio de cultura MMNm, ao longo do período de inoculação..... 35
- Figura 9.** Cromatograma individual de tocoferóis da espécie *Pisolithus arhizus* (micélio). Picos: 1) α -tocoferol ($R^1=R^2=CH_3$); 2) β -tocoferol ($R^1=CH_3$, $R^2=H$); 3) BHT

(hidroxitolueno butilado); 4) γ -tocoferol ($R^1=H$, $R^2=CH_3$); 5) δ -tocoferol ($R^1=R^2=H$); 6) P.I.- padrão interno (tocol). 38

Figura 10. Actividade captadora de radicais DPPH, poder redutor e capacidade de inibição da peroxidação lipídica das amostras de corpos de frutificação (carpóforos), micélios e meios de cultura das espécies *Paxillus involutus* e *Pisolithus arhizus* (média \pm SD; n = 9). 39

ABREVIATURAS

A[•]	Radical livre
Abs	Absorvância
ACR	Actividade captadora de radicais
AH	Molécula antioxidante
ANOVA	Análise de variância
ArO[•]	Radical livre resultante da acção de antioxidantes fenólicos
ArOH	Antioxidante fenólico
BHT	Hidroxitolueno butilado; 2,6-di- <i>terc</i> -butil-4-metilfenol
CENASEF	Centro Nacional das Sementes Florestais
DAD	Detector de díodos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-Difenil-1-picril-hidrazilo
dw	Massa seca
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EC₅₀	Concentração de extracto correspondente a 50% de actividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no ensaio do poder redutor
ex.	Exemplo
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
fw	Massa fresca
L	Ligante selectivo não ferroso cromogénico
L[•]	Radical alquilo
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LH	Radical alquilo reduzido
LO[•]	Radical alquoxi
LOH	Radical alquoxi reduzido
LOO[•]	Radical peroxilo
LOOH	Hidroperóxido lipídico

Me	Grupo metilo
MMNm	Meio de cultura Melin-Norkans modificado
m/v	Relação massa/volume
nd	Não detectado
PI	Padrão interno
PUFA	Ácidos gordos polinsaturados
RH	Substrato de reacção dos radicais fenólicos
RNS	Espécies reactivas de azoto
RO₂'	Radical livre que reage com os antioxidantes fenólicos
ROOH	Radical livre reduzido, resultante da acção dos antioxidantes fenólicos
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
Rpm	Rotações por minuto
SD	Desvio padrão
TO'	Radical tocoferoxilo
TOH	Tocoferol
UV	Ultravioleta
v/v	Relação volume/volume
Z'	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
ZH	Forma reduzida da molécula 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo

RESUMO

O presente trabalho teve como principais objectivos o estudo do desenvolvimento de espécies de fungos ectomicorrízicos, nomeadamente *Paxillus involutus* e *Pisolithus arhizus*, na presença e ausência de simbionte – *Pinus pinaster* – bem como a avaliação das suas propriedades antioxidantes e de alguns compostos antioxidantes (tocoferóis e compostos fenólicos) em resposta à associação simbiótica.

Numa primeira fase do trabalho as espécies micorrízicas foram colocadas a crescer em meio de cultura sólido Melin-Norkans modificado, por um período de 45 dias, de forma a obter o micélio para análise de tocoferóis e actividade antioxidante e comparar os resultados obtidos com os resultantes da análise dos corpos de frutificação das mesmas espécies. Numa segunda fase, os fungos em estudo foram inoculados no mesmo meio de cultura, de forma análoga ao ensaio anterior, na ausência e na presença de simbionte – *Pinus pinaster* – de modo a avaliar as suas propriedades antioxidantes e concentração de compostos com igual actividade quando isolados e em associação. O mesmo estudo foi feito ao nível da planta. Por último, foi estudado o efeito do tempo de inoculação na actividade antioxidante, promovendo-se uma simbiose de 48 horas entre as espécies em estudo, *Paxillus involutus*, *Pisolithus arhizus* e *Pinus pinaster*.

A avaliação do crescimento em cultura dos fungos *Paxillus involutus* e *Pisolithus arhizus*, quer na presença quer na ausência de simbionte, foi realizada através da medição dos raios da cultura do micélio em placa de Petri.

As propriedades antioxidantes foram determinadas através da realização de ensaios de avaliação da actividade captadora de radicais livres 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH), poder redutor e inibição da peroxidação lipídica.

O teor em compostos antioxidantes, nomeadamente tocoferóis, revelado pelas amostras foi determinado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) acoplada a um detector de fluorescência e a composição em compostos fenólicos foi determinada por HPLC acoplada a um detector de díodos (DAD).

As espécies de fungos ectomicorrízicos estudadas revelaram um crescimento inferior quando na presença de *Pinus pinaster*, sendo a espécie *Pisolithus arhizus* aquela que mais se adaptou a esta associação dado que revelou um desenvolvimento crescente ao longo do tempo, enquanto o fungo *Paxillus involutus*, revelou um decréscimo no seu crescimento ao fim de determinado tempo em associação.

As espécies analisadas demonstraram ainda ser uma potencial fonte de importantes moléculas antioxidantes principalmente a espécie *Pisolithus arhizus* produzida *in vitro* que revelou uma elevada composição em γ -tocoferol (154,39 $\mu\text{g/g}$ de massa seca). Relativamente ao perfil em compostos fenólicos, a espécie *Paxillus involutus* demonstrou ser a única fonte de ácido protocatéquico. As raízes de *Pinus pinaster* comprovaram também ser uma fonte de outros compostos fenólicos, nomeadamente ácido *p*-hidroxibenzóico e ácido *p*-cumárico, tanto isoladas como em simbiose com *Paxillus involutus*.

Quanto à actividade antioxidante foi detectada em todas as amostras avaliadas, sendo o carpóforo da espécie *Pisolithus arhizus* a que revelou propriedades superiores dada a sua concentração elevada de fenóis (297,94 mg EAG/g extracto) e valores de EC_{50} inferiores (< 0,60 mg/mL).

Ao longo do tempo registou-se uma diminuição geral no teor em fenóis e propriedades antioxidantes da planta, quando associada às espécies ectomicorrízicas em estudo, em especial com a espécie *Pisolithus arhizus*. Esta, reduz igualmente a actividade antioxidante na presença de *Pinus pinaster*, levando a crer que esta simbiose não parece ser indutora de stresse oxidativo. Já na espécie *Paxillus involutus* se verificam efeitos variáveis.

Os estudos realizados demonstram o potencial antioxidante das espécies analisadas, fornecendo nova informação acerca de potenciais fontes de compostos bioactivos a partir de fungos produzidos *in vitro* e reforçando o conhecimento já disponibilizado na preservação, melhoramento e salubridade dos *habitats*, e espécies que neles habitam, através de associações micorrízicas.

ABSTRACT

In the present work, the development of the ectomycorrhizal fungi, *Paxillus involutus* and *Pisolithus arhizus*, in the presence and absence of the symbiont – *Pinus pinaster* – was evaluated, as well as their antioxidant properties, and tocopherols and phenolic compounds composition, in response to the symbiotic association.

During the first part of the work, the mycorrhizal species were grown in modified Melin-Norkans medium during 45 days, in order to obtain enough mycelium for tocopherols and antioxidant activity analysis. These results were then compared with the ones obtained in fructification bodies of the same species. In the second part, the same procedure was used, but in presence and absence of the symbiont – *Pinus pinaster* – in order to determine the antioxidant potentialities in symbiotic synergy and isolated. The same analysis was carried out in the plant. Finally, the effect of inoculation time in antioxidant activity was evaluated after 48 hours of symbiosis between the studied species, *Paxillus involutus*, *Pisolithus arhizus* and *Pinus pinaster*.

The evaluation of fungi growth, in presence and absence of the symbiont, was performed by measuring the micelia's radius on a Petri dish.

The antioxidant properties were determined by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radicals scavenging activity, reducing power and lipid peroxidation inhibition assays.

Tocopherols composition was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to a fluorescence detector and phenolic compounds were evaluated by HPLC coupled to a diode detector (DAD).

The mentioned ectomycorrhizal fungi revealed a reduced growth in the presence of *Pinus pinaster*; *Pisolithus arhizus* was the most adapted to this association, growing steadily, while *Paxillus involutus* slowed its growth after a while in association.

The analyzed species, showed to be an important potencial source of antioxidant compounds, mostly *Pisolithus arhizus* that revealed the highest δ -tocopherol concentration (154.39 $\mu\text{g/g}$ of dried mass). Protocatechuic acid was found only in *Paxillus involutus*, while *Pinus pinaster* roots, both in association and isolated, showed to be a source of other phenolic compounds such us *p*-hydroxybenzoic and *p*-coumaric acids.

All the analyzed samples revealed antioxidant activity, but *Pisolithus arhizus* fruiting bodies showed the highest phenolics concentration (297.94 mg EAG/g extract) and the lowest EC₅₀ values (< 0.60 mg/mL).

There was a general decrease, along the time, in phenolics content and antioxidant properties of the plant, when associated with the studied ectomycorrhizal species, in particular with *Pisolithus arhizus*. This species also reduces the antioxidant activity in the presence of *Pinus pinaster*, suggesting that this symbiosis does not seem to be inducer of oxidative stress. In *Paxillus involutus* variable effects were observed.

The present work demonstrates the antioxidant potential of the analyzed species, adding new information regarding sources of new bioactive compounds with origin in fungi produced *in vitro*. This strengthens the knowledge on how to preserve and improve the salubrity of the *habitats* and their species, through mycorrhizal associations.

I. INTRODUÇÃO

1.1. Os fungos

Cerca de 80 000 a 120 000 espécies de fungos foram descritas até à data, embora o número total de espécies esteja estimado em aproximadamente 1,5 milhões (Hawksworth, 2001). Isto torna os fungos um dos recursos da biodiversidade menos explorados do nosso planeta (Webster & Weber, 2007). Além disso, existe uma grande variabilidade dentro da mesma espécie. Mesmo sendo morfológicamente similares, os seus metabolitos podem ser muito diferentes. Alguns metabolitos podem ser produzidos por todas as variedades de uma espécie em particular, enquanto outros metabolitos podem ser específicos de um organismo. De referir, que a química de um organismo pode também variar de acordo com as condições sob as quais este se desenvolve (Hanson, 2008).

No decorrer da evolução, os fungos conquistaram, surpreendentemente, uma vasta gama de *habitats*, desempenhando importantes papéis em diversos ecossistemas (Dix & Webster, 1995). Os fungos são ubíquos em *habitats* terrestres e de água doce, sendo menos comuns em ambientes marinhos possuindo uma distribuição cosmopolita (Webster & Weber, 2007). O seu principal papel ambiental é a reciclagem, possuindo de igual forma um importante papel ecológico como saprófitas, simbioses mutualistas, parasitas ou hiperparasitas (Hanson, 2008; Webster & Weber, 2007).

Os fungos são, assim, microrganismos amplamente dispersos, não-fotossintéticos que desempenham um papel vital no ambiente, particularmente na biodegradação de matéria orgânica. O estudo dos seus metabolitos e metabolismo tem dado várias contribuições para o desenvolvimento global da química. Embora as vias biossintéticas que os fungos utilizam para produzir os seus metabolitos tenham características gerais em comum com as bactérias, plantas e mamíferos, eles diferem em detalhe e as estruturas dos produtos naturais resultantes são muitas vezes diferentes. Como os fungos não possuem clorofila e não são organismos fotossintéticos, obtêm a sua energia e muitos dos nutrientes que suportam as suas vias sintéticas através da degradação de plantas e outra matéria (Hanson, 2008). Possuem assim um sistema de nutrição heterotrófica. Ao contrário dos animais que se alimentam especialmente por ingestão, os fungos obtêm os seus nutrientes através de digestão extracelular realizada por enzimas excretadas, seguida da absorção dos produtos solubilizados (Webster & Weber, 2007).

Os fungos são organismos eucariotas com um núcleo distinto (Hanson, 2008). Quanto à sua estrutura, possuem uma aparência bastante diversificada. As unidades estruturais básicas da maioria dos fungos são os filamentos conhecidos como hifas. As hifas podem agregar-se formando o denominado micélio (Carlile *et al.*, 2001). Em alguns dos fungos superiores (os cogumelos comestíveis e venenosos) as hifas podem agregar-se para formar longas vertentes e até diferenciar-se criando uma estrutura semelhante a um cordão, designada por rizomorfo (Hanson, 2008). De referir que, a colonização de uma fonte de alimento, uma vez alcançada, é conseguida de forma mais eficiente pelo crescimento deste sistema de tubos ramificados, as hifas (Webster & Weber, 2007). Os fungos superiores desenvolvem estruturas complexas facilmente observáveis conhecidas como corpos de frutificação. Estes brotam do seu micélio, particularmente no Outono, e produzem esporos. No outro extremo, alguns microfungos unicelulares, como as leveduras, produzem pequenas células globulares ou elípticas que apenas são visíveis ao microscópio (Hanson, 2008).

As hifas são geralmente bastante uniformes nos diferentes grupos taxonómicos dos fungos. Uma das poucas características que nos permitem a sua distinção é a presença ou ausência de paredes transversais designadas por septos (Webster & Weber, 2007). As hifas podem ser células muito simples multinucleadas e asseptadas (não divididas) através das quais os fluidos celulares citoplasmáticos podem fluir. Outras hifas são septadas possuindo divisões distintas. Nestas, a maior parte da actividade química tem lugar no ápice. A forma que um fungo toma, depende também das condições sob as quais se encontra. Alguns fungos têm a forma de levedura sob determinadas condições e uma forma filamentosa sob outras (Hanson, 2008). Assim, é importante perceber que as hifas e as leveduras são apenas duas formas de crescimento dos fungos, fenómeno este conhecido como dimorfismo. A estrutura celular dos fungos é assim considerada como um conjunto de características especiais derivadas do stresse, ao invés de atributos comuns à maioria das células eucarióticas (Carlile *et al.*, 2001).

A reprodução dos fungos ocorre normalmente através de esporos, podendo também desenvolver-se de forma vegetativa, através de fragmentos de micélio. Embora muitos esporos sejam disseminados pelo vento, outros podem necessitar da intervenção de vectores como insectos ou outros animais. Desta forma, podem ser pigmentados e alguns podem ter um revestimento gelatinoso de polissacáridos para facilitar a sua disseminação por um “transportador” e a sua ligação a um hospedeiro. Os corpos de frutificação dos fungos superiores desempenham também um importante papel na

produção e disseminação dos seus esporos (Hanson, 2008). Os esporos estão localizados nas lâminas, poros ou picos, situados na parte inferior do chapéu, e o pé eleva o corpo de frutificação acima do solo de forma a facilitar a sua dispersão por correntes de ar (Carlile *et al.*, 2001). Embora os corpos de frutificação sejam uma característica admirável dos cogumelos cultivados e fungos relacionados, estes são inteiramente dependentes, para a sua nutrição, do extenso micélio que penetra o substrato (Carlile *et al.*, 2001). Como já referido, os fungos podem assumir diferentes características consoante o meio em que se desenvolvem. Sob condições inóspitas, um organismo pode ainda desenvolver um estado de dormência. Na natureza, isto pode permitir aos esporos ultrapassar o Inverno no solo (Hanson, 2008).

Todas as células são limitadas por membrana plasmática. Uma diferença importante é que o ergosterol é o principal esteroide da membrana plasmática dos fungos, ao contrário do colesterol presente nas membranas dos animais (Carlile *et al.*, 2001). A parede dos fungos surge como uma estrutura dinâmica e não como um revestimento inerte da célula. A sua construção pode mudar em resposta ao stress ambiental como, por exemplo, o choque osmótico. Em todos os casos, os principais componentes da parede celular são polissacáridos. Existem também proteínas e glicoproteínas específicas das paredes celulares em todos estes grupos. Assim, um componente importante das paredes celulares da maioria dos fungos é a quitina, um polissacárido que é também o principal constituinte do exoesqueleto dos insectos e outros artrópodes. O segundo principal componente fibroso das paredes celulares dos fungos, excepto para os Zygomycetes, é o $\beta(1\rightarrow3)$ glucano. Geralmente, este é o componente mais abundante da parede. Uma vasta gama de outros glucanos é encontrada nas paredes celulares dos fungos. As proteínas representam o terceiro constituinte químico importante das paredes celulares dos fungos. Além das enzimas envolvidas na síntese ou na lise da parede celular, ou na digestão extracelular, existem também proteínas estruturais. Como a manose é o seu principal componente, estas proteínas são designadas por manoproteínas (Zlotnik *et al.*, 1984). As manoproteínas são os componentes principais do exterior das paredes das células fúngicas, especialmente das leveduras. Proteínas expostas na superfície da parede celular podem também determinar as propriedades de superfície tais como adesão e reconhecimento (Cormack *et al.*, 1999). Para além de polissacáridos e proteínas, as paredes celulares de alguns fungos contêm melaninas, pigmentos negros que consistem em polímeros ramificados derivados de metabolitos fenólicos como a tirosina, catecol e di-hidroxinaftalenos. As enzimas capazes de degradar melaninas

ainda não foram caracterizadas, e é provável que as melaninas dotem a parede celular do fungo de alta capacidade de resistência à lise enzimática podendo ter também papéis fotoprotectores e estruturais (Carlile *et al.*, 2001).

Os fungos não crescem de forma isolada. Alguns atacam plantas, insectos e mamíferos como patogéneos, enquanto outros são saprófitas e crescem sobre matéria morta. Alguns vivem em associações simbióticas positivas com um organismo hospedeiro. Desta forma, existem fungos micorrízicos que estão associados às raízes de plantas e facilitam a absorção de nutrientes desta. Outros organismos são endofíticos crescendo dentro do sistema vascular da planta. Alguns fungos crescem numa relação simbiótica com algas fotossintéticas ou cianobactérias formando os líquenes. De referir, que por todo o mundo natural existe uma linguagem química entre o fungo e o seu hospedeiro que determina a natureza desta associação (Hanson, 2008).

Em 1969, Whittaker propôs uma classificação dos organismos em cinco reinos em que pela primeira vez os fungos aparecem como um reino à parte. No entanto, novos estudos moleculares e cladísticos levaram à descoberta que, a nível molecular, a vida na terra pode ser classificada em três grupos, designados por domínios, dos quais dois são procarióticos e o terceiro eucariótico. Os fungos são, assim, reconhecidos como um dos cinco reinos eucariotas, sendo os outros Animalia, Plantae, Chromista e Protozoa (Carlile *et al.*, 2001).

Os organismos estudados pelos micologistas surgem em três reinos, o Protozoa, Chromista e Fungi, no domínio Eukaryota (Carlile *et al.*, 2001). O reino Fungi consiste apenas em espécies que possuem hifas, ou espécies claramente relacionadas. Este reino foi dividido em quatro divisões. Os Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota e Basidiomycota. Actualmente, a maioria dos investigadores divide o reino Fungi em sete filós: Basidiomycota, Ascomycota, Zygomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Blastocladiomycota, Neocallimastigomycota, sendo os dois últimos menos conhecidos (Seif *et al.*, 2005; James *et al.*, 2006a; James *et al.*, 2006b; Liu *et al.*, 2006; Steenkamp *et al.*, 2006).

Muitos fungos das classes Ascomycetes e Agaricomycetes além de produzirem esporos por processos sexuais formam outros tipos de esporos assexuadamente (Carlile *et al.*, 2001).

Os fungos estudados neste trabalho pertencem ambos ao filo Basidiomycota, classe Agaricomycetes e são fungos nos quais o processo sexual envolve a produção de basidiósporos, contidos num basídio, nos quais o núcleo sofre meiose. Geralmente, existem quatro esporos por basídio (Worrall, 1999). Estes fungos constituem um grupo importante com cerca de 22 000 espécies conhecidas. Muitos dos mais conspícuos fungos do campo e dos bosques são da classe Agaricomycetes. A nível microscópico existem duas características muito disseminadas pelo grupo que caracterizam esta classe. Uma dessas características é a presença de “clamp connections” aparentemente ligando células adjacentes ou hifas. A outra é que os basidiósporos são normalmente balistosporos que são activamente lançados do basídio. A classificação dos Agaricomycetes é um pouco controversa. Antes consideravam-se três classes inseridas no Filo Basidiomycota: Basidiomycetes, Teliomycetes e Ustomycetes. Hoje, a designação Basidiomycetes torna-se obsoleta e, quando utilizada, refere-se ao Filo Basidiomycota. A classificação actual dos Basidiomycetes (agora Agaricomycetes) encontra-se na Tabela 1.

Existem várias ordens dentro dos macrofungos Agaricomycetes tais como os *Agaricales* (*Agaricus bisporus*, *Coprinus comatus*, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes*) ou *Boletales* (*Paxillus involutus*, *Pisolithus arhizus*).

Os Agaricomycetes são também fungos micorrízicos, conseguindo os seus nutrientes em associação com as raízes de plantas específicas. Assim, organismos em particular estão frequentemente associados com árvores em particular. Um Verão quente e húmido favorece o crescimento do micélio sob o solo, o qual no Outono desencadeia a formação de corpos de frutificação. O micélio pode persistir vários anos cobrindo uma área substancial do subsolo comparado com o tamanho do corpo de frutificação (Hanson, 2008).

Em laboratório, a obtenção e estabelecimento de fungos, particularmente dos Agaricomycetes, é possível por excisão de porções do corpo de frutificação e colocação destas em meio de cultura apropriado (Carlile *et al.*, 2001). O crescimento contínuo e ramificação das hifas resultam na produção de um micélio indiferenciado na superfície do meio de cultura com agar. Este crescimento invasivo é a via mais eficiente para os fungos se espalharem por todo um substrato. A colónia geralmente continua a crescer, em raio, a uma taxa uniforme até encontrar um obstáculo (por exemplo, o bordo da caixa de Petri ou outra colónia). Por vezes, contudo, a taxa de aumento pode diminuir gradualmente e o crescimento pode mesmo cessar sem que todo o meio seja consumido.

Este efeito pode dever-se a produtos tóxicos do metabolismo, como iões de hidrogénio ou amónia (Carlile *et al.*, 2001). De referir, que em vez de se expandirem, como durante o crescimento pelo meio, as hifas podem ter como intuito a sua agregação.

Tabela 1. Classificação dos fungos do Filo Basidiomycota (Kirk *et al.*, 2008).

Reino	Filo	Sub-filo	Classes	Ordens	Famílias
Fungi	Basidiomycota	Agaricomycotina	Agaricomycetes	Agaricales	
				Atheliales	
				Auriculariales	
				Boletales	Boletaceae
					Bolitiniellaceae
					Calostomataceae
					Coniophoraceae
					Diplocistidiaceae
					Gastroporiaceae
					Gomphidiaceae
					Gyroporaceae
					Hygrophoropsidaceae
					Paxillaceae
					Protogastraceae
					Rhizopogonaceae
		Sclerodermataceae			
		Serpulaceae			
		Suillaceae			
		Cantharellales			
		Corticiales			
		Geastrales			
		Gomphales			
		Hymenochetales			
Hysterangiales					
Phallales					
Polyporales					
Russulales					
Sebacinales					
Thelephorales					
Dacrymycetes					
Tremellomycetes					
Pucciniomycotina	Agaricostilbomycetes				
	Atractiellomycetes				
	Classiculomycetes				
	Cryptomycocolacomycetes				
	Cystobasidiomycetes				
	Microbotryomycetes				
	Mixiomycetes				
Pucciniomycetes					
Ustilaginomycotina	<u>Exobasidiomycetes</u>				
	Entorrhizomycetes				
	<u>Ustilaginomycetes</u>				

Não há muito conhecimento acerca dos factores de sinalização que levam ao crescimento sincronizado de grupos de hifas. No entanto, especula-se que a difusão de moléculas de sinalização ocorre entre hifas adjacentes. Por exemplo, uma dada hifa é capaz de influenciar a expressão génica de hifas adjacentes através da secreção de mensageiros químicos (Moore, 1994).

O meio de cultura para desenvolvimento de um fungo pode ser sintético ou natural. Um típico meio de cultura sintético possui uma fonte de carbono, normalmente um açúcar, uma fonte de azoto como um sal de amónio, um sal de fosfato, magnésio e potássio muitas vezes fornecendo iões sulfato e cloreto juntos com os sais de elementos residuais. A produção de metabolitos pode ser bastante sensível aos constituintes do meio de cultura, tal como às condições do meio ambiente quando *in vivo*, assim, os metabolitos produzidos por uma mesma espécie num determinado meio de cultura, pode ser diferente quando desenvolvida num meio de cultura diferente (Hanson, 2008).

A química dos fungos está presente em muitos aspectos do nosso dia-a-dia, as leveduras na produção do pão e de vinho, os cogumelos comestíveis presentes na nossa dieta ou o fabrico de antibióticos como as penicilinas (Hanson, 2008). A química microbiológica está interessada na estrutura e actividades química e biológica dos metabolitos dos fungos. A biossíntese destes metabolitos, as sequências, a estereoquímica e mecanismo das etapas individuais, em conjunto com a estrutura e regulação das enzimas envolvidas, é uma vasta área de informação. A química ecológica das interacções fúngicas com plantas e insectos tem constituído uma outra área de investigação. A compreensão da química base de agentes fúngicos de biocontrolo pode ter também aplicações agro-químicas úteis (Hanson, 2008). Como organismos biodegradativos, os fungos podem realizar transformações microbiológicas de substâncias químicas estranhas, por exemplo, hidroxilações. A utilização desta capacidade na biorremediação de áreas contaminadas é uma nova aplicação de interesse químico (Hanson, 2008).

1.1.1. *Paxillus involutus* e *Pisolithus arhizus*

Os fungos *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. e *Pisolithus arhizus* (Scop.) Rauschert são duas espécies de cogumelos micorrízicos amplamente utilizadas, com uma vasta

gama de plantas hospedeiras e com uma extensa aplicação em programas de micorrização florestal.

Os fungos micorrízicos formam uma relação benéfica de dependência mutualista com as raízes das plantas hospedeiras, variando desde árvores a gramíneas. Os micélios de algumas espécies micorrízicas podem formar um revestimento exterior envolvendo as raízes da planta sendo chamados ectomicorrízicos. Quando invadem o interior das células das raízes da planta hospedeira designam-se por endomicorrízicos. Em qualquer um dos casos, ambos os organismos beneficiam da associação (Stamets, 2000).

A maioria das espécies do género *Paxillus* são ectomicorrízicas (Wallander & Söderström, 1999). A espécie *Paxillus involutus* possui um chapéu em forma de funil, castanho com a margem enrolada. A cutícula é viscosa em tempo húmido. Os basidiocarpos deste fungo são também suaves e carnudos com um aspecto característico, em que o tecido do himénio se separa facilmente da carne do chapéu. As lâminas são decorrentes, apertadas e amarelas manchando-se de castanho-avermelhado ao tocar. O pé é curto, castanho e carnudo e mancha-se ao tocar tal como as lâminas e o chapéu. A carne é succulenta, amarelada, torna-se parda vermelha ao contacto com o ar. Possui um odor e sabor agradáveis. Os esporos são castanhos (Rodríguez, 2006; Webster & Weber, 2007). Considerando que é uma espécie micorrízica, o *Paxillus involutus* possui uma invulgar e ampla gama de hospedeiros, com 23 espécies de árvores diferentes listadas por Wallander e Söderström (1999). No entanto, é mais comum estar associado a vidoeiros (*Betula*) e carvalhos (*Quercus*) em florestas ácidas. Assim, o seu *habitat* é preferencialmente debaixo de coníferas e pouco frequente em caducifólios. Este fungo surge entre a Primavera e o Outono (Rodríguez, 2006). Os basidiocarpos do fungo *Paxillus involutus*, embora tradicionalmente considerados edíveis, são, de facto, venenosos (Webster & Weber, 2007); quando consumido cru pode chegar a ser mortal. Quando cozido pode ser considerado comestível mas não é aconselhável a sua ingestão (Rodríguez, 2006). Alguns isolados são capazes de efectuar um crescimento saprófita e podem frutificar na ausência de um hospedeiro micorrízico (Webster & Weber, 2007).

A espécie mais conhecida do género *Pisolithus* é a espécie *P. arhizus*. Hoje conhecem-se mais de 10 espécies de *Pisolithus* (Cairney, 2002; Martin *et al.*, 2002), estando o *P. arhizus* distribuído através do hemisfério norte e associado principalmente a *Pinus* e *Quercus*. Além da dispersão antropogénica, também é evidente que o

Pisolithus pode percorrer longas distâncias através dos basidiósporos transportados pelo ar (Moyersoen *et al.*, 2003).

As espécies do género *Pisolithus* podem ser deslocadas por outros fungos micorrízicos em condições frescas e húmidas (McAfee & Fortin, 1986) mas são proeminentes em ambientes extremos, por exemplo, *habitats* secos com solos arenosos ou áreas poluídas com metais pesados (Walker *et al.*, 1989; Smith & Read, 1997). Nestas situações, o crescimento de árvores micorrízicas pode ser aumentado várias vezes em relação a controlos não inoculados.

O fungo *Pisolithus arhizus* possui um carpóforo globuloso, assemelhando-se a um tronco deforme quando é velho de cor amarelo sujo a castanho. A deiscência é irregular e a gleba quando madura é castanha, formada por inúmeras cavidades e contém os esporos no seu interior. Os basidiósporos são produzindo dentro de numerosos peridíolos que se desintegram para libertar os seus esporos passivamente. A formação e maturação dos peridíolos processam-se a partir da extremidade para a base do gasterocarpo que gradualmente se desfaz no processo (Webster & Weber, 2007). Estes esporos são globulosos e espinhosos. O *habitat* desta espécie é em matagais de solo arenoso e diversos bosques surgindo igualmente da Primavera ao Outono. Pode ser consumido quando jovem, sobretudo para aromatizar molhos (Rodríguez, 2006).

1.2. *Pinus pinaster*

O género *Pinus* consiste em 110 – 120 espécies distribuídas pelas regiões temperadas do hemisfério norte. Mais de 40 identificações taxonómicas reconheceram algumas das principais divisões dentro do género (Price *et al.*, 1998).

Os pinheiros afectam processos biogeoquímicos, regimes hidrológicos e de fogo e fornecem alimento e criam *habitats* para os animais. A floresta boreal, da qual os pinheiros são uma importante componente, desempenha um importante papel na determinação do clima regional e global. Por exemplo, a presença da floresta no hemisfério norte, onde os pinheiros detêm elevada importância e são muitas vezes dominantes, mascara a elevada reflexão da neve, levando a temperaturas de Inverno superiores ao que seriam na ausência de árvores (Bonan *et al.*, 1992). Estas árvores

foram também cultivadas em diversas partes do mundo, tanto dentro como fora da sua área natural e formam a base da silvicultura exótica em muitos países do hemisfério sul. Os pinheiros são assim, sem dúvida, o género de árvores com maior significado ecológico e económico no mundo (Richardson, 2000). Outras funções importantes têm sido encontradas neste género de plantas. Têm sido descritos em resíduos de pinheiro oligómeros de procianidinas (Pietta *et al.*, 1998; Wood *et al.*, 2002). Os efeitos de flavonóides extraídos do pinheiro, sobre a formação de radicais livres foram já investigados em linhas celulares de macrófagos de ratinhos, e revelaram uma forte actividade captadora contra espécies reactivas de oxigénio (Cho *et al.*, 2000) reforçando assim as defesas antioxidantes (Pinelo *et al.*, 2004).

Mais de um terço das espécies de gimnospermas pertencem às Pinaceae, de longe a maior família das coníferas modernas, que é dividida em 10 ou 11 géneros (Richardson, 2000). As plantas de *Pinus pinaster* Aiton também designadas por *Pinus hamiltonii* Ten., *Pinus maritima* Poir ou *Pinus mesogeensis* Fieschi & Gaussen, possuem, em Portugal, o nome comum de pinheiro-bravo (CAB International, 2002).

O pinheiro-bravo (*Pinus pinaster* Ait.) é uma espécie de importância económica, ecológica e pitoresca na zona oeste do Mediterrâneo. Abrange mais de quatro milhões de hectares entre Espanha, Portugal, França e Itália (Ribeiro *et al.*, 2001). Desta forma, é utilizado principalmente na carpintaria, construção civil, aglomerados, produção de celulose e papel, soalho e paletes. Em Portugal, de acordo com o Inventário Nacional Florestal (2005/2006), 23% da área florestal nacional é ocupada por *Pinus pinaster*, representando 11% do total das exportações de produtos florestais em 2000 (Correia *et al.*, 2004). Dada a importância económica desta espécie, um plano nacional de melhoria de árvores desta espécie está em operação desde o início dos anos 80 (Roulund *et al.*, 1988).

As plantações de *Pinus pinaster* têm sido cultivadas na região da bacia mediterrânica (tanto Europa como norte de África), particularmente para estabilização de dunas, zonas costeiras e em solos pouco férteis. A árvore tem sido também uma das principais fontes de resina bem como de madeira para construção. As suas maiores desvantagens são a sua susceptibilidade ao fogo e a baixa qualidade da resina comparada com a de outras espécies de pinheiro. Quanto aos tipos de vegetação formados por estas plantas podemos observar comunidades vegetais costeiras, florestas de coníferas, dunas e florestas mistas (CAB International, 2002).

O *Pinus pinaster* é uma árvore relativamente grande com 20 – 40 metros de altura. As copas das árvores velhas são largas e planas e o tronco é liso na maioria do seu comprimento. As árvores de plantações possuem caules cilíndricos e lisos ao contrário das árvores selvagens em que os troncos são largos na base afunilando à medida que aumenta a altura. As raízes são perpendiculares ao caule também com raízes secundárias bem desenvolvidas. A casca é grossa, com fissuras profundas e de cor variando entre o vermelho e castanho. Quanto à folhagem possui agulhas espinhosas, erectas mas não rígidas, apresentam-se frequentemente enroladas, ocorrendo aos pares com uma cor verde viva. As flores aparecem no fim do Inverno e a meio da Primavera. As flores masculinas são geralmente abundantes, agrupadas em anéis rasos debaixo das folhas; o pólen é libertado no início da Primavera. As flores femininas ocorrem nas extremidades dos rebentos em vermelho baço. As pinhas ficam maduras entre o fim do Verão e o Outono, mantendo-se fechadas na árvore durante vários anos. A primeira floração ocorre a partir dos 6 anos, ficando a ser regular entre os 10 e 15 anos. A produção plena de sementes acontece em intervalos que variam entre os 3 e 5 anos (CAB International, 2002).

O fogo recorrente é uma grande perturbação nos ecossistemas florestais mediterrânicos (Barbéro *et al.*, 1998). A sucessão das florestas, com início após o fogo, depende de muitos factores tais como composição inicial das espécies de plantas, intensidade do fogo, disponibilidade do banco de sementes e capacidade de recuperação das comunidades microbiológicas do solo (Rodrigo *et al.*, 2004; Hart *et al.*, 2005). Os pinheiros mediterrânicos exibem elevada variabilidade genética e plasticidade fenotípica, bem como elevada capacidade de colonização (Fernandes & Rigolot, 2007; Pausas *et al.*, 2008), mas, ao mesmo tempo, a regeneração natural e desenvolvimento subsequente dos germinantes é altamente dependente de ambos, condições ambientais pós-incêndio (incluindo o microclima e a competição com plantas vizinhas) e a associação com fungos ectomicorrízicos (Rodrigo *et al.*, 2004). Os pinheiros são obrigatoriamente ectomicorrízicos e a persistência de propágulos activos de fungos ectomicorrízicos no solo após um incêndio é crucial para a sobrevivência e posterior regeneração de germinantes (Dahlberg *et al.*, 2001).

1.3. Micorrizas e micorrização

O estabelecimento e crescimento da maioria das plantas requerem, ou são reforçados, pela presença de fungos especializados no solo que formam associações com as suas raízes. Estas associações são conhecidas por micorrizas (do grego *mykos*, fungo; *rhizon*, raíz). Esta forma particular de vida implica um processo de reconhecimento, onde os sinais químicos envolvidos e os mecanismos de stresse oxidativo estão provavelmente activados e superados. A manutenção e resistência ao stresse de árvores melhoram consideravelmente quando as plantas são inoculadas com fungos ectomicorrízicos em viveiro (Marx *et al.*, 1991; Le Tacon, 1992; Rudawska & Kieliszewska-Rokicka, 1997, Martins, 2004, 2010). Esta associação é desencadeada por sinais emitidos por ambos os parceiros. Estes sinais levam a alterações morfológicas e a um desenvolvimento complexo de estruturas específicas tanto na planta como no fungo (Ditengou & Lapeyrie, 2000; Kawano *et al.*, 2001; Lagrange *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2001; Heller *et al.*, 2008). A sobre- e sub-expressão de genes de resposta a stresse ou de defesa marcam a natureza complexa das interacções micorrízicas (Heller *et al.*, 2008).

As micorrizas aumentam a absorção de nutrientes por parte da planta tais como azoto e elementos essenciais (fósforo, cobre e zinco), particularmente quando estes estão em baixas concentrações ou em formas insolúveis no solo (Carlile *et al.*, 2001; Martins, 2004, 2008). Por crescerem para além da zona imediata da raíz, os filamentos de micélio concentram os nutrientes que se encontram mais longe. O micélio do fungo, secreta enzimas extracelulares que desbloqueiam complexos orgânicos (Carlile *et al.*, 2001). Os nutrientes recém-libertados são depois selectivamente absorvidos directamente através das paredes celulares até à rede do micélio. Na estação chuvosa, a água transporta nutrientes através desta membrana filtradora, incluindo bactérias, que muitas vezes se tornam uma fonte de alimento para o fungo. O meio é assim “limpo” não só de compostos ricos em carbono/azoto mas também de bactérias, em alguns casos nemátodes, e muitos outros microrganismos. A utilização de micélios como microfiltros está a ser estudada actualmente na remoção de contaminantes biológicos da água de superfície que passa directamente para as bacias hidrográficas sensíveis (Stamets, 2000). As ectomicorrizas produzem também enzimas como proteinases e quitinases que lhes permitem obter azoto e fósforo a partir de matéria orgânica nas camadas de folhas em degradação (Carlile *et al.*, 2001). A extensão das hifas no solo a partir da raíz pode

desempenhar um papel de elevada captação, desde que os sistemas de transporte activo nas membranas celulares dos fungos sejam capazes de concentrar soluções contra os gradientes de concentração. Os nutrientes da planta assim concentrados são depois libertados pelas hifas e absorvidos pelas células das raízes associadas. Também, nutrientes concentrados pelos fungos e conservados nas imediações da raiz podem servir de reservas para utilização futura (Carlile *et al.*, 2001).

O fluxo de nutrientes é um processo recíproco na maioria das associações micorrízicas. A planta fornece ao fungo compostos de carbono, especialmente açúcares (hexoses) e o fungo absorve estes compostos e converte-os em álcoois derivados de açúcares como manitol. As células da planta normalmente não perdem açúcares, mas o fungo parece ser capaz de induzir este aumento selectivo na permeabilidade da membrana celular da planta. Plantas em associação com fungos micorrízicos conseguem também resistir a doenças muito melhor do que aquelas que não se encontram em simbiose (Carlile *et al.*, 2001; Martins, 2004, 2008). Muitos ecologistas reconhecem hoje que uma floresta saudável está directamente relacionada com a presença, abundância e variedade de associações micorrízicas. Os fungos micorrízicos tornam-se endémicos no solo onde os seus hospedeiros crescem, e formam extensas redes que se podem ligar às raízes das plantas de diferentes espécies. O baixo grau de especificidade pelo hospedeiro de alguns fungos micorrízicos é ilustrado pelo facto que o tipo de micorriza encontrada numa comunidade de plantas pode ser determinado pelas espécies de plantas dominantes. Por exemplo, os fetos normalmente possuem micorrizas arbusculares, mas quando crescem em matas de pinheiro adquirem as ectomicorrizas das árvores dominantes (Carlile *et al.*, 2001).

Existem diversos tipos de micorrizas. As ectomicorrizas são principalmente formadas nas raízes de plantas lenhosas. Crê-se que este tipo de micorrizas seja mais comum em zonas temperadas do globo, onde há alterações climáticas sazonais, ao contrário dos trópicos. As ectomicorrizas mais estudadas são as de pinheiro (*Pinus*) e de faia (*Fagus*), embora as ectomicorrizas tenham sido citadas em 130 géneros diferentes, de 43 famílias de plantas. As ectomicorrizas começam a desenvolver-se quando as hifas infectam a raiz e crescem em direcção às partes mais velhas formando uma teia que mais tarde pode tornar-se um invólucro volumoso. Este revestimento pode ocupar mais de 30% do volume da raiz. As hifas do revestimento crescem para o interior entre as células da epiderme e do córtex, para formar uma estrutura designada por rede de Harting. Pensa-se que esta é a principal interface para a troca de substâncias entre os

simbiontes. Como o crescimento padrão da raiz é afectado, a taxa de divisão celular no ápice decresce, retardando o alongamento. As células corticais alongam-se radialmente, por isso a raiz infectada torna-se curta e espessa comparada as não-infectadas. Uma matriz interfacial especializada desenvolve-se entre as células do fungo e da planta. A adesão entre elas é mediada por glicoproteínas. Nas zonas de contacto entre as paredes celulares dos simbiontes há uma secreção reforçada de polímeros fibrilares extracelulares, mas isto apenas ocorre quando os parceiros são compatíveis. Por todo o sistema radicular e durante a vida da planta há um equilíbrio dinâmico entre a colonização. A re-colonização contínua ocorre a partir do fungo no solo e novas raízes, crescendo para fora dos seus pontos de origem dentro das raízes maduras, tornando-se colonizado assim que passam através do revestimento fúngico. A qualquer altura o sistema radicular possui raízes colonizadas e não-colonizadas. Algumas ectomicorrizas possuem muitas hifas desenvolvidas formando uma rede interligada de micélio e cordões miceliais através do solo, mas outras têm superfícies lisas com algumas hifas emanescerentes (Carlile *et al.*, 2001).

A colonização ectomicorrízica tem sido vista como sendo necessária para o estabelecimento com sucesso de algumas árvores como *Pinus*. Tem sido demonstrado que as raízes tornam-se colonizadas não só por micorrizas estabelecidas no solo, mas também por esporos de fungos formadores de micorrizas. A micorrização iniciada por esporos aerotransportados pode ser importante ao permitir que sementes de árvores colonizem novas áreas (Carlile *et al.*, 2001).

As ectomicorrizas parecem também ser importantes no ciclo de nutrientes, capturando substâncias como compostos de fosfato e azoto e catiões assim que são libertados por exsudação da folhagem e queda das folhas, e devolvendo-os ao sistema da raiz. Restos vegetais no solo podem também fornecer nutrientes para alguns fungos micorrízicos. As raízes ectomicorrízicas crescem tipicamente em camadas de resíduos, onde as condições variam muito mais do que nos horizontes inferiores do solo com acontecimentos como queda das folhas, precipitação e actividade de animais, e onde consequentemente a disponibilidade de nutrientes é descontínua. Aqui, a sua disponibilidade para as reservas de fosfato podem ser particularmente úteis para a planta (Carlile *et al.*, 2001).

Com estas características do processo de micorrização em mente, utilizamos dois fungos ectomicorrízicos para investigar a sua capacidade diferencial de produção de compostos antioxidantes *in vivo* e, após isolamento *in vitro* tanto isolados como na

presença de *Pinus pinaster*. De referir, que os ensaios *in vitro* pretendem a superação dos factores genéticos e ambientais, a variabilidade química dos fungos permitindo assim uma produção contínua e homogénea destes compostos sob condições padrão. Além deste estudo, também foi avaliada a capacidade antioxidante e produção de compostos com igual actividade, pelos organismos isolados e em simbiose.

1.4. Stresse oxidativo e actividade antioxidante

Um radical livre é definido como qualquer átomo ou molécula que possui electrões desemparelhados na orbital exterior (Gutteridge & Halliwell, 2000; Halliwell & Gutteridge, 1999). Nos organismos aeróbios, os radicais livres estão constantemente a ser produzidos durante o metabolismo celular normal, principalmente na forma de Espécies Reactivas de Oxigénio (ROS) e Espécies Reactivas de Azoto (RNS). A exposição do organismo a radicais livres leva ao desenvolvimento de mecanismos de defesa endógenos de forma a eliminá-los (Valko *et al.*, 2007; Goetz & Luch 2008; Ferreira *et al.*, 2009). Estes radicais são geralmente instáveis e muito reactivos. Os radicais livres que derivam de moléculas de oxigénio (O₂), geralmente conhecidos como ROS, representam a classe mais importante de espécies de radicais originada nos sistemas biológicos (Miller *et al.*, 1990). Na verdade, apesar da importância do oxigénio à vida aeróbia, em determinadas situações esta molécula pode ser tóxica. Este fenómeno é denominado “paradoxo do oxigénio” (Gilbert, 2000). A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes (enzimáticas e não enzimáticas) são uma condição essencial para o normal funcionamento do organismo. Quando este equilíbrio tende para a produção de radicais livres, dizemos que o organismo se encontra em stresse oxidativo. Nesta situação, o excesso de radicais livres pode provocar danos ao nível dos lípidos celulares, proteínas e DNA, afectando o funcionamento normal das células e conduzindo a diversas doenças. A presença de antioxidantes na dieta pode ajudar o sistema de defesa endógeno, reduzindo os danos oxidativos (Temple, 2000; Fang *et al.*, 2002; Liu, 2003). Estes efeitos são observados não só no Homem mas em todos os organismos aeróbios, daí a importância de investigar novas fontes de compostos antioxidantes.

Existem vários métodos de avaliação da actividade antioxidante em extractos de produtos naturais. O método de *Folin-Ciocalteu* é bastante utilizado para avaliar fenóis totais. Contudo, é um teste que pode ter interferências uma vez que o reagente (mistura de ácido fosfotúngstico e ácido fosfomolibdico) também reage com outros compostos não-fenólicos, levando a uma sobreavaliação da quantidade de fenóis. Por exemplo, o ácido ascórbico é um agente amplamente reduzido que pode interferir na reacção de *Folin-Ciocalteu* (George *et al.*, 2005). Outras substâncias redutoras como alguns açúcares e aminoácidos podem também interferir. Além disso, os resultados têm que ser expressos em equivalentes de um padrão em particular (como catequina, ácido gálico ou ácido tânico). Geralmente os fenóis determinados pelo método de *Folin-Ciocalteu* são expressos em equivalentes de ácido gálico. De referir, que este método não é selectivo uma vez que determina tanto polifenóis como monofenóis (Singleton *et al.*, 1999). Todos estes aspectos aumentam a importância da determinação dos compostos fenólicos por técnicas mais sofisticadas, nomeadamente técnicas cromatográficas (Ferreira *et al.*, 2009).

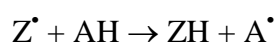
O ensaio *Folin-Ciocalteu* envolve então uma mistura de tungstato e molibdato em meio básico (5 – 10% de solução aquosa de Na_2CO_3). Os fenóis são energeticamente oxidados em meio básico resultando na formação de $\text{O}_2^{\cdot-}$, o qual, por sua vez, reage com o molibdato originando óxido de molibdénio, MoO^{4+} que tem uma absorvância muito intensa próximo dos 750 nm. Entre outras coisas, o procedimento associado com o aparecimento de produtos corados é, em princípio, mais sensível; além disso, não requer uma padronização rigorosa das condições do ensaio. Embora o método de *Folin-Ciocalteu* não tenha o propósito de caracterizar a actividade antioxidante, de facto este método parece ser um dos melhores para uma estimativa aproximada desta actividade (Roginsky & Lissi, 2005). Investigadores determinaram a quantidade de fenóis totais em produtos alimentares utilizando o método de *Folin-Ciocalteu* concluindo que está relacionada com a actividade antioxidante determinada por variados métodos. Na maioria dos casos, a correlação entre os dois parâmetros (fenóis totais e actividade antioxidante) é bastante evidente, o que confirma o valor do teste de *Folin-Ciocalteu*. Desta forma, este método poderá ser bastante aceitável, embora o problema da sua padronização continue por resolver (De Beer *et al.*, 2003; Singleton *et al.*, 1999).

Uma das metodologias utilizadas para a determinação da actividade antioxidante consiste na monitorização da capacidade captadora de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo; Fig. 1).



Figura 1. Representação da molécula de DPPH na sua forma de radical livre e não-radical respectivamente (Molyneux, 2004).

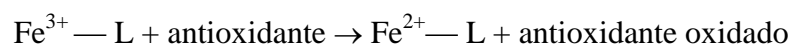
Esta molécula é caracterizada por ser um radical livre estável em virtude da deslocalização do electrão livre sobre a molécula como um todo, deste modo, não ocorre a formação de dímeros, como seria o caso da maioria dos outros radicais livres. A deslocalização dá também origem à cor violeta, caracterizada por uma absorvância, em solução de etanol concentrada, a cerca de 520 nm. Quando a solução de DPPH é misturada com uma substância capaz de doar um átomo de hidrogénio, obtém-se então a forma reduzida do composto, com a perda da coloração violeta (coloração amarelo pálido do grupo picrilo ainda presente). Representando o radical DPPH por Z^\bullet e a molécula antioxidante por AH, a primeira reacção é:



em que ZH corresponde à forma reduzida e A^\bullet ao radical livre produzido nesta primeira reacção. Esta reacção destina-se a fornecer a ligação com outras reacções que ocorrem num sistema de oxidação, como a auto-oxidação de um lípido ou outra substância insaturada; o DPPH, molécula Z^\bullet , representa assim os radicais livres presentes no sistema cuja actividade é suprimida pela substância AH (Molyneux, 2004). Um parâmetro que tem vindo a ser introduzido recentemente para a interpretação dos resultados do método do DPPH é a “concentração eficiente” ou valor de EC_{50} (também denominado valor de IC_{50}). Este é definido como a concentração de substrato que provoca a perda de 50% da actividade do DPPH (cor) (Molyneux, 2004).

Um método utilizado para a determinação do poder redutor de amostras de produtos naturais fundamenta-se na capacidade que os compostos fenólicos possuem

para reduzir o Fe^{3+} a Fe^{2+} . Os antioxidantes presentes causam a redução do Fe^{3+} /complexo ferricianeto ($\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) à forma ferrosa (Fe^{2+}). Assim, em função do poder redutor das amostras, a coloração amarela da solução sofre alteração entre os tons de verde ou azul (Amarowicz *et al.*, 2004), o que pode ser medido espectrofotometricamente a 700 nm. Para determinar o poder redutor (ciclo redox) das substâncias testadas, estas são colocadas em contacto com um determinado metal responsável pela produção de radicais livres e, em alguns casos, pela regeneração dos antioxidantes:



Onde L é o ligante selectivo não ferroso cromogénico que produz a coloração (azul da prússia) da espécie $\text{Fe}^{2+} - \text{L}$ como resultado da reacção redox em questão; a espécie oxidante é $\text{Fe}^{3+} - \text{L}$ ou $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ (quando se utiliza ferricianeto como reagente) (Berker *et al.*, 2007).

A inibição da peroxidação lipídica é normalmente avaliada pela inibição da descoloração do β -caroteno (Fig. 2), neutralizando o radical livre linoleato bem como outros radicais livres originados no sistema, os quais atacam as moléculas insaturadas de β -caroteno. Este método baseia-se na descoloração competitiva do β -caroteno durante a auto-oxidação do ácido linoleico em emulsão aquosa monitorizada pelo decréscimo da absorvância na região do visível (Miller, 1971). A adição de uma amostra contendo antioxidantes individuais (von Gadov *et al.*, 1997) ou extractos naturais (Moure *et al.*, 2000) resulta no retardamento da descoloração do β -caroteno. Desta forma, a presença de diferentes antioxidantes pode retardar a extensão da descoloração do β -caroteno neutralizando o radical livre linoleato e outros radicais livres formados no sistema (Jayaprakasha *et al.*, 2001). Na ausência de antioxidantes a absorvância a 470 nm decresce rapidamente, enquanto na sua presença, a cor, e por conseguinte a absorvância, é retida por mais tempo (Oliveira *et al.*, 2008).

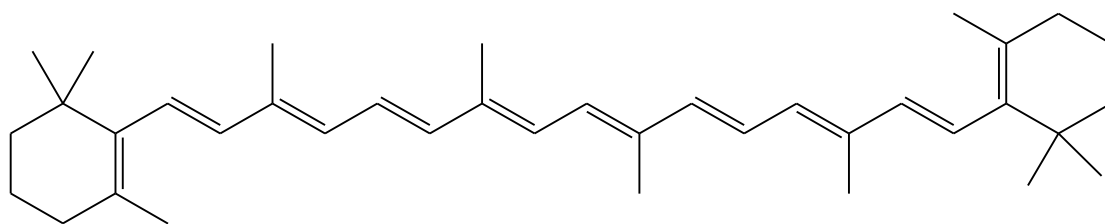
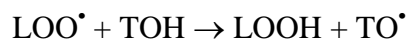


Figura 2. Estrutura da molécula de β -caroteno.

1.5. Compostos antioxidantes

Vitamina E é a designação geralmente dada a uma família de compostos quimicamente relacionados, denominados por tocoferóis e tocotrienóis, os quais partilham uma estrutura comum com um anel cromanol e uma cadeia lateral de unidades isopreno. Esta vitamina é constituída por oito compostos químicos: α -, β -, γ - e δ - tocoferóis e quatro tocotrienóis correspondentes (Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996).

Os tocoferóis (Fig. 3) têm sido reconhecidos como uns dos mais importantes antioxidantes. Eles inibem a produção de radicais peróxido lipídicos induzida por ROS, protegendo assim as células da peroxidação dos ácidos gordos polinsaturados (PUFA) na membrana fosfolipídica, de danos oxidativos das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), proteínas celulares e DNA, e da degeneração da membrana (Fang *et al.*, 2002). No processo de peroxidação lipídica, os tocoferóis (TOH) actuam como antioxidantes doando um átomo de hidrogénio aos radicais peróxido (LOO^\bullet) produzidos a partir dos PUFA originando um hidroperóxido lipídico estável (LOOH) e um radical tocoferoxilo (TO^\bullet), o qual reage com outros radicais peróxido ou tocoferoxilo formando produtos mais estáveis (Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996; Ferreira *et al.*, 2009).



Os tocoferóis também podem reagir com radicais alquoxi (LO^\bullet) formados no processo de propagação ($\text{LO}^\bullet + \text{TOH} \rightarrow \text{LOH} + \text{TO}^\bullet$), ou em casos muito especiais, quando o oxigénio está presente em pequenas quantidades e os hidroperóxidos estão presentes em quantidades desprezáveis, os tocoferóis podem reagir directamente com radicais alquilo L^\bullet ($\text{L}^\bullet + \text{TOH} \rightarrow \text{LH} + \text{TO}^\bullet$) (Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996).

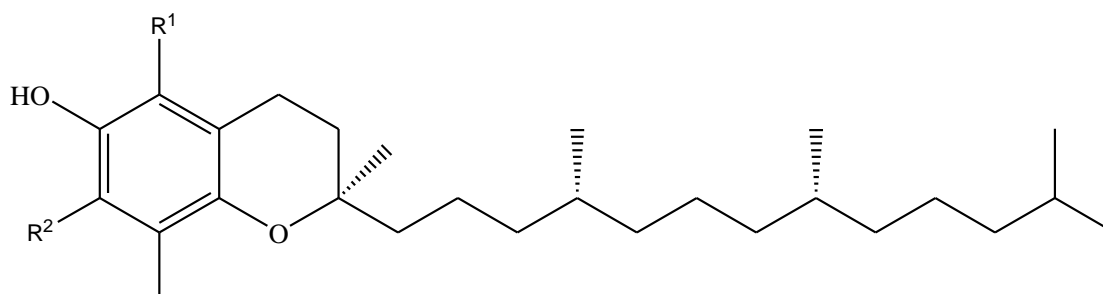
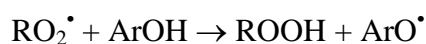


Figura 3. Estrutura química dos tocoferóis ($\text{R}^1=\text{R}^2=\text{Me}$, α -tocoferol; $\text{R}^1= \text{Me}$, $\text{R}^2=\text{H}$, β -tocoferol; $\text{R}^1=\text{H}$, $\text{R}^2=\text{Me}$, γ -tocoferol e $\text{R}^1=\text{R}^2=\text{H}$, δ -tocoferol).

No passado, o α -tocoferol era considerado a forma mais activa da vitamina E em humanos e foi demonstrado que possuía a actividade biológica mais elevada. Trabalhos recentes têm-se focado em tocoferóis sem grupos metilo como o γ -tocoferol. Sob condições específicas, o γ -tocoferol pode suprimir RNS de forma mais eficaz relativamente ao α -tocoferol e assim proporcionar benefícios especiais. Este composto possui também funções anti-inflamatória, antineoplásica e anti-diurética. Além disso, dados epidemiológicos recentes sugerem que o γ -tocoferol constitui um factor de risco mais negativo para alguns tipos de cancro e enfarte do miocárdio em relação ao α -tocoferol (Hensley *et al.*, 2004).

Os compostos fenólicos são compostos aromáticos hidroxilados, possuindo um ou mais anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxilo, sendo normalmente encontrados nos vegetais, frutos e muitas fontes de alimento que constituem uma porção significativa da nossa dieta, e alguns dos quais estão entre as substâncias bioactivas mais potentes e terapêuticas (Apak *et al.*, 2007). Estes compostos incluem diferentes sub-classes (flavonóides, ácidos fenólicos, lenhinas, taninos) exibindo uma grande diversidade de estruturas (Ferreira *et al.*, 2009). Os compostos fenólicos são produtos naturais derivados das vias do chiquimato e do acetato (metabolismo secundário) podendo compreender desde moléculas relativamente simples (ácidos fenólicos e flavonóides) até compostos altamente polimerizados (lenhinas, melaninas e taninos). Os flavonóides representam o sub-grupo mais comum e amplamente distribuído (Bravo, 1998). Porém, existem diversos estudos que referem os ácidos fenólicos como os principais compostos fenólicos em fungos, nomeadamente em cogumelos (Ferreira *et al.*, 2009).

A eficácia global de um antioxidante fenólico natural depende da reacção do hidrogénio fenólico, da estabilidade do radical formado durante a reacção e da substituição química presente na estrutura da molécula (Hall, 2001). O papel dos antioxidantes fenólicos (ArOH) é interromper a cadeia de reacções de acordo com a seguinte reacção:



Para ser eficaz, o ArO^\bullet deve ser um radical livre relativamente estável de forma a reagir lentamente como substrato RH, mas rapidamente com o substrato RO_2^\bullet , daí a designação “antioxidante que interrompe a cadeia” (Wright *et al.*, 2001). Os compostos fenólicos possuem uma elevada capacidade antioxidante, considerada a actividade

biológica responsável pelo efeito preventivo em algumas doenças de origem cardíaca e imunológicas (Echavarría *et al.*, 2009). A finalidade ou mecanismo destes compostos reside na sua capacidade para captar os radicais livres que se podem originar nas células e que são resultado da combinação de muitos factores ambientais, incluindo a poluição atmosférica (García *et al.*, 2000). Estes compostos podem desempenhar um papel importante na prevenção de doenças crónicas como doenças cardiovasculares, determinados tipos de cancro, doenças neurodegenerativas, e diabetes (Surh, 2003; Scalbert *et al.*, 2005).

1.6. Objectivos

O presente trabalho teve como principais objectivos:

- Estudar o desenvolvimento de duas espécies de fungos ectomicorrízicos, *Paxillus involutus* e *Pisolithus arhizus*, na presença e ausência de simbionte – *Pinus pinaster*.

- Avaliar as propriedades antioxidantes (efeito captador de radicais livres, poder redutor e inibição da peroxidação lipídica) e alguns compostos antioxidantes (tocoferóis e compostos fenólicos) de forma a:

(i) Comparar a concentração de tocoferóis e a actividade antioxidante dos fungos micorrízicos *in vivo* (corpos de frutificação) e *in vitro* (micélios), na ausência de simbionte.

(ii) Comparar o perfil fenólico e a actividade antioxidante dos fungos micorrízicos e das plantas germinadas *in vitro*, na presença e ausência do simbionte.

(iii) Avaliar o efeito do tempo de inoculação na actividade antioxidante dos fungos micorrízicos e plantas germinadas *in vitro*, na presença e ausência do simbionte.

As propriedades antioxidantes das amostras em estudo foram avaliadas por quatro métodos diferentes: determinação de fenóis totais pelo método *Folin-Ciocalteu*, actividade captadora de radicais DPPH (analisada pela capacidade de diminuição da absorvância a 515 nm da solução de DPPH), poder redutor (avaliado medindo a conversão do Fe^{3+} /complexo ferricianeto na sua forma ferrosa) e inibição da peroxidação lipídica pelo sistema β -caroteno/linoleato (verificada pela inibição da descoloração do β -caroteno, através da neutralização do radical livre linoleato e outros radicais formados no sistema que atacam as moléculas insaturadas de β -caroteno).

A composição em tocoferóis foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) acoplada a um detector de fluorescência. O perfil em compostos fenólicos foi determinado por HPLC acoplada a um detector de díodos (DAD).

II. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material biológico e preparação das amostras

2.1.1. Material biológico

As espécies de cogumelos silvestres *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. e *Pisolithus arhizus* (Scop.) Rauschert (Tabela 2), foram obtidas em soutos (*Castanea sativa* Mill.) na região de Bragança (Nordeste transmontano) no Outono de 2008. A identificação taxonómica dos esporocarpos foi realizada de acordo com Benguria (1985) e foram depositados exemplares no herbário da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança. As amostras dos corpos de frutificação foram liofilizadas (Ly-8-FM-ULE, Snijders) e reduzidas a pó.

As sementes de *Pinus pinaster* (Aiton) (Tabela 2) foram obtidas no CENASEF (Centro Nacional das Sementes Florestais, Portugal).

Tabela 2. Classificação sistemática das espécies em estudo.

Reino:	Fungi	Fungi	Plantae
Filo:	Basidiomycota	Basidiomycota	Pinophyta
Classe:	Agaricomycetes	Agaricomycetes	Pinopsida
Ordem:	Boletales	Sclerodermatineae	Pinales
Família:	Paxillaceae	Sclerodermataceae	Pinaceae
Género:	<i>Paxillus</i>	<i>Pisolithus</i>	<i>Pinus</i>
Espécies:	<i>Paxillus involutus</i> (Batsch ex Fr.) Fr.	<i>Pisolithus arhizus</i> (Scop.) Rauschert	<i>P. pinaster</i> (Aiton)

2.1.2. Produção *in vitro* do micélio e germinação *in vitro* de *Pinus pinaster*

O micélio, obtido a partir do esporocarpo de cada corpo de frutificação (Fig. 4), foi isolado em meio sólido Melin-Norkans modificado (MMNm; Tabela 3) pH 6,6 (Marx, 1969). As amostras foram mantidas em placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo o meio referido anteriormente e armazenadas à temperatura de 25°C no

escuro. Após 45 dias de crescimento do micélio, este foi retirado do meio e ambos, micélio e meio de cultura, foram posteriormente pesados de forma a obter o valor de biomassa fresca (fw). No ensaio de determinação de tocoferóis a biomassa foi seca a 30°C na estufa, durante 24 horas, de forma a expressar os resultados em massa seca (dw).

As sementes de *Pinus pinaster* foram germinadas em agar – água 0,9% em tubos de 30 mm de diâmetro, após lavagem em água corrente e desinfecção superficial em hipoclorito de sódio durante 10 minutos, várias lavagens com água estéril, breve passagem por peróxido de hidrogénio e lavagens posteriores novamente com água estéril. Após inoculação nos tubos, as sementes foram deixadas no escuro durante 48 horas a 25°C e passadas para a luz a partir daí, até à sua utilização nos ensaios de micorrização (Fig. 5).

Tabela 3. Composição do meio de cultura Melin-Norkans modificado; pH 6,6.

Composto	Concentração (g/L)
NaCl	0,025
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,250
KH ₂ PO ₄	0,500
FeCl ₃	0,005
CaCl ₂	0,050
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,150
Tiamina	1,00 × 10 ⁻⁴
Glucose	10,0
Agar	20,0

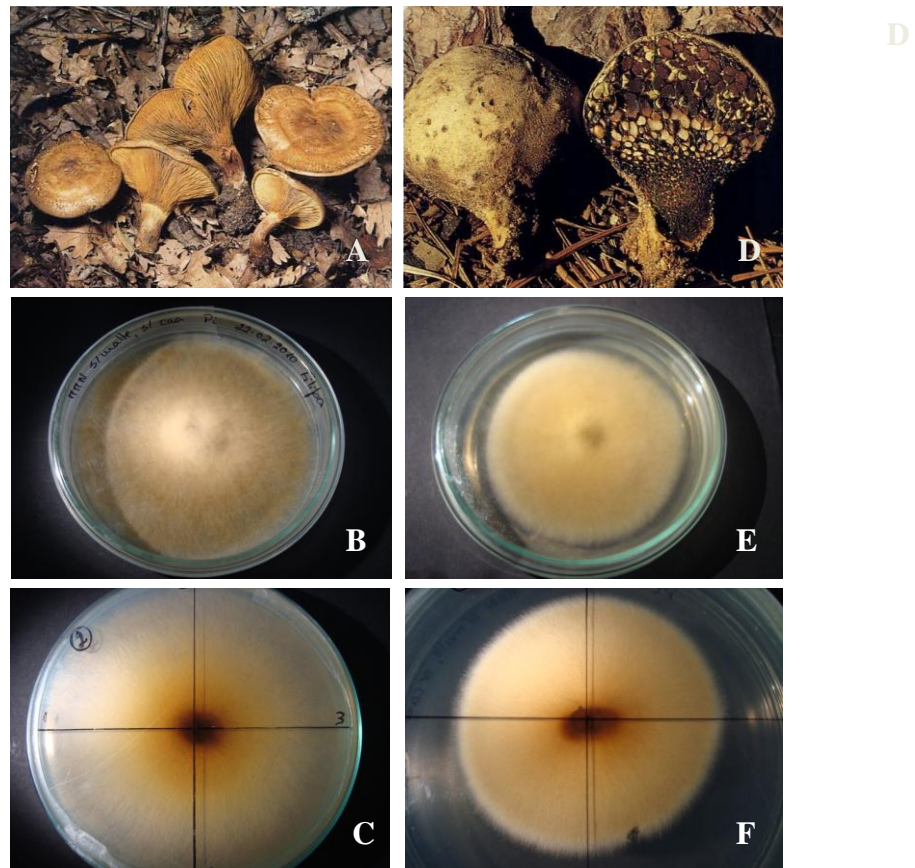


Figura 4. A – Corpos de frutificação de *Paxillus involutus* (Roody, 2003); B, C – Micélio de *Paxillus involutus*; D – Corpos de frutificação de *Pisolithus arhizus* (Metzler & Metzler, 1992); E, F – Micélio de *Pisolithus arhizus*.

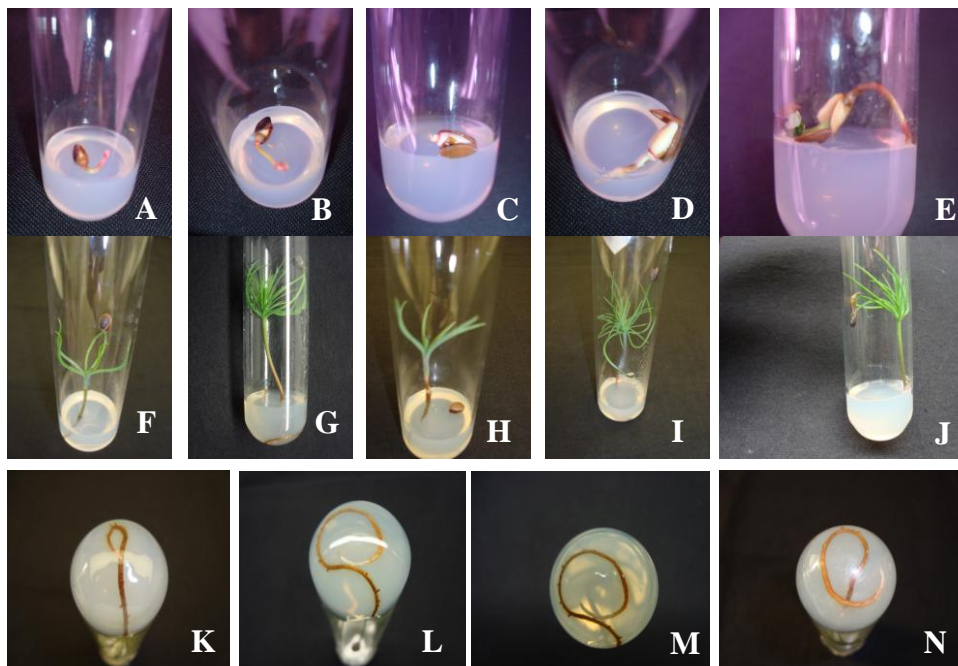


Figura 5. Germinação *in vitro* de sementes de *Pinus pinaster*, desde os momentos iniciais de abertura da semente (A – E) até à formação da planta completa: folhas, caules (F – J) e raízes (K – N).

2.1.3. Indução da simbiose micorrízica

A indução da simbiose micorrízica foi realizada em dois ensaios diferentes nos tempos de inoculação do fungo (Fig. 6). No primeiro (A), plantas e fungo foram inoculados em simultâneo, crescendo em co-cultura durante 45 dias. No segundo (B), o fungo foi inoculado previamente nas caixas de Petri, tendo-se deixado crescer durante 20 dias. Só nesta data foram inoculadas as plantas.

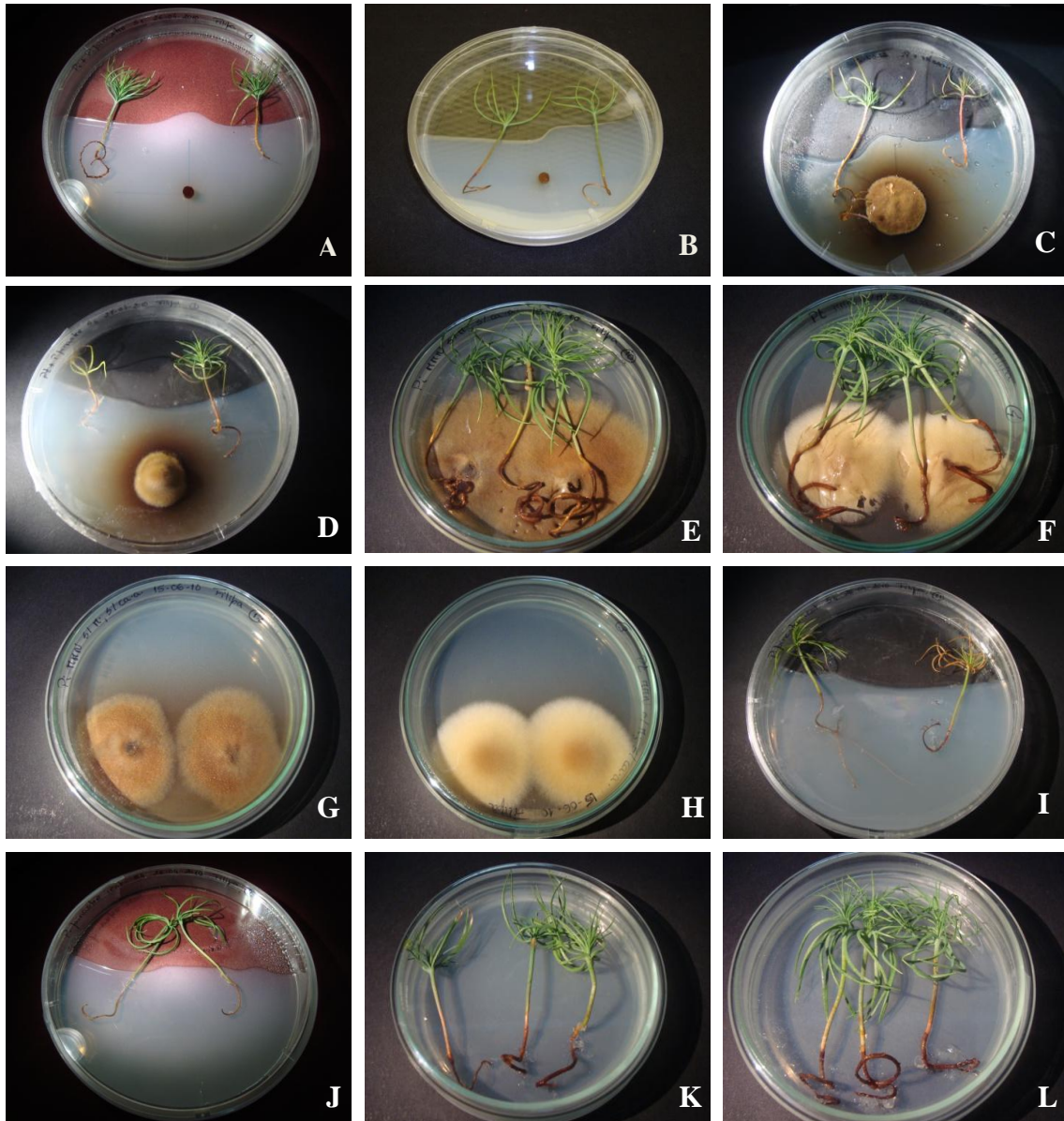


Figura 6. A – Ensaio (A), *Paxillus involutus* + *Pinus pinaster* no momento da inoculação; B – Ensaio (A), *Pisolithus arhizus* + *Pinus pinaster* no momento da inoculação; C – Ensaio (A), *Paxillus involutus* + *Pinus pinaster*; D – Ensaio (A), *Pisolithus arhizus* + *Pinus pinaster*; E – Ensaio (B), *Paxillus involutus* + *Pinus pinaster* (inoculação das plantas sobre os fungos, já em desenvolvimento, por um período de 20 dias em meio MMNm, promovendo-se a simbiose durante 48 horas); F – Ensaio (B), *Pisolithus arhizus* + *Pinus pinaster*; G – Ensaio (B), *Paxillus involutus* controlo; H – Ensaio (B), *Pisolithus arhizus* controlo; I, J – Ensaio (A), *Pinus pinaster* controlo, K, L – Ensaio (B), *Pinus pinaster* controlo.

- (A) As plantas de *Pinus pinaster* obtidas após germinação foram colocadas, duas a duas, em placas de Petri (13 cm de diâmetro) com meio de cultura MMNm e, no meio de ambas as plantas, foi inoculado o micélio das espécies *Paxillus involutus* ou *Pisolithus arhizus*. As plantas inoculadas foram incubadas durante 45 dias a 23°C/18°C durante os fotoperíodos de dia e noite (16h/8h), respectivamente, numa câmara de cultura com lâmpadas Daylight (Phillips), Gro-Lux (Sylvania). Após este período, o material foi retirado do meio e, plantas, micélio e meio de cultura, foram pesados frescos e armazenados a - 40 °C para posterior análise.
- (B) O outro ensaio foi realizado, colocando-se em placas de Petri (9 cm de diâmetro) dois inóculos de *Paxillus involutus* ou *Pisolithus arhizus* e deixando-os a crescer durante 20 dias. Após este período, foram colocadas sobre os inóculos, já desenvolvidos, plantas de *Pinus pinaster* (três plantas por placa) promovendo-se a simbiose, durante um período de 48 horas.

Para cada ensaio foram inoculadas placas de Petri apenas com *Paxillus involutus*, *Pisolithus arhizus* e *Pinus pinaster* que constituíam as amostras controlo.

2.2. Padrões e Reagentes

Os eluentes *n*-hexano 95%, acetato de etilo 99,98%, acetonitrilo 99,9%, grau HPLC, foram fornecidos pela Lab-Scan (Lisboa, Portugal). O solvente metanol, grau analítico, foi adquirido na Pronalab (Lisboa, Portugal). Os padrões utilizados na determinação de tocoferóis (α , β , γ e δ), compostos fenólicos (ácidos *p*-cumárico, *p*-hidroxibenzóico e protocatéquico), ácido cinâmico e nos ensaios da actividade antioxidante, trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) e ácido gálico, foram fornecidos pela Sigma (St. Louis, MO, EUA). O tocol racémico, 50 mg/mL, foi adquirido na Matreya (PA, USA). O 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) foi obtido na Alfa Aesar (Ward Hill, MA, EUA). Os restantes reagentes químicos foram adquiridos na Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). A água utilizada foi tratada com um sistema de purificação Milli-Q (TGI Pure Water Systems, EUA).

2.3. Determinação da actividade antioxidante

2.3.1. Preparação dos extractos

As amostras (~1,5 g de massa seca para os corpos de frutificação; ~ 0,5 g de massa fresca para o micélio e plantas; 20 – 50 g de massa fresca para os meios de cultura) foram submetidas a uma extracção líquido-sólido por agitação com 40 mL de metanol (25 °C a 150 rpm, em placa de agitação) durante 1 h e subsequentemente filtradas através de papel Whatman nº 4. O resíduo obtido foi depois extraído com 20 mL de metanol (25 °C a 150 rpm, em placa de agitação) durante 1 h. Os extractos metanólicos combinados foram evaporados a 40°C (evaporador rotativo Büchi R-210) e re-dissolvidos em metanol, de forma a obter uma concentração final conhecida (50 mg/mL para os extractos dos corpos de frutificação; 5 – 50 mg/mL para os extractos de micélio e plantas; 20 – 200 mg/mL para os extractos de meios de cultura). Posteriormente, foram preparadas várias concentrações dos extractos metanólicos, a partir da solução inicial. As amostras foram armazenadas a 4 °C até se proceder à sua análise.

2.3.2. Determinação de fenóis totais

Os fenóis totais presentes nos extractos metanólicos preparados foram estimados utilizando um método colorimétrico baseado no procedimento descrito por Wolfe *et al.* (2003) com algumas modificações. A uma alíquota de amostra (500 µL), adicionou-se o reagente *Folin-Ciocalteu* (2,5 mL, previamente diluído em água 1:9 v/v) e uma solução de carbonato de sódio (75 g/L; 2 mL). Homogeneizou-se a mistura no vórtex, durante 15 segundos e deixou-se repousar durante 30 min a 40 °C para desenvolvimento da cor. A absorvância foi medida a 765 nm (espectrofotómetro AnalytikJena 200). Na construção da curva padrão foi utilizado o ácido gálico (0,05 - 0,8 mM: $y = 1,9799x + 0,0299$; $R^2 = 0,9997$), e os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de extracto.

2.3.3. *Actividade captadora de radicais DPPH*

O efeito captador de radicais livres de DPPH foi monitorizado utilizando um Leitor de Microplacas ELX800 (Bio-Tek equipamento, Inc.). A mistura da reacção em cada um dos 96 poços consistiu nas diferentes concentrações dos extractos metanólicos (0,3 mL) às quais foram adicionados 270 μ L de uma solução metanólica de radicais DPPH (6×10^{-5} mol/L). A mistura foi colocada no escuro durante 60 minutos. A redução do radical DPPH foi determinada pela medição da absorvância a 515 nm. A actividade captadora do radical (ACR) foi calculada como percentagem de descoloração da solução de DPPH utilizando a equação: $\% \text{ ACR} = [(Abs_{DPPH} - Abs_S)/Abs_{DPPH}] \times 100$, onde Abs_S corresponde à absorvância da solução de DPPH na presença de extracto de cada concentração em particular, e o Abs_{DPPH} à absorvância da solução de DPPH. A concentração de extracto correspondente a 50% da actividade captadora de radicais (EC_{50}) foi calculada por interpolação gráfica da % ACR em função da concentração do extracto. O padrão utilizado foi o trolox.

2.3.4. *Poder redutor*

O poder redutor foi determinado utilizando o Leitor de Microplacas descrito anteriormente. As diferentes concentrações de extractos (0,5 mL) foram misturadas com tampão fosfato de sódio (0,2 mol/L, pH 6,6; 0,5 mL) e ferricianeto de potássio (1% m/v; 0,5 mL). A mistura foi incubada a 50°C durante 20 minutos. Após este período foi adicionado ácido tricloroacético (10%; 0,5 mL). A mistura (0,8 mL) foi colocada nos 48 poços juntamente com água desionizada (0,8 mL) e uma solução de cloreto férrico (0,1%; 0,16 mL) e a absorvância foi medida a 690 nm; as absorvâncias mais elevadas correspondem a um maior poder redutor. A concentração de extracto correspondente a uma absorvância de 0,5 (EC_{50}) foi calculada por interpolação gráfica da absorvância a 690 nm em função da concentração de extracto. O padrão utilizado foi o trolox.

2.3.5. Inibição da descoloração do β -caroteno

A actividade antioxidante dos extractos foi avaliada pelo sistema β -caroteno linoleato (Mi-Yae *et al.*, 2003). A solução de β -caroteno foi preparada por dissolução de β -caroteno (2 mg) em clorofórmio (10 mL) colocando-se 2 mL desta solução num balão perfurado de 100 mL. Depois da remoção do clorofórmio a 40°C sob vácuo, foram adicionados ácido linoleico (40 mg), emulsificador Tween® 80 (400 mg) e água destilada (100 mL) agitando-se vigorosamente. De seguida, transferiram-se alíquotas (4,8 mL) desta emulsão para diferentes tubos de ensaio contendo diferentes concentrações (0,2 mL) dos extractos. Logo após a adição da emulsão a cada tubo, foi medida a absorvância do tempo zero a 470 nm. Os tubos de ensaio foram agitados e incubados num banho a 50°C. A inibição da peroxidação lipídica foi calculada utilizando a seguinte equação: $[(Abs_{470} \text{ após } 2h / Abs_{470} \text{ inicial}) \times 100]$. A concentração de extracto correspondente a 50% da actividade antioxidante (EC_{50}) foi calculada por interpolação gráfica da percentagem de actividade antioxidante em função da concentração de extracto. Como padrão, foi utilizado o trolox.

2.4. Determinação de compostos antioxidantes

2.4.1. Determinação de tocoferóis

Os tocoferóis presentes nas amostras testadas foram determinados seguindo um protocolo previamente otimizado e descrito por Barros *et al.* (2008). A solução de BHT (2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol) em hexano (10 mg/mL; 100 μ L) e o padrão interno (PI) em hexano (tocol; 2,0 μ g/mL; 250 μ L) foram adicionados às amostras antes do procedimento de extracção. As amostras (~ 500 mg) foram homogeneizadas com metanol (4 mL) num vórtex (1 min). De seguida, adicionou-se hexano (4 mL) e homogeneizou-se novamente no vórtex durante 1 min. Posteriormente, adicionou-se uma solução aquosa saturada de NaCl (2 mL), homogeneizou-se a mistura (1 min), centrifugou-se (centrífuga refrigerada Centurion K24OR- 2003, 5 min, 6185 rpm) e transferiu-se, cuidadosamente, o sobrenadante para um frasco (*vial*). As amostras foram

re-extraídas mais duas vezes com hexano. Os extractos combinados foram secos numa corrente de azoto, re-dissolvidos em 1 mL de hexano, desidratados com sulfato de sódio anidro e filtrados através de um filtro (0,22 μm). Os filtrados foram transferidos para frascos de injeção (*vials*) âmbar e analisados por HPLC. O equipamento de HPLC utilizado consiste num sistema integrado com uma bomba Smartline 1000 (Knauer, Germany), um desgaseificador (Smartline 5000), um amostrador automático AS-2057 e um detector UV a 295 nm (Knauer, Germany) ligado em série com um detector de fluorescência FP-2020 (Jasco, Japan) programado para comprimentos de onda de excitação de 290 nm e emissão de 330 nm. Os resultados foram analisados utilizando o software Clarity 2.4 (DataApex). A separação cromatográfica foi feita com uma coluna de poliamida II (250 \times 4,6 mm) de fase normal (YMC Waters, Japão) a operar a 30°C (forno 7971 R Grace). A fase móvel utilizada consistiu numa mistura de *n*-hexano e acetato de etilo (70:30, v/v) com um fluxo de 1 mL/min e o volume de injeção foi de 20 μL . Os compostos foram identificados através de comparação cromatográfica com padrões comerciais. A quantificação foi baseada na resposta do sinal fluorescente, utilizando o método do padrão interno. A quantidade de tocoferóis presente nas amostras foi expressa em microgramas por grama de massa seca.

2.4.2. Determinação de compostos fenólicos

2.4.2.1. Preparação dos extractos

Cada amostra (~ 0,5 g de massa fresca para o micélio e plantas; 20 – 50 g de massa fresca para os meios de cultura) foi extraída como referido anteriormente na secção 2.3.1. Os extractos metanólicos combinados foram evaporados a 40°C e re-dissolvidos em água:metanol (80:20, v/v).

2.4.2.2. Análise dos compostos fenólicos

Os extractos fenólicos foram filtrados (0,22 μm) e analisados por HPLC (Cromatógrafo Hewlett-Packard 1100, Agilent Technologies) segundo o procedimento descrito por Barros *et al.* (2009). A separação foi conseguida através de uma coluna de

fase reversa C18, Spherisorb ODS-2 (Waters) (3 μm , 150 \times 4.6 mm) termostaticada a 25°C. Os solventes utilizados foram: (A) 2,5 % de ácido acético em água, (B) 2,5% de ácido acético:acetonitrilo (90:10, v/v) e (C) 100% de acetonitrilo. O gradiente aplicado foi: isocrático 100% A durante 10 min, 50% A e 50% B durante 10 min, isocrático 100% B durante 15 min, 90% B e 10% C durante 10 min, 70% B e 30% C durante 10 min, 50% B e 50% C durante 5 min, 20% B e 80% C durante 5 min, 100% A durante 5 min, a uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min. O perfil em compostos fenólicos foi determinado por HPLC acoplado a um detector de díodos (DAD) utilizando como comprimento de onda preferencial, 280 nm. Os compostos fenólicos foram quantificados por comparação da área dos seus picos, registados a 280 nm, com as curvas de calibração obtidas de padrões comerciais de cada composto. Os resultados foram expressos em microgramas por grama de extracto.

2.5. Análise estatística

Para cada uma das espécies de fungos e plantas, analisaram-se três amostras e fizeram-se todos os ensaios em triplicado. Os resultados foram expressos em valores médios \pm desvio padrão (SD). Os resultados foram analisados utilizando uma análise de variância (ANOVA) seguida de um teste de Tukey com $\alpha = 0,05$. Este tratamento foi levado a cabo utilizando o software SPSS v.16.0. Os resultados da ANOVA foram classificados utilizando letras (diferentes letras indicam diferenças significativas entre resultados). As letras estão ordenadas alfabeticamente de acordo com a diminuição dos valores dos resultados (ex. a letra “a” representa o melhor resultado para a concentração de antioxidantes e o pior resultado para os testes de actividade antioxidante).

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Crescimento do material biológico

Os fungos produzem uma vasta gama de metabolitos secundários, alguns dos quais importantes para a indústria (Ghorai *et al.*, 2009). Cogumelos com impacto medicinal são utilizados para produtos nutracêuticos e farmacêuticos (Kidd, 2000; Wasser & Weiss, 1999). Por exemplo, devido à sua elevada tolerância e compatibilidade com a quimioterapia e radioterapia os produtos obtidos dos cogumelos são utilizados para terapias de cancro. Os corpos de frutificação dos fungos e os seus extractos são utilizados de forma eficaz e são também uma opção economicamente exequível devido ao desenvolvimento rápido do corpo de frutificação ou do micélio (Ghorai *et al.*, 2009).

Uma vez que os fungos são bastante influenciados pelas condições ambientais, como temperatura e humidade, torna-se cada vez mais importante a sua produção *in vitro* sob condições definidas de forma a superar este entrave e a obter em larga escala compostos bioactivos com elevada importância nutracêutica e/ou farmacêutica.

O crescimento dos fungos *Paxillus involutus* e *Pisolithus arhizus*, isolados a partir dos esporocarpos dos respectivos corpos de frutificação, foi avaliado ao longo do período de inoculação anterior à análise química, obtendo-se os resultados apresentados na Fig. 7.

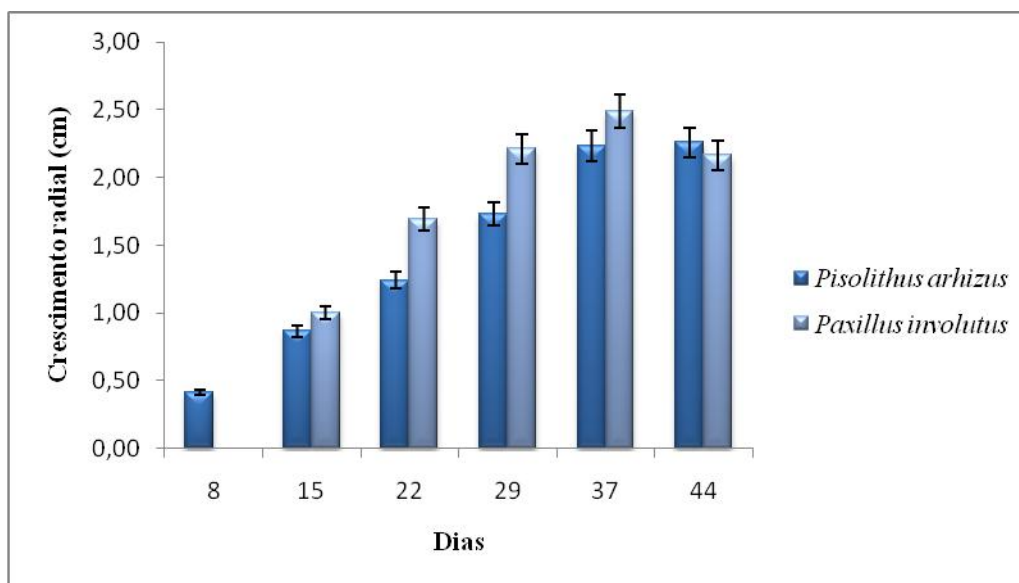


Figura 7. Média do crescimento radial dos fungos *Paxillus involutus* e *Pisolithus arhizus* isolados em meio de cultura MMNm, ao longo do período de inoculação.

Em virtude da grande variabilidade fisiológica e morfológica existente entre os fungos ectomicorrízicos, é possível esperar variações no seu comportamento durante o estabelecimento da simbiose, provocando respostas nas plantas que variam desde uma simbiose bastante eficiente até à ausência de efeitos ou a ocorrência de efeitos deletérios no crescimento (Harley & Smith, 1983). Embora existam poucas evidências de especificidade entre plantas hospedeiras e fungos micorrízicos, verifica-se que pode existir uma maior ou menor compatibilidade nas interações ectomicorrízicas (Baptista *et al.*, 1999). Não se sabe ainda em que momento ocorre o reconhecimento entre os simbiontes e a determinação da incompatibilidade ou compatibilidade da simbiose ectomicorrízica, mas, provavelmente, os estádios iniciais da interação são os passos principais para o desenvolvimento de uma simbiose eficiente (Malajczuk *et al.*, 1990).

A especificidade entre fungos micorrízicos e plantas hospedeiras tem sido verificada no campo (Molina & Trappe, 1984; Molina *et al.*, 1992) e sob condições controladas (Malajczuk *et al.*, 1984; Oliveira *et al.*, 1994, Voigt *et al.*, 2000). O conhecimento dos mecanismos que controlam este fenómeno torna-se importante para compreender o funcionamento da micorrização e para ajudar na selecção dos isolados em programas de inoculação (Voigt *et al.*, 2000).

Os resultados do acompanhamento do desenvolvimento dos fungos *Paxillus involutus* e *Pisolithus arhizus* inoculados na presença de *Pinus pinaster* encontram-se representados na Fig. 8.

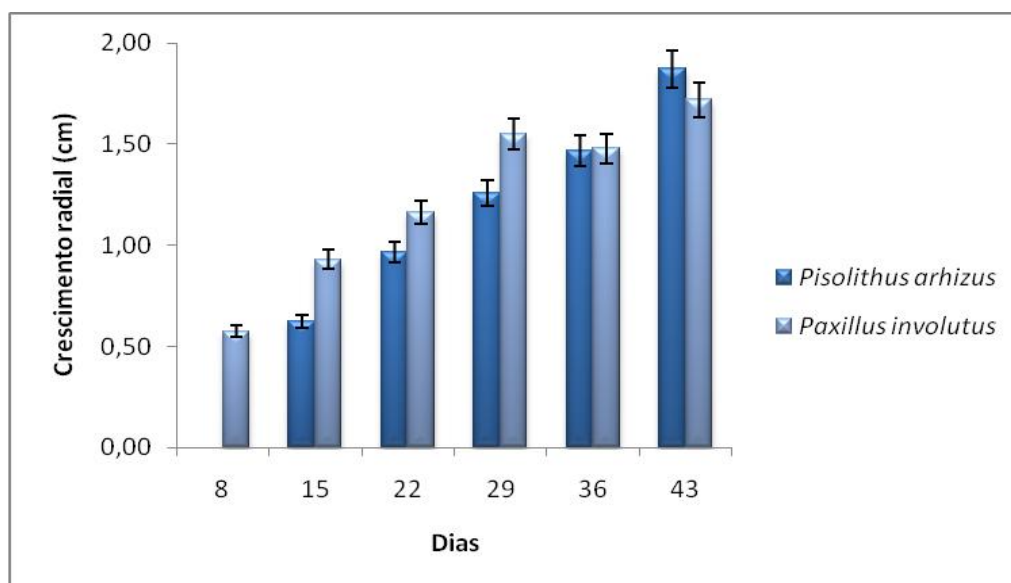


Figura 8. Média do crescimento radial dos fungos *Paxillus involutus* e *Pisolithus arhizus* que cresceram juntamente com *Pinus pinaster* em meio de cultura MMNm, ao longo do período de inoculação.

Através da análise dos resultados obtidos (Fig. 7 e Fig. 8) podemos observar que os micélios dos fungos *Paxillus involutus* e *Pisolithus arhizus* quando isolados em meio de cultura Melin-Norkans modificado possuem um crescimento bastante diferente relativamente à sua inoculação no mesmo meio de cultura juntamente com *Pinus pinaster*.

O fungo *Paxillus involutus* inicia o seu crescimento mais tarde relativamente ao fungo *Pisolithus arhizus* (8 dias depois) possuindo, no entanto, um crescimento radial superior ao longo de 37 dias. O mesmo não se verifica quando inoculamos os mesmos fungos na presença de *Pinus pinaster*. Neste caso, é o fungo *Paxillus involutus* que inicia o seu crescimento mais cedo, sendo a espécie que possui, tal como no caso anterior, um crescimento superior (ao longo de 36 dias). Após 43 dias, observamos o inverso.

Comparando ambos os crescimentos, na presença e ausência de simbionte, podemos afirmar que ambas as espécies de fungos possuem um crescimento radial inferior quando na presença de *Pinus pinaster* comparativamente com o seu crescimento quando isolados. Estes resultados podem sustentar outros estudos que referem efeitos tóxicos de compostos fenólicos solúveis de baixo peso molecular, como ácidos fenólicos, a uma variedade de fungos (Christie, 1965; Haars *et al.*, 1981; Wacker *et al.*, 1990) e, neste caso, a fungos ectomicorrízicos.

Podemos concluir assim, que ao longo de 43 dias de crescimento, o fungo *Paxillus involutus* possui um crescimento radial superior ao do *Pisolithus arhizus* sendo, desta forma, mais rápida a sua obtenção *in vitro*. No entanto, o fungo *Pisolithus arhizus* parece adaptar-se melhor quando na presença de *Pinus pinaster*, uma vez que, embora possua um crescimento tardio, com o passar do tempo mantém valores crescentes de desenvolvimento. Com isto, podemos afirmar que para a obtenção de maiores quantidades de micélio, por exemplo para produção de determinados compostos *in vitro*, o fungo *Paxillus involutus* é o mais promissor; porém, para um processo de micorrização com *Pinus pinaster*, o fungo *Pisolithus arhizus* parece constituir um simbionte preferível.

3.2. Actividade antioxidante e compostos antioxidantes em fungos micorrízicos e plantas germinadas *in vitro* na presença e ausência do simbionte

*3.2.1. Produção de tocoferóis e actividade antioxidante dos fungos micorrízicos *in vivo* (corpos de frutificação) e *in vitro* (micélios), na ausência de simbionte*

Como referido anteriormente, os corpos de frutificação e os micélios das espécies *Paxillus involutus* e *Pisolithus arhizus* foram analisados e a quantidade de tocoferóis e a actividade antioxidante foram determinados e comparados entre si.

A Tabela 4 apresenta a composição em tocoferóis dos corpos de frutificação, micélios e meios de cultura das espécies referidas.

Tabela 4. Composição em tocoferóis ($\mu\text{g/g dw}$) das amostras de carpóforos, micélios e meios de cultura das espécies *Paxillus involutus* e *Pisolithus arhizus*; média \pm SD ($n = 9$). Em cada coluna, letras diferentes representam diferenças significativas entre os resultados ($p < 0,05$).

Espécies	Amostras	α -tocoferol	β -tocoferol	γ -tocoferol	δ -tocoferol	Total ($\mu\text{g/g dw}$)
<i>Paxillus involutus</i>	Carpóforo	0,15 \pm 0,01 dc	0,30 \pm 0,05 f	4,27 \pm 0,25 cd	0,29 \pm 0,02 cb	5,02 \pm 0,19 c
	Micélio	0,72 \pm 0,14 b	6,18 \pm 0,08 a	9,82 \pm 1,40 b	1,42 \pm 0,01 a	18,15 \pm 1,30 b
	Meio de cultura	0,03 \pm 0,00 d	0,62 \pm 0,05 e	0,39 \pm 0,04 c	0,56 \pm 0,03 b	1,60 \pm 0,12 c
<i>Pisolithus arhizus</i>	Carpóforo	2,11 \pm 0,04 a	2,39 \pm 0,33 b	1,67 \pm 0,01 cd	1,68 \pm 0,09 a	7,84 \pm 0,45 c
	Micélio	0,17 \pm 0,03 c	1,83 \pm 0,06 c	154,39 \pm 10,82 a	1,55 \pm 0,40 a	157,94 \pm 10,45 a
	Meio de cultura	0,06 \pm 0,00 dc	1,28 \pm 0,03 d	7,71 \pm 0,26 cb	0,22 \pm 0,01 c	9,28 \pm 0,29 c

A espécie *Pisolithus arhizus*, particularmente o micélio (157,94 $\mu\text{g/g dw}$), revela uma composição em tocoferóis superior à espécie *Paxillus involutus* (18,15 $\mu\text{g/g dw}$) mostrando uma composição em tocoferóis totais superior a esta última devido à sua contribuição significativa em γ -tocoferol (154,39 $\mu\text{g/g dw}$) (Fig. 9). Para ambas as espécies, as amostras de micélio evidenciam uma maior concentração de tocoferóis totais relativamente aos corpos de frutificação e respectivos meios de cultura. Os níveis mais elevados de α -tocoferol são detectados no corpo de frutificação da espécie *Pisolithus arhizus*, enquanto os níveis mais elevados de β -tocoferol são encontrados no micélio da espécie *Paxillus involutus*. O γ -tocoferol é encontrado maioritariamente no micélio da espécie *Pisolithus arhizus* e o δ -tocoferol no corpo de frutificação e micélio da mesma espécie e no micélio da espécie *Paxillus involutus*. Os vitâmeros predominantes são o γ -tocoferol (corpo de frutificação e micélio da espécie *Paxillus involutus* e micélio e meio de cultura da espécie *Pisolithus arhizus*) e o β -tocoferol (meio de cultura da espécie *Paxillus involutus* e corpo de frutificação da espécie *Pisolithus arhizus*).

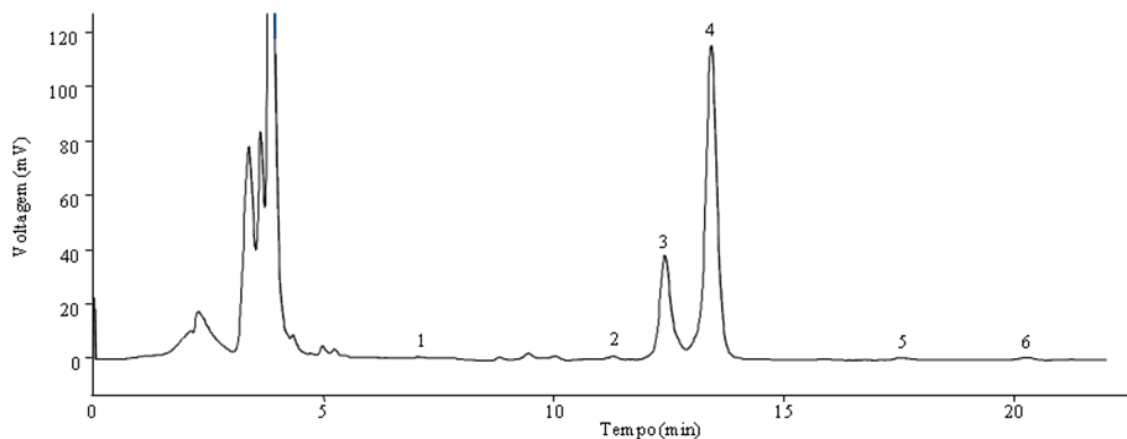


Figura 9. Cromatograma individual de tocoferóis da espécie *Pisolithus arhizus* (micélio). Picos: 1) α -tocoferol ($R^1=R^2=CH_3$); 2) β -tocoferol ($R^1=CH_3$, $R^2=H$); 3) BHT (hidroxitolueno butilado); 4) γ -tocoferol ($R^1=H$, $R^2=CH_3$); 5) δ -tocoferol ($R^1=R^2=H$); 6) P.I.- padrão interno (tocol).

Concluimos, desta forma, que os resultados obtidos neste trabalho possuem elevada relevância, uma vez que o micélio da espécie *Pisolithus arhizus* demonstrou ser uma poderosa fonte de γ -tocoferol, um dos mais importantes vitâmeros da vitamina E.

Os resultados da actividade antioxidante estão representados na Fig. 10, observando-se um aumento das propriedades antioxidantes com o aumento da concentração de extracto. Para complementar estes resultados, a Tabela 5 apresenta os rendimentos de extracção, composição em fenóis e actividade antioxidante das mesmas amostras (corpos de frutificação, micélios e meios de cultura das espécies *Paxillus involutus* e *Pisolithus arhizus*).

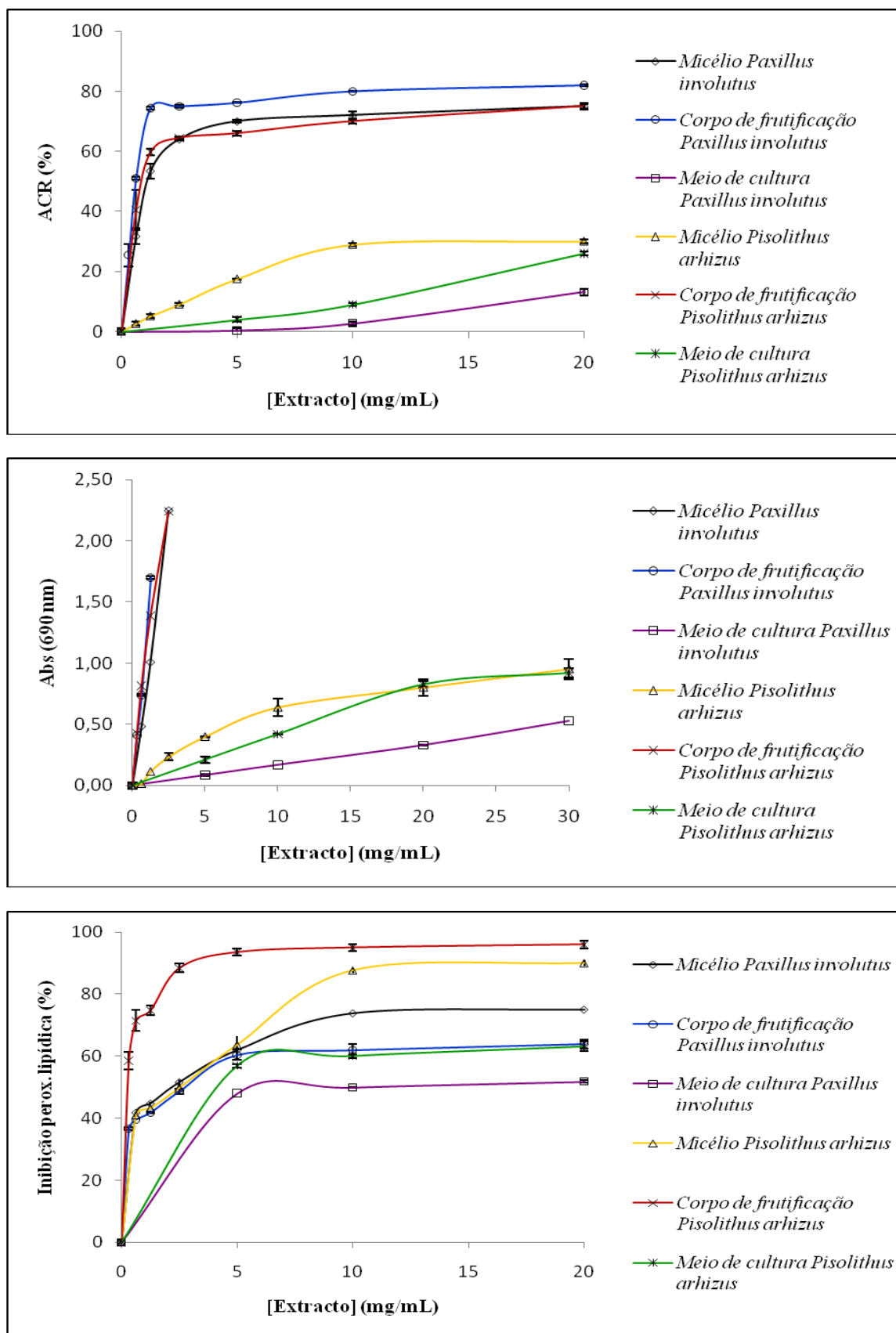


Figura 10. Actividade captadora de radicais DPPH, poder redutor e capacidade de inibição da peroxidação lipídica das amostras de corpos de frutificação (carpóforos), micélios e meios de cultura das espécies *Paxillus involutus* e *Pisolithus arhizus* (média \pm SD; n = 9).

Tabela 5. Rendimentos de extracção (%), composição em fenóis (mg EAG/g extracto) e actividade antioxidante (valores de EC₅₀, mg/mL); média ± SD (n = 9). Em cada coluna, letras diferentes representam diferenças significativas entre os resultados (p < 0,05).

Espécies	Amostras	Rendimentos de extracção	Fenóis totais	Actividade captadora de radicais DPPH	Poder redutor	Inibição descoloração β-caroteno
<i>Paxillus involutus</i>	Carpóforo	34,24	78,92 ± 4,47 b	0,61 ± 0,01 c	0,39 ± 0,00 e	0,40 ± 0,00 d
	Micélio	16,28	59,47 ± 3,37 c	1,15 ± 0,07 b	0,65 ± 0,03 d	2,21 ± 0,12 c
	Meio de cultura	2,27	1,01 ± 0,07 e	> 20,00 a	28,56 ± 0,12 a	9,85 ± 0,93 a
<i>Pisolithus arhizus</i>	Carpóforo	20,14	297,94 ± 0,30 a	0,56 ± 0,01 d	0,37 ± 0,03 e	0,24 ± 0,03 d
	Micélio	24,94	9,48 ± 0,67 d	> 20,00 a	7,29 ± 0,62 c	2,49 ± 0,18 c
	Meio de cultura	0,95	2,36 ± 0,07 e	> 20,00 a	11,97 ± 0,01 b	4,39 ± 0,05 b

Todas as amostras revelam propriedades antioxidantes mas segundo a ordem carpóforo > micélio > meio de cultura (Tabela 5). Os corpos de frutificação da espécie *Paxillus involutus* evidenciam a maior actividade captadora de radicais (82% para uma concentração de 20 mg/mL; Fig. 10). No entanto, são os corpos de frutificação da espécie *Pisolithus arhizus* que revelam um maior teor em fenóis (297,94 mg EAG/g extracto) e o valor de EC₅₀ mais baixo (0,56 mg/mL; Tabela 5).

Para o poder redutor, o micélio da espécie *Paxillus involutus* evidencia o maior valor de absorvância para uma concentração de extracto de 1,25 mg/mL (1,7; Fig. 10). As amostras dos corpos de frutificação de ambas as espécies são as que revelam um menor valor de EC₅₀ sem diferenças estatísticas significativas (Tabela 5). Os corpos de frutificação da espécie *Pisolithus arhizus* apresentam a maior percentagem de inibição da peroxidação lipídica (96% para uma concentração de extracto de 20 mg/mL; Fig. 10) apresentando também os valores de EC₅₀ mais baixos sem diferenças estatísticas significativas relativamente às amostras de corpos de frutificação da espécie *Paxillus involutus* (Tabela 5).

Deste modo, podemos concluir que relativamente às amostras dos corpos de frutificação e meios de cultura, a espécie *Pisolithus arhizus* revela níveis mais elevados de actividade antioxidante; quanto às amostras de micélio, é a espécie *Paxillus involutus* que demonstra maior potencial. Em suma, os corpos de frutificação parecem ter

propriedades antioxidantes superiores, incluindo actividade captadora de radicais livres e capacidade de inibição da peroxidação lipídica, relativamente às culturas de micélio produzidas *in vitro*. Todavia, o micélio produz níveis superiores de tocoferóis totais comparativamente com os corpos de frutificação, e particularmente o micélio da espécie *Pisolithus arhizus* provou ser uma potencial fonte de γ -tocoferol.

3.2.2 Perfil fenólico e actividade antioxidante dos fungos micorrízicos e das plantas germinadas na presença e ausência do simbiote

As propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos desempenham um papel vital nos mecanismos de defesa dos organismos (Macheix & Fleuriert, 1998). A finalidade ou mecanismo destas moléculas reside na sua capacidade de captar os radicais livres que se originam nas células e que são o resultado de diversos factores ambientais, incluindo a poluição atmosférica (Echavarría *et al.*, 2009).

Como referido anteriormente, vários estudos mencionaram os ácidos fenólicos como os principais compostos fenólicos encontrados em cogumelos. Estes ácidos podem ser divididos em dois grupos principais, ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos, derivados do ácido benzóico e cinâmico respectivamente (Ferreira *et al.*, 2009).

Neste ensaio, os principais ácidos fenólicos e compostos relacionados anteriormente identificados em cogumelos silvestres – ácidos protocatéquico, *p*-hidroxibenzóico, *p*-cumárico e cinâmico – foram quantificados nos micélios das espécies *Paxillus involutus* e *Pisolithus arhizus* e nas plantas de *Pinus pinaster* na presença e ausência de simbiote, de forma a reproduzir as associações *in vivo* entre fungos ectomicorrízicos e plantas hospedeiras e a comparar a concentração de compostos fenólicos e propriedades antioxidantes quando isolados e em simbiose (Tabela 6).

Analisando a presença dos ácidos fenólicos referidos anteriormente no fungo *Paxillus involutus*, verificamos que o ácido protocatéquico apenas é detectado no micélio que cresceu isolado. Exceptuando este composto, os níveis dos restantes três ácidos investigados, são similares (sem diferenças estatísticas significativas; $p < 0,05$)

na presença e na ausência de simbionte. Já os ácidos *p*-cumárico e cinâmico não são detectados nesta espécie (Tabela 6).

Tabela 6. Ácidos fenólicos e compostos relacionados ($\mu\text{g/g}$ de extracto) das amostras de *Paxillus involutus*, *Pisolithus arhizus* e *Pinus pinaster* após 45 dias de crescimento, em meio de cultura MMNm, na ausência e presença de simbionte (média \pm SD; $n = 9$). Em cada coluna, letras diferentes representam diferenças significativas entre os resultados ($p < 0,05$).

Espécies	Amostras	Ácido protocatéquico	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	Ácido <i>p</i> -cumárico	Ácido cinâmico
<i>Paxillus involutus</i>	Micélio	25,98 \pm 0,38	33,67 \pm 0,43 c	nd	nd
	Meio de cultura	nd	22,90 \pm 3,32 d	nd	nd
<i>Pisolithus arhizus</i>	Micélio	nd	27,83 \pm 1,40 c	nd	nd
	Meio de cultura	nd	14,07 \pm 1,05 e	nd	nd
<i>Pinus pinaster</i>	Raíz	nd	51,02 \pm 6,01 b	99,73 \pm 1,29 a	19,70 \pm 0,24 c
<i>Paxillus involutus</i> + <i>Pinus pinaster</i>	Micélio	nd	28,16 \pm 0,59 c	nd	nd
	Raíz	nd	80,70 \pm 5,84 a	85,29 \pm 0,12 b	110,95 \pm 1,48 a
<i>Pisolithus arhizus</i> + <i>Pinus pinaster</i>	Micélio	nd	nd	58,98 \pm 0,32 c	10,85 \pm 0,08 d
	Raíz	nd	45,26 \pm 1,49 b	nd	30,50 \pm 0,02 b

*nd – não detectado

Em relação à espécie *Pisolithus arhizus*, também o ácido protocatéquico não é detectado, quer na presença quer na ausência de simbionte. O ácido *p*-hidroxibenzóico não é encontrado quando em associação, mas as concentrações de ácido *p*-cumárico e cinâmico aumentam quando o fungo se desenvolve na presença de *Pinus pinaster* (58,98 e 10,85 $\mu\text{g/g}$ de extracto, respectivamente) uma vez que na sua ausência não são detectados (Tabela 6).

As raízes de *Pinus pinaster*, quando em simbiose com ambas as espécies ectomicorrízicas, revelam níveis de ácido cinâmico superiores e níveis inferiores de ácido *p*-cumárico relativamente aos níveis detectados na ausência de simbionte. A concentração de ácido *p*-hidroxibenzóico aumenta apenas na presença de *Paxillus involutus* (80,70 $\mu\text{g/g}$ de extracto) (Tabela 6).

Outros autores detectaram uma menor concentração de compostos fenólicos solúveis (ex. glucósido de ácido *p*-hidroxibenzóico e catequina) e ligados à parede celular (ex. ácido ferúlico) em micorrizas de *Picea abies*, *Larix decidua* e *Pinus*

sylvestris, relativamente a raízes não inoculadas (Münzenberger *et al.*, 1990, 1995, 2003). Contudo, no presente trabalho, isto apenas foi verificado nos níveis de ácido *p*-cumárico.

A fim de compreender os efeitos da presença de raízes de *Pinus pinaster* nas propriedades antioxidantes dos micélios das espécies ectomicorrízicas em estudo foram realizados também os testes da actividade captadora de radicais livres DPPH, poder redutor e inibição da descoloração de β -caroteno. Os resultados estão apresentados na Tabela 7.

Como referido anteriormente, embora o teste de *Folin-Ciocalteu* não tenha como finalidade a caracterização da actividade antioxidante, parece ser um dos melhores métodos para uma estimativa aproximada desta. Assim, os resultados obtidos através deste ensaio foram comparados com os dados resultantes da actividade antioxidante (Tabela 7).

Tabela 7. Rendimentos de extracção (%), composição em fenóis (mg EAG/g extracto) e actividade antioxidante (valores de EC50, mg/mL) das amostras de *Paxillus involutus*, *Pisolithus arhizus* e *Pinus pinaster* após 45 dias de crescimento, em meio de cultura MMNm, na ausência e presença de simbionte (média \pm SD; n = 9). Em cada coluna, letras diferentes representam diferenças significativas entre os resultados ($p < 0,05$).

Espécies	Amostras	Rendimentos de extracção	Fenóis totais	Actividade captadora de radicais DPPH	Poder redutor	Inibição descoloração β -caroteno
<i>Paxillus involutus</i>	Micélio	16,28	59,47 \pm 3,37 b	1,15 \pm 0,07 e	0,65 \pm 0,03 h	2,21 \pm 0,12 d
	Meio de cultura	2,27	1,01 \pm 0,07 e	99,62 \pm 16,78 a	28,56 \pm 0,12 a	9,85 \pm 0,93 b
<i>Pisolithus arhizus</i>	Micélio	24,94	9,48 \pm 0,67 d	17,29 \pm 0,29 dc	7,29 \pm 0,62 d	2,49 \pm 0,18 d
	Meio de cultura	0,95	2,36 \pm 0,07 e	38,56 \pm 1,09 b	11,97 \pm 0,01 b	4,39 \pm 0,05 c
<i>Pinus pinaster</i>	Raíz	23,43	23,24 \pm 0,59 c	3,95 \pm 0,28 e	1,47 \pm 0,06 f	2,26 \pm 0,15 d
<i>Paxillus involutus</i> + <i>Pinus pinaster</i>	Micélio	12,66	71,27 \pm 6,49 a	3,54 \pm 0,05 e	0,98 \pm 0,02 g	0,56 \pm 0,00 e
	Raíz	26,38	10,56 \pm 0,56 d	9,11 \pm 0,66 de	2,96 \pm 0,05 e	0,48 \pm 0,00 e
<i>Pisolithus arhizus</i> + <i>Pinus pinaster</i>	Micélio	65,58	8,61 \pm 0,38 d	19,26 \pm 1,03 c	9,79 \pm 0,42 c	26,99 \pm 1,94 a
	Raíz	25,74	11,06 \pm 0,84 d	5,27 \pm 0,14 e	2,79 \pm 0,01 e	0,59 \pm 0,00 e

A concentração de fenóis totais aumenta no micélio da espécie *Paxillus involutus* quando na presença de *Pinus pinaster*. Por sua vez, a presença das raízes da planta, não causam efeitos significativos na concentração de fenóis no micélio do fungo *Pisolithus arhizus*. Relativamente às plantas de *Pinus pinaster* podemos concluir que o teor em fenóis totais é superior quando esta se encontra isolada comparativamente com o teor observado quando na presença dos fungos micorrízicos (Tabela 7). Desta forma, podemos concluir que a presença das espécies ectomicorrízicas *Paxillus involutus* e *Pisolithus arhizus* parece ser benéfica para a espécie *Pinus pinaster* uma vez que a concentração de fenóis diminui nas raízes desta quando na presença dos simbiontes, ou seja, sugere um decréscimo no stresse oxidativo da planta. Mais uma vez, verificamos também, uma maior compatibilidade entre a espécie *Pisolithus arhizus* e a planta em estudo, uma vez que na presença desta, não se observa um aumento significativo na concentração destes compostos por parte do fungo, efeito este observado na espécie *Paxillus involutus*.

Analisando os resultados das propriedades antioxidantes das amostras controlo, para o ensaio com *Paxillus involutus*, podemos concluir que o micélio desta espécie e as raízes de *Pinus pinaster* revelam actividade captadora de radicais DPPH similar (valores de EC₅₀ sem diferenças estatísticas significativas; $p < 0,05$), e muito superior à revelada pelo meio de cultura onde o fungo se desenvolveu. Podemos observar também que os resultados obtidos na raíz de *Pinus pinaster* e no micélio de *Paxillus involutus* são similares na presença e na ausência de simbiote. Deste modo, não há efeitos significativos na actividade captadora de radicais quer no fungo, quer na planta (Tabela 7). Para o ensaio com *Pisolithus arhizus*, podemos verificar que as raízes de *Pinus pinaster* possuem igualmente uma actividade captadora de radicais superior ao fungo e ao meio de cultura de onde este foi retirado (valor de EC₅₀ mais baixo). Podemos ainda concluir que, quando em simbiose, o efeito captador destas espécies não varia muito comparado com o efeito observado quando crescem isolados (Tabela 7).

Analisando o poder redutor das espécies, para o ensaio com *Paxillus involutus*, podemos concluir que o micélio deste revela os valores mais baixos de EC₅₀, seguido da raíz de *Pinus pinaster* e do meio de cultura onde o primeiro se desenvolveu, ou seja, a espécie ectomicorrízica possui maior poder redutor. De referir, que o poder redutor da raíz da planta é inferior na presença de *Paxillus involutus*, assim como o poder redutor desta espécie é menor na presença de *Pinus pinaster* (Tabela 7). Desta forma, a simbiose não induz em nenhum dos simbiontes o aumento do seu poder redutor. No

ensaio com *Pisolithus arhizus*, podemos observar que as raízes de *Pinus pinaster* revelam maior poder redutor que o micélio do fungo e o meio de cultura onde este cresceu. Quando na presença do simbiote, o poder redutor da planta é inferior assim como o poder redutor da espécie ectomicorrízica decresce na presença de *Pinus pinaster* (Tabela 7). Desta forma, podemos concluir que a simbiose parece não induzir esta actividade nestas espécies.

No que diz respeito à inibição da descoloração de β -caroteno, no ensaio com *Paxillus involutus*, podemos afirmar que o fungo e a raiz de *Pinus pinaster* detêm maior capacidade de inibição da descoloração de β -caroteno que o meio de cultura de onde foi retirada a espécie micorrízica. Observando os valores de EC_{50} das espécies isoladas, podemos afirmar que estes são superiores aos valores registados no crescimento em associação. Podemos deduzir assim, que para ambas as espécies, a capacidade de inibição da descoloração quando em simbiose é superior (Tabela 7). No que se refere aos resultados do ensaio com *Pisolithus arhizus*, podemos observar que este e a raiz de *Pinus pinaster* possuem também uma maior capacidade de inibição da descoloração de β -caroteno, comparativamente ao meio de cultura. Podemos verificar também que a capacidade de inibição da descoloração de β -caroteno na raiz das plantas é superior quando em simbiose. Pelo contrário, a capacidade de inibição da descoloração de β -caroteno do fungo, diminui quando em associação com a planta (Tabela 7).

Em suma, podemos concluir que a simbiose entre *Paxillus involutus* e *Pinus pinaster* não acarreta benefícios maiores para os simbiotes, uma vez que, embora haja uma diminuição no poder redutor destes, a actividade captadora de radicais mantém-se e a capacidade de inibição da descoloração de β -caroteno aumenta em ambas as espécies. De referir, que se observa também um aumento da concentração de fenóis no fungo quando em associação com a planta. Além disso, os níveis de ácido *p*-hidroxibenzóico e cinâmico aumentam na raiz quando em simbiose, comparativamente com a raiz isolada. Por outro lado, a associação entre *Pisolithus arhizus* e *Pinus pinaster* parece provocar uma diminuição das propriedades antioxidantes de ambos os simbiotes, embora se observe um aumento dos ácidos *p*-cumárico e cinâmico na espécie ectomicorrízica. De referir, que se exceptua a capacidade de inibição da descoloração de β -caroteno por parte da planta, que aumenta quando em associação, e a actividade captadora de radicais que se mantém sem alterações significativas em ambos os simbiotes.

3.2.3. Efeito do tempo de inoculação na actividade antioxidante dos fungos micorrízicos e plantas germinadas na presença e ausência do simbiote

De forma a verificar o tempo de resposta química e avaliar o processo de simbiose, as plantas de *Pinus pinaster* e os fungos ectomicorrízicos em estudo foram inoculados e deixados em contacto durante 48 horas e os resultados obtidos foram comparados com os resultados verificados ao longo de 45 dias.

A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos na análise das propriedades antioxidantes das amostras durante um período de 45 dias na presença e ausência de simbiote.

Tabela 8. Rendimentos de extracção (%), concentrações de fenóis totais (mg EAG/g extracto) e actividade antioxidante (valores de EC50, mg/mL) das amostras de *Paxillus involutus*, *Pisolithus arhizus* e *Pinus pinaster* após 45 dias de crescimento, em meio de cultura MMNm, na ausência e presença de simbiote (média \pm SD; n = 9). Em cada coluna, letras diferentes representam diferenças significativas entre os resultados ($p < 0,05$).

Espécies	Amostras	Rendimentos de extracção	Fenóis totais	Actividade captadora de radicais DPPH	Poder redutor	Inibição descoloração β -caroteno
<i>Paxillus involutus</i>	Micélio	16,28	59,47 \pm 3,37 c	1,15 \pm 0,07 f	0,65 \pm 0,03 kj	2,21 \pm 0,12 e
	Meio de cultura	2,27	1,01 \pm 0,07 i	99,62 \pm 16,79 b	28,56 \pm 0,12 a	9,85 \pm 0,93 c
<i>Pisolithus arhizus</i>	Micélio	24,94	9,48 \pm 0,67 h	17,29 \pm 0,29 ed	7,29 \pm 0,62 d	2,49 \pm 0,18 e
	Meio de cultura	0,95	2,36 \pm 0,07 i	38,56 \pm 1,09 c	11,97 \pm 0,01 b	4,39 \pm 0,05 d
	Raíz	23,43	23,24 \pm 0,59 f	3,95 \pm 0,28 f	1,47 \pm 0,06 h	2,26 \pm 0,15 e
<i>Pinus pinaster</i>	Caule	27,07	31,21 \pm 0,34 e	3,58 \pm 0,41 f	1,36 \pm 0,04 ih	0,59 \pm 0,00 fg
	Folhas	31,57	72,65 \pm 0,76 a	0,77 \pm 0,04 f	0,50 \pm 0,02 k	0,99 \pm 0,21 fg
	Meio de cultura	2,81	3,91 \pm 0,21 i	> 200 a	5,20 \pm 0,72 e	9,79 \pm 0,48 c
<i>Paxillus involutus</i> + <i>Pinus pinaster</i>	Micélio	12,66	71,27 \pm 6,49 a	3,54 \pm 0,05 f	0,98 \pm 0,02 ij	0,56 \pm 0,00 fg
	Raíz	26,38	10,56 \pm 0,56 h	9,11 \pm 0,66 ef	2,96 \pm 0,05 g	0,48 \pm 0,00 g
	Caule	24,89	32,80 \pm 0,34 e	1,42 \pm 0,12 f	1,26 \pm 0,03 ih	0,58 \pm 0,02 fg
	Folhas	33,22	65,52 \pm 3,31 b	1,46 \pm 0,04 f	0,68 \pm 0,03 kj	0,52 \pm 0,00 fg
	Meio de cultura	2,45	2,89 \pm 0,09 i	104,57 \pm 14,15 b	9,50 \pm 1,05 c	28,57 \pm 1,11 a
<i>Pisolithus arhizus</i> + <i>Pinus pinaster</i>	Micélio	65,58	8,61 \pm 0,38 h	19,26 \pm 1,03 d	9,79 \pm 0,42 c	26,99 \pm 1,94 b
	Raíz	25,74	11,06 \pm 0,84 h	5,27 \pm 0,14 f	2,79 \pm 0,01 g	0,59 \pm 0,00 fg
	Caule	18,64	49,56 \pm 3,08 d	1,20 \pm 0,04 f	0,78 \pm 0,05 kj	1,53 \pm 0,83 fe
	Folhas	35,36	73,67 \pm 4,13 a	0,70 \pm 0,02 f	0,47 \pm 0,00 k	0,55 \pm 0,00 fg
	Meio de cultura	0,62	19,36 \pm 1,09 g	8,94 \pm 0,11 ef	4,26 \pm 0,30 f	4,65 \pm 0,27 d

Analisando as espécies que se desenvolveram isoladas ao longo de 45 dias, a espécie *Pinus pinaster* é a que revela a maior concentração de fenóis (folhas: 72,65 mg EAG/g extracto), seguida da espécie *Paxillus involutus* e por fim *Pisolithus arhizus*, sendo esta a que detém o menor teor destes compostos (Tabela 8). Estes resultados estão de acordo com os dados resultantes da avaliação das propriedades antioxidantes, uma vez que se verificaram resultados semelhantes.

Observando os resultados da actividade captadora de radicais DPPH, conferimos que são as folhas de *Pinus pinaster* que detêm o valor de EC₅₀ mais baixo, ou seja, a maior capacidade captadora de radicais livres seguidas do micélio da espécie *Paxillus involutus* e das restantes partes da planta (caule e raíz). Mais uma vez se verifica que a espécie *Pisolithus arhizus* possui a actividade captadora de radicais mais baixa (Tabela 8).

Quanto ao poder redutor das amostras estudadas, as folhas de *Pinus pinaster* revelam, mais uma vez, o maior potencial. Segue-se o micélio de *Paxillus involutus* e as restantes componentes da planta e, por fim, a espécie *Pisolithus arhizus* demonstra o poder redutor mais baixo (Tabela 8).

Analisando a capacidade de inibição da descoloração de β -caroteno, a maior capacidade de inibição é revelada pelo caule de *Pinus pinaster*, seguido das folhas da mesma espécie e do micélio da espécie *Paxillus involutus*. A espécie ectomicorrízica *Pisolithus arhizus* revela a menor capacidade de inibição da descoloração de β -caroteno (Tabela 8).

De referir que, exceptuando as espécies em estudo, os meios de cultura são os que detêm as menores concentrações de fenóis e propriedades antioxidantes mais baixas, o que nos leva a crer que não há uma libertação significativa de compostos antioxidantes para o meio ou que, ao longo do tempo, pode haver um consumo destas moléculas. Tais resultados podem ainda ser devidos a uma extracção das moléculas pouco eficiente, uma vez que os rendimentos de extracção destas amostras são muito baixos.

Podemos concluir assim, que a espécie com melhores propriedades antioxidantes é a espécie *Pinus pinaster*, nomeadamente as folhas (com excepção da inibição da descoloração de β -caroteno), e a espécie com propriedades antioxidantes inferiores, *Pisolithus arhizus*. Tais resultados são suportados pela concentração de fenóis nas mesmas espécies.

Quando em simbiose, observa-se um aumento na concentração de fenóis por parte do fungo *Paxillus involutus* e do caule e meio de cultura onde se desenvolveram *Pinus*

pinaster e *Pisolithus arhizus*. Por sua vez, o teor destes compostos no fungo *Pisolithus arhizus*, quando em simbiose, mantém-se sem alterações significativas, havendo um decréscimo nas raízes em ambas as simbioses (Tabela 8). Desta forma, podemos concluir que a simbiose é favorável para a planta, uma vez que a concentração de fenóis diminui ao nível da raiz, ou seja, a presença destes fungos, reduz o stresse da planta.

Quanto às propriedades antioxidantes das amostras em estudo, não se registam, em geral, grandes variações quando comparamos os resultados dos três testes efectuados na presença e ausência de simbiote. Quanto à actividade captadora de radicais DPPH, não se observam diferenças significativas das espécies em simbiose comparativamente com os resultados obtidos no seu crescimento isolado. Apenas se verifica um aumento desta capacidade ao nível do meio de cultura onde se desenvolveu *Pinus pinaster* em simbiose com *Pisolithus arhizus* (Tabela 8). Assim, a associação não parece induzir na planta ou nos fungos a necessidade/capacidade de inibição de radicais livres.

No que concerne ao poder redutor das amostras, já se observa alguma variabilidade nos resultados quando comparados com os registados no crescimento isolado das mesmas. Assim, podemos verificar um decréscimo no poder redutor nas raízes de *Pinus pinaster* em ambas as simbioses, assim como no meio de cultura onde se desenvolveram *Pinus pinaster* e *Paxillus involutus* relativamente ao meio de cultura onde se desenvolveu apenas *Pinus pinaster* e ainda uma diminuição do poder redutor no micélio de *Pisolithus arhizus* associado a *Pinus pinaster*. Podemos também observar um aumento no poder redutor do meio de cultura onde se desenvolveram *Paxillus involutus* e *Pinus pinaster*, relativamente ao meio de cultura onde se desenvolveu apenas *Paxillus involutus*, e também no meio de cultura e caule das plantas que se desenvolveram na presença de *Pisolithus arhizus* (Tabela 8). As restantes amostras não evidenciam diferenças significativas em relação ao poder redutor, quando em simbiose. Deste modo, podemos concluir mais uma vez, que a planta, quando em simbiose, não se encontra sob stresse acrescentado, dado que não se verifica um aumento da concentração de fenóis assim como o poder redutor diminui (nas raízes) quando em associação. Em suma, podemos afirmar que, regra geral, também a simbiose não aumenta o poder redutor de fungos e plantas.

Por fim, analisando a capacidade de inibição da descoloração de β -caroteno, verificamos um aumento desta capacidade no micélio da espécie *Paxillus involutus* quando na presença de simbiote, nas raízes de *Pinus pinaster* em ambas as simbioses e no meio de cultura onde se desenvolveu a associação com *Pisolithus arhizus*

relativamente ao meio de cultura onde cresceu a planta isolada (valores de EC_{50} mais baixos, comparados com os valores obtidos na ausência de simbionte; Tabela 8). Pelo contrário, registamos um decréscimo da capacidade de inibição da descoloração de β -caroteno no meio de cultura onde se desenvolveram *Pinus pinaster* e *Paxillus involutus* e no micélio do fungo *Pisolithus arhizus* quando analisamos a simbiose. As restantes amostras mantiveram a capacidade de inibição da descoloração de β -caroteno (Tabela 8). Concluímos assim, que a simbiose aumenta a capacidade de inibição da descoloração de β -caroteno da espécie *Paxillus involutus* e da planta (nomeadamente as raízes). Já para a espécie *Pisolithus arhizus*, uma vez que a sua capacidade de inibição da descoloração diminui, a simbiose parece não induzir stresse reparável por este mecanismo de acção.

Em resumo, a simbiose por um período de 45 dias não aumenta as propriedades antioxidantes das espécies estudadas no que diz respeito à actividade captadora de radicais livres, diminuindo mesmo o poder redutor da planta (designadamente as raízes) e do fungo *Pisolithus arhizus* e a capacidade de inibição da descoloração de β -caroteno desta última espécie. As únicas excepções são as espécies *Paxillus involutus* e *Pinus pinaster* (raízes) em que a sua capacidade de inibição de β -caroteno aumenta quando em simbiose.

De modo a obter uma massa de micélio suficiente e em estado de poder realizar simbiose, os fungos foram inoculados em placas de Petri (9 cm diâmetro), como referido anteriormente, e deixados a crescer durante 20 dias. Após este período foram colocadas, sobre estes, as plantas e passadas 48 horas retirou-se o material para análise.

A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos na análise das propriedades antioxidantes das amostras de *Paxillus involutus* e *Pisolithus arhizus* que se desenvolveram em meio MMNm durante um período de 22 dias, após 48 horas de contacto com *Pinus pinaster*, ou de ausência do simbionte.

Tabela 9. Rendimentos de extracção (%), concentrações de fenóis totais (mg EAG/g extracto) e actividade antioxidante (valores de EC50, mg/mL) das amostras em estudo, após 22 dias de crescimento (no caso das espécies ectomicorrízicas) e 48 horas de interacção fungo - planta, em meio de cultura MMNm, (média \pm SD; n = 9). Em cada coluna, letras diferentes representam diferenças significativas entre os resultados ($p < 0,05$).

Espécies	Amostras	Rendimentos de extracção	Fenóis totais	Actividade captadora de radicais DPPH	Poder redutor	Inibição descoloração β -caroteno
<i>Paxillus involutus</i>	Micélio	7,07	128,40 \pm 37,02 a	1,46 \pm 0,09 c	0,69 \pm 0,03 d	0,89 \pm 0,06 hg
	Meio de cultura	1,16	4,87 \pm 0,25 ih	38,23 \pm 1,00 b	16,78 \pm 0,75 b	18,62 \pm 1,20 c
<i>Pisolithus arhizus</i>	Micélio	5,92	69,77 \pm 3,72 c	3,33 \pm 0,20 c	1,35 \pm 0,20 d	0,35 \pm 0,05 h
	Meio de cultura	1,57	4,19 \pm 0,33 ih	41,44 \pm 2,72 b	18,87 \pm 0,65 b	15,82 \pm 1,14 d
	Raíz	17,92	7,93 \pm 0,61 ihg	12,11 \pm 0,16 c	5,48 \pm 0,07 cd	2,26 \pm 0,07 g
<i>Pinus pinaster</i>	Caules	22,23	28,83 \pm 1,55 fe	4,42 \pm 0,15 c	2,14 \pm 0,04 d	0,62 \pm 0,00 hg
	Folhas	11,61	109,36 \pm 7,45 b	0,85 \pm 0,01 c	0,34 \pm 0,01 d	0,28 \pm 0,01 h
	Meio de cultura	1,01	0,71 \pm 0,06 i	> 75,00 a	> 75,00 a	53,02 \pm 4,07 a
<i>Paxillus involutus</i> + <i>Pinus pinaster</i>	Micélio	13,71	17,69 \pm 1,74 fhg	5,64 \pm 0,44 c	2,94 \pm 0,09 d	9,53 \pm 0,39 e
	Raíz	13,99	15,81 \pm 1,24 ihg	4,40 \pm 0,08 c	2,41 \pm 0,11 d	4,20 \pm 1,48 f
	Caule	16,54	37,09 \pm 3,24 e	2,29 \pm 0,03 c	1,51 \pm 0,07 d	0,63 \pm 0,05 hg
	Folhas	24,43	57,09 \pm 3,25 d	2,31 \pm 0,06 c	1,06 \pm 0,07 d	1,93 \pm 0,44 hg
	Meio de cultura	1,33	5,26 \pm 0,32 ih	40,69 \pm 0,90 b	14,99 \pm 0,17 cb	22,14 \pm 0,73 b
<i>Pisolithus arhizus</i> + <i>Pinus pinaster</i>	Micélio	17,21	23,24 \pm 3,26 feg	9,22 \pm 0,35 c	4,32 \pm 0,10 d	0,56 \pm 0,02 hg
	Raíz	9,61	58,61 \pm 4,29 dc	0,78 \pm 0,01 c	0,58 \pm 0,02 d	0,45 \pm 0,00 hg
	Caules	11,66	53,76 \pm 1,51 dc	1,16 \pm 0,02 c	0,87 \pm 0,03 d	0,91 \pm 0,18 hg
	Folhas	12,29	96,85 \pm 6,26 b	0,89 \pm 0,01 c	0,50 \pm 0,01 d	0,26 \pm 0,00 h
	Meio de cultura	0,78	12,53 \pm 0,69 ihg	14,02 \pm 0,27 c	6,58 \pm 0,04 cd	1,19 \pm 0,02 hg

Quando analisamos os resultados obtidos na análise das propriedades antioxidantes de *Paxillus involutus* e *Pisolithus arhizus*, após 48 horas de contacto com *Pinus pinaster*, comparados com a ausência de contacto, verificamos que, os fenóis totais diminuem no micélio de ambos os fungos quando em associação com a planta (Tabela 9). Na raíz desta porém, os fenóis totais mantêm-se sem variação significativa quando em associação com *Paxillus involutus* e aumentam significativamente após o contacto com a espécie *Pisolithus arhizus*. A actividade captadora de radicais DPPH não se altera neste período de tempo nem nos micélios, nem nas raízes das plantas na sequência do contacto. Resultados semelhantes são observados para o poder redutor, neste período de tempo. A inibição da descoloração do β -caroteno revela já alterações em relação ao micélio de *Paxillus involutus* e raíz em contacto com este fungo, com uma diminuição da actividade (aumento do valor de EC50), mas não se registam grandes alterações no *Pisolithus arhizus* ou na raíz em contacto com este fungo (Tabela 9).

Comparando os efeitos induzidos pelos simbioss no organismo ao qual se encontram associados, podemos observar uma certa variabilidade nos resultados obtidos ao fim de 48 horas relativamente aos dados registados ao fim de 45 dias. Assim, a presença de raíz na espécie *Paxillus involutus*, começa por provocar uma diminuição no teor de fenóis, mas ao fim de 45 verifica-se que a raíz induz um efeito contrário, ou seja, a concentração em fenóis totais no fungo, quando em simbiose, aumenta com o tempo. Após 48 horas de associação, verificamos que a presença de *Pinus pinaster* não parece induzir efeitos na actividade captadora de radicais DPPH no fungo *Paxillus involutus*, efeito igualmente observado ao final de 45 dias. No que concerne ao poder redutor, em 48 horas não se registam alterações no fungo, contudo, regista-se uma diminuição desta propriedade, provavelmente induzida pela simbiose, ao fim de 45 dias. Mais alterações são observadas na capacidade de inibição da descoloração de β -caroteno no micélio do fungo *Paxillus involutus* nos dois tempos testados, uma vez que se observa uma diminuição desta capacidade ao fim de 48 horas em simbiose com a planta, mas ao fim de 45 dias é verificado um efeito contrário, ou seja, a capacidade de inibição da descoloração de β -caroteno aumenta com o decorrer do tempo. Relativamente ao efeito deste fungo na planta, este parece não provocar efeitos significativos na concentração de fenóis nem na actividade captadora de radicais da planta, contudo, ao longo do tempo, a raíz diminui o seu teor em fenóis e regista uma ligeira diminuição nesta propriedade. Quanto ao poder redutor diminui igualmente ao longo do tempo (condição não

verificada em 48 horas de simbiose) e a capacidade de descoloração de β -caroteno aumenta, enquanto às 48 horas se regista uma diminuição quando na presença da raiz. Desta forma, a simbiose entre estas duas espécies embora pareça acarretar alguns benefícios para os simbioses, estes não são generalizados e muito proeminentes.

Analisando os efeitos da simbiose na espécie *Pisolithus arhizus*, verificamos que ao fim de 48 horas se regista uma diminuição na quantidade de fenóis totais quando na presença do simbionte, contudo, ao fim de 45 dias a raiz deixa de induzir qualquer efeito a este nível. Quanto às propriedades antioxidantes no geral, ao fim de 48 horas não se verifica grande variabilidade, mas ao fim de 45 dias estas diminuem quando a raiz se encontra presente. Assim, a planta em estudo parece reduzir o stresse do fungo *Pisolithus arhizus*, uma vez que se verifica a diminuição genérica das suas propriedades antioxidantes com o passar do tempo e uma diminuição inicial do teor em fenóis que depois se mantém. O efeito do fungo *Pisolithus arhizus* parece também ser benéfico para a planta, uma vez que, embora o seu teor em fenóis aumente consideravelmente ao fim de 48 horas, passados 45 dias este diminui. Na actividade captadora de radicais DPPH também não se registam alterações significativas por parte da planta (raiz), mas no poder redutor, embora haja um ligeiro aumento no início da simbiose, mais tarde verifica-se uma diminuição deste. A única excepção é verificada na capacidade de inibição da descoloração de β -caroteno que sofre um ligeiro aumento ao fim de 48 horas, aumentando com o passar do tempo.

IV. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

4.1. Conclusões

Através do presente trabalho pretendeu-se analisar o desenvolvimento bem como avaliar as propriedades antioxidantes e produção de compostos com igual actividade em amostras de duas espécies de fungos ectomicorrízicos, *Paxillus involutus* e *Pisolithus arhizus*, e de plantas de *Pinus pinaster*, avaliando estes parâmetros em crescimento isolado e em simbiose.

Estudando o crescimento dos micélios dos dois fungos, quando isolados em meio MMNm, a espécie *Paxillus involutus* detém um crescimento radial superior ao fungo *Pisolithus arhizus* ao longo de 37 dias. Comparando o crescimento de ambas as espécies ectomicorrízicas, na presença e ausência de simbionte, podemos verificar que os fungos possuem um crescimento radial inferior quando na presença do simbionte – *Pinus pinaster*. Assim, para uma obtenção de micélio em maiores quantidades, a espécie *Paxillus involutus* é mais promitente, enquanto para uma actividade de micorrização, a melhor simbiose parece ser entre *Pisolithus arhizus* e *Pinus pinaster*.

Analisando a composição em vitamina E dos fungos micorrízicos *in vivo* e *in vitro*, na ausência de simbionte, concluímos que todas as formas estudadas desta vitamina foram detectadas (tocoferóis α , β , γ e δ), sendo a espécie *Pisolithus arhizus*, nomeadamente o micélio, que revela a maior composição em tocoferóis totais e demonstra ser uma potencial fonte de γ -tocoferol, dado que os valores detectados deste vitâmero nesta amostra possuem uma disparidade elevada relativamente às restantes amostras (154,39 $\mu\text{g/g}$ peso seco). Assim, a obtenção *in vitro* desta espécie parece ser bastante promissora no que diz respeito à obtenção desta forma de vitamina E. De referir que, para ambas as espécies, as amostras de micélio evidenciam uma maior concentração de tocoferóis totais relativamente aos corpos de frutificação e respectivos meios de cultura. Todavia, relativamente à actividade antioxidante destas amostras, verifica-se que os carpóforos possuem propriedades antioxidantes superiores aos micélios e aos meios de cultura.

Relativamente ao estudo do perfil fenólico dos fungos micorrízicos *Paxillus involutus* e *Pisolithus arhizus* e das plantas de *Pinus pinaster*, na presença e ausência de

simbionte, foram analisados os principais ácidos fenólicos e compostos relacionados anteriormente identificados em cogumelos silvestres - ácidos protocatéuico, *p*-hidroxibenzóico, *p*-cumárico e cinâmico. O ácido protocatéuico apenas foi detectado no micélio da espécie *Paxillus involutus*. Já o ácido *p*-hidroxibenzóico foi detectado em todas as amostras excepto no micélio do fungo *Pisolithus arhizus* que cresceu em simbiose com *Pinus pinaster* durante 45 dias, sendo a raiz da planta que cresceu em simbiose com *Paxillus involutus* a detentora dos níveis mais elevados deste ácido. Esta mesma amostra revelou ainda um teor em ácido cinâmico superior às restantes. O ácido *p*-cumárico foi detectado preferencialmente na raiz de *Pinus pinaster* que cresceu isolado.

De forma a entender os efeitos das raízes de *Pinus pinaster* nas propriedades antioxidantes dos micélios das espécies ectomicorrízicas em estudo e a influência da presença dos fungos ectomicorrízicos nas raízes da planta, foram também realizados os testes da actividade antioxidante relatados anteriormente.

No que concerne à espécie *Paxillus involutus*, a presença da raiz da planta provoca um aumento na concentração de fenóis no micélio desta, assim como na sua capacidade de inibição da descoloração de β -caroteno e uma ligeira diminuição no poder redutor da mesma. Já a presença desta espécie ectomicorrízica parece induzir uma menor produção de fenóis e diminuição geral das propriedades antioxidantes da raiz da planta.

Na simbiose com a espécie *Pisolithus arhizus*, a raiz parece não ter efeitos significativos sobre a produção de fenóis do fungo, no entanto, parece induzir uma diminuição das propriedades antioxidantes do mesmo. No que se refere à planta, quando na presença desta espécie micorrízica, diminui a sua concentração em fenóis e poder redutor e aumenta a sua capacidade de inibição da descoloração de β -caroteno. Concluimos assim, que a presença de *Pinus pinaster* aparenta ser benéfica especialmente para a espécie *Pisolithus arhizus* parecendo não induzir ou até reduzir o stresse oxidativo desta espécie, embora se registre um aumento dos ácidos *p*-cumárico e cinâmico neste fungo. A presença de espécies ectomicorrízicas nas raízes do simbionte em estudo parece de igual forma não ser indutora de stresse, uma vez que se verifica uma redução na concentração de fenóis e, de uma forma geral, nas propriedades antioxidantes destas.

Em associação por um período de 48 horas, a espécie *Paxillus involutus* diminui consideravelmente a sua concentração de fenóis totais mantendo de certa forma as suas propriedades antioxidantes. Quanto aos efeitos deste simbiote na planta, não se registam diferenças muito significativas.

Na simbiose com *Pisolithus arhizus*, a planta parece não induzir efeitos significativos nas suas propriedades antioxidantes verificando-se uma redução no teor em fenóis. Analisando os efeitos deste fungo na planta, verificamos um aumento considerável na concentração de fenóis nas raízes desta, não se registando grande variabilidade nas propriedades antioxidantes. Assim, podemos verificar que nesta interacção está patente uma resposta química sobretudo por parte da planta que nas primeiras 48 horas ainda não identificou o fungo como não patogénico.

Desta forma, concluímos que uma interacção de 48 horas não é reveladora dos efeitos que se vêm a verificar ao longo do tempo (45 dias). Podemos pois afirmar que, em relação aos mecanismos de stresse oxidativo em associações ectomicorrízicas com as duas espécies em estudo, a resposta do fungo e da planta ao contacto com o hospedeiro são algo diversas, revelando diferentes formas de reconhecimento mútuo. Se *Pisolithus arhizus* parece provocar uma reacção inicial de stresse (48h) com aumento do teor de fenóis na raíz, ao fim de 45 dias, esse efeito desaparece e verifica-se uma diminuição dos mesmos. No fungo porém, os teores em fenóis são já menores ao fim de 48 horas, evidenciando uma resposta rápida deste à presença do hospedeiro, que se mantém ao longo da associação. Com *Paxillus involutus* a resposta é oposta, observando-se uma diminuição inicial dos teores em fenóis mas um aumento ulterior. Efeitos equivalentes são verificados na actividade antioxidante, que genericamente diminui em planta e fungo, no caso de *Pisolithus arhizus* e, não diminui ou pode mesmo aumentar no caso de *Paxillus involutus*. Pomos a hipótese de que tal possa corresponder a diferenças de compatibilidade entre estas duas espécies de fungo e o hospedeiro *Pinus pinaster* mas, tal hipótese carece de confirmação com outros tempos de contacto e outras espécies de fungo.

4.2. Perspectivas futuras

O presente trabalho, procura, para além de estudar as relações biológicas entre fungos e plantas, explorar a possibilidade de obter novas fontes de compostos bioactivos com interesse industrial. Assim, o desenvolvimento futuro deste trabalho, poderá passar pela investigação de diferentes compostos com actividade biológica, presentes nas espécies discutidas, que não foram estudados neste projecto, tais como ácidos orgânicos ou polissacáridos. Procedendo-se à identificação e quantificação destas moléculas, caso estejam presentes em quantidades consideráveis, poderão ser descobertas novas e valiosas fontes de compostos importantes para a saúde e melhoramento da qualidade de vida. Nestes estudos poderão testar-se tempos de inoculação diferentes de modo a obter a maior concentração de compostos. Contudo, com os resultados decorrentes do trabalho realizado, poderão já desenvolver-se metodologias para a obtenção de γ -tocoferol, uma das formas mais importantes da vitamina E, a partir de *Pisolithus arhizus* obtido *in vitro*, uma vez que este composto é bastante procurado por indústrias farmacêuticas ou ligadas aos cosméticos.

Poderão também desenvolver-se estudos mais aprofundados das associações micorrízicas, de forma a compreender quais as mais favoráveis para as espécies e quais as melhores condições para o seu desenvolvimento, podendo estes resultados ser utilizados em programas de desenvolvimento e melhoramento das espécies ou, por exemplo, em programas de reflorestação.

Serão ainda necessários mais estudos relativos aos mecanismos de stresse oxidativo em associações micorrízicas, para outros tempos de associação e outras espécies de fungos micorrízicos, de modo a esclarecer o verdadeiro significado das tendências aqui apresentadas e o seu significado fisiológico e ecológico.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., Weil, J.A. 2004. Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84, 551 – 562.
- Apak, R., Guclu, K., Demirata, B., Ozyurek, M., Celik, S.E., Bektasoglu, B., Berker, K.I., Ozyurt, D. 2007. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12, 1496 – 1547.
- Baptista, M.J., da Gloria, B.A., Pascholati, S.F., Krugner, T.L. 1999. Produção de compostos fenólicos durante a infecção ectomicorrízica por dois isolados de *Pisolithus tictorius* em *Eucalyptus urophylla* *in vitro*. *Revista Brasileira de Botânica*, 22, 309 – 315.
- Barbéro, M., Loisel, R., Quézel, P., Richardson, D.M., Romane, F. 1998. Pines of the Mediterranean basin. In: Richardson, D.M. (Ed.), *Ecology and Biography of Pinus*. Cambridge University Press, United Kingdom.
- Barros, L., Correia, D.M., Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P., Santos-Buelga, C. 2008. Optimization of the determination of tocopherols in *Agaricus* sp. edible mushrooms by a normal phase liquid chromatographic method. *Food Chemistry*, 110, 1046 – 1050.
- Barros, L., Dueñas, M., Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P., Santos-Buelga, C. 2009. Phenolic acids determination by HPLC-DAD-ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 1076 – 1079.
- Benguria, R.L. 1985. *Mil setas ibéricas*. Flash composition S.L., Bilbao.
- Berker, K.I., Güclü, K., Tor, I., Apak, R. 2007. Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, 72, 1157 – 1165.
- Bonan, G.B., Pollard, D., Thompson, S.L. 1992. Effects of boreal forest vegetation on global climate. *Nature*, 359, 716 – 718.
- Bravo, L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56, 317 – 333.
- CAB International. 2002. *Pines of Silvicultural Importance*. CABI Publishing, United Kingdom.

- Cairney, J.W.G. 2002. *Pisolithus* – death of the pan-global super fungus. *New Phytologist*, 153, 199 – 201.
- Carlile, M.J., Watkinson, S.C., Gooday, G.W. 2001. *The Fungi*. Academic Press, 2nd Edition. Hungary.
- Cho, K., Yun, C., Ion, D., Cho, Y., Rimbach, G., Packer, L., Chung, A. 2000. Effect of bioflavonoids extracted from the bark of *Pinus maritime* on proinflammatory cytokine interleukin-1 production in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 168, 64 – 71.
- Christie, T. 1965. The effects of some phenolic compounds upon the growth of two species of *Phytophthora*. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 8, 630 – 635.
- Cormack, B.P., Ghorri, N., Falkow, S. 1999. An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. *Science*, 285, 578 – 582.
- Correia, I., Almeida, M.H., Aguiar, A. 2004. Variabilidade do Crescimento e da Forma de Proveniências de *Pinus pinaster* Aiton aos 8 anos, na Mata Nacional do Escaroupim. *Silva Lusitana*, 12, 151 – 182.
- Dahlberg, A., Schimmel, J., Taylor, A.F.S., Johannesson, H. 2001. Post-fire legacy of ectomycorrhizal fungal communities in the Swedish boreal forest in relation to fire severity and logging intensity. *Biological Conservation*, 100, 151 – 161.
- De Beer, D., Jubert, E., Wentzel, C.A., Gelderblom, C.A., Manley, M. 2003. Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines: Free radical scavenging. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 902 – 909.
- Ditengou, F.A., Lapeyrie, F. 2000. Hypaphorine from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* counteracts activities of indole-3-acetic acid and ethylene but not synthetic auxins in eucalypt seedlings. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13, 151 – 158.
- Dix, N.J., Webster, J. 1995. *Fungal Ecology*. Chapman & Hall, London.
- Echavarría, B.Z., Franco, A.S., Martínez, A.M. 2009. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del Caribe Colombiano. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 16, 126 – 131.
- Fang, Y-Z, Yang, S., Wu, G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18, 872 – 879.

- Fernandes, P.M., Rigolot, E. 2007. The fire ecology and management of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Forest Ecology and Management*, 241, 1 – 13.
- Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Abreu, R.M.V. 2009. Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, 16, 1543 – 1560.
- García, M., Quinterio, R., López, A. 2000. *Biotecnología alimentaria*. Limusa, México.
- George, S., Brat, P., Alter, P., Amiot, M.J. 2005. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1370 – 1373.
- Ghorai, S., Banik, S.P., Verma, D., Chowdhury, S., Mukherjee, S., Khowala, S. 2009. Fungal biotechnology in food and feed processing. *Food Research International*, 42, 577 – 587.
- Gilbert, D.L. 2000. Fifty years of radical ideas. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899, 1 – 14.
- Goetz, M.E., Luch, A. 2008. Reactive species: A cell damaging rout assisting to chemical carcinogens. *Cancer Letters*, 266, 73 – 83.
- Gutteridge, J.M., Halliwell, B. 2000. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899, 136 – 147.
- Haars, A., Chet, J., Hüttermann, A. 1981. Effect of phenolic compounds and tannin on growth and laccase activity of *Fomes annosus*. *European Journal of Plant Pathology*, 11, 6 – 76.
- Hall, C. 2001. Sources of natural antioxidants: oilseeds, nuts, cereals, legumes, animal products and microbial sources. In: Pokomy, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (Eds.), *Antioxidants in food: practical applications*. Woodhead Publishing Limited, United Kingdom.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1999. *Free radicals in biology and medicine*, 3rd Edition. Oxford University Press, United Kingdom.
- Hanson, J.R. 2008. *The Chemistry of Fungi*. Royal Society of Chemistry, United Kingdom.
- Harley, J.L., Smith, S.E. 1983. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, United Kingdom.

- Hart, S.C., DeLuca, T.H., Newman, G.S., MacKenzie, M.D., Boyle, S.I. 2005. Post-fire vegetative dynamics as drivers of microbial community structure and function in forest soils. *Forest Ecology and Management*, 220, 166–184.
- Hawksworth, D.L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1,5 million species estimate revised. *Mycological Research*, 105, 1422 – 1432.
- Heller, G., Adomas, A., Li, G., Osborne, J., Zyl, L., Sederoff, R., Finlay, R.D., Stenlid, J., Asiegbu, F.O. 2008. Transcriptional analysis of *Pinus sylvestris* roots challenged with the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *BMC Plant Biology*, 8, 19.
- Hensley, K., Benaksas, E.J., Bolli, R., Comp, P., Grammas, P., Hamdheydari, L., Mou, S., Pye, Q.N., Stoddard, M.F., Wallis, G., Williamson, K.S., West, M., Wechter, W.J., Floyd, R.A. 2004. New perspectives on vitamin E: γ -tocopherol and carboxyethylhydroxychroman metabolites in biology and medicine. *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 1 – 15.
- James, T.Y., Kauff, F., Schoch, C.L., *et al.* 2006 a. Reconstructing the early evolution of the fungi using a six gene phylogeny. *Nature*, 443, 818 – 822.
- James, T.Y., Letcher, P.M., Longcore, J.E., Mozley-Standridge, S.E., Porter, D., Powell, M.J., Griffith, G.W., Vilgalys, R. 2006 b. A molecular phylogeny of the flagellated Fungi (Chytridiomycota) and a proposal for a new phylum (Blastocladiomycota). *Mycologia*, 98, 860 – 871.
- Jayaprakasha, G.K., Singh, R.P., Sakariah, K.K. 2001. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. *Food Chemistry*, 73, 285 – 290.
- Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L.A. 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31, 671-701.
- Kawano, T., Kawano, N., Hosoya, H., Lapeyrie, F. 2001. Fungal auxin antagonist hypaphorine competitively inhibits indole-3-acetic acid-dependent superoxide generation by horseradish peroxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 288, 546 – 551.
- Kidd, P.M. 2000. The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. *Alternative Medicine Review*, 5, 4 – 27.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C., Stalpers, J.A. 2008. *Dictionary of Fungi*, 10th Edition. CABI Publishing, United Kingdom.

- Lagrange, H., Jay-Allmand, C., Lapeyrie, F. 2001. Rutin, the phenolglycoside from eucalyptus root exudates, stimulates *Pisolithus* hyphal growth at picomolar concentration. *New Phytologist*, 149, 349 – 355.
- Le Tacon, F. 1992. Variations in field response of forest trees to nursery ectomycorrhizal inoculation in Europe. In: Read, D.J., Lewis, D., Fitter, A., Alexander, I. (Ed.), *Mycorrhizas in ecosystems*. CAB International, United Kingdom.
- Liu, R.H. 2003. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 517S – 520S.
- Liu, Y.J., Hodson, M.C., Hall, B.D. 2006. Loss of the flagellum happened only once in the fungal lineage: phylogenetic structure of Kingdom Fungi inferred from RNA polymerase II subunit genes. *BMC Evolutionary Biology*, 6, 74.
- Macheix, J., Fleuriet, A. 1998. *Flavonoids in health and disease*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Malajczuk, N., Lapeyrie, F., Garbaye, J. 1990. Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* on roots of *Eucalyptus urophylla* *in vitro*. *New Phytologist*, 114, 627 – 631.
- Malajczuk, N., Molina, R., Trappe, J.M. 1984. Ectomycorrhiza formation in *Eucalyptus*. II. The ultrastructure of compatible and incompatible mycorrhizal fungi and associated roots. *New Phytologist*, 96, 43 – 53.
- Martin, F., Díez, J., Dell, B., Delaruelle, C. 2002. Phylogeography of the ectomycorrhizal *Pisolithus* species as inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *New Phytologist*, 153, 345 – 357.
- Martin, F., Duplessis, S., Ditengou, F., Lagrange, H., Voiblet, C., Lapeyrie, F. 2001. Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: signals and communication genes. *New Phytologist*, 151, 145 – 154.
- Martins, A. 2004. *Micorrização controlada de Castanea sativa* Mill.: Aspectos fisiológicos da micorrização *in vitro* e *ex vitro*. Dissertação de Doutoramento em Biotecnologia Vegetal. Faculdade de Ciências de Lisboa. Universidade Clássica de Lisboa.
- Martins, A. 2008. *In Vitro* Mycorrhization of Micropropagated Plants: Studies on *Castanea sativa* Mill. In: Siddiqui Z.A., Akhtar, M.S., Futai, K. (Ed.), *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*. Springer, Netherlands.

- Martins, A. 2010. Mycorrhizal inoculation of chestnut seedlings: Effect on survival and growth after transplantation. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 866, 325 – 334.
- Marx, D.H. 1969. The influence of ectotrophic fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology*, 59, 153 – 163.
- Marx, D.H., Ruehle, J.L., Cordell, C.E. 1991. Methods for studying nursery and field response of trees to specific ectomycorrhiza. In: Norris, J.R., Read, D.J., Varma, A.K. (Ed.), *Methods in Microbiology*. Academic Press, London.
- McAfee, B.J., Fortin, J.A. 1986. Competitive interactions of ectomycorrhizal mycobionts under field conditions. *Canadian Journal of Botany*, 64, 848 – 852.
- Metzler, S., Metzler, V. 1992. *Texas mushrooms*, 1st Edition. University of Texas Press, Texas.
- Miller, D.M., Buettner, G.R., Aust, S.D. 1990. Transition metals as catalysts of “antioxidation” reactions. *Free Radical Biology & Medicine*, 8, 95 – 108.
- Miller, H.E. 1971. A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, 45, 91.
- Mi-Yae, S., Tae-Hun, K., Nak-ju, S. 2003. Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus* of *Hymenochaetaceae*) extracts. *Food Chemistry*, 82, 593 – 597.
- Molina, R., Trappe, J. 1984. Mycorrhiza Management in Bareroot Nurseries. In: Duryea, M.L., Landis, T.D. (Ed.), *Forest Nursery Manual: production of bareroot seedlings*. Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers for Forest Research Laboratory, Oregon State University, Corvallis.
- Molina, R., Massicotte, H.B., Trappe, J.M. 1992. Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses: community-ecological consequences and practical implications. In: Allen, M.F. (Ed.), *Mycorrhizal functioning, an integrative plant-fungal process*. Routledge, Chapman and Hall, New York.
- Molyneux, P. 2004. The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26, 211 – 219.
- Moore, D. 1994. Tissue formation. In: Gow, N.A.R., Gadd, G.M. (Ed.), *The Growing Fungus*. Chapman & Hall, London.

- Moure, A., Franco, D., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M.J., Lema, J.M. 2000. Evaluation of extracts from *Gevuina avelana* Hulls as antioxidants. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 3890 – 3897.
- Moyersoen, B., Beever, R.E., Martin, F. 2003. Genetic diversity of *Pisolithus* in New Zealand indicates multiple long-distance dispersal from Australia. *New Phytologist*, 160, 569 – 579.
- Münzenberger, B., Hammer E., Wray, V., Schauer, F., Schmidt, J., Strack, D. 2003. Detoxification of ferulic acid by ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 13, 117 – 121.
- Münzenberger, B., Heilemann, J., Strack, D., Kottke, I., Oberwinkler, F. 1990. Phenolics of mycorrhizas and non-mycorrhizal roots of Norway spruce. *Planta*, 182, 142 – 148.
- Münzenberger, B., Kottke, I., Oberwinkler, F. 1995. Reduction of phenolics in mycorrhizas of *Larix decidua* Mill. *Tree Physiology*, 15, 191 – 196.
- Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Bento, A., Estevinho, L., Pereira, J.A. 2008. Total phenols, antioxidant potencial and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2326 – 2331.
- Oliveira, V.L., Schmidt, V.D.B., Gomes, N.C., Maia, D.C. 1994. Spécificité de champignons ectomycorhiziens vis-à-vis d'*Eucalyptus viminalis* Labill et *E. dunnii* Maiden. *Agronomie*, 14, 57 – 62.
- Pausas, J.G., Llovet, J., Rodrigo, A., Vallejo, R. 2008. Are wildfires a disaster in the Mediterranean basin? - A review. *International Journal of Wildland Fire*, 17, 713–723.
- Pietta, P., Simonetti, P., Mauri, P. 1998. Antioxidant activity of selected medicinal plants. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 46, 4487 – 4890.
- Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J., Núñez, M.J. 2004. Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). *Food Chemistry*, 85, 267 – 173.
- Price, R.A., Liston, A., Strauss, S.H. 1998. Phylogeny and systematics of *Pinus*. In: Richardson, D.M. (Ed.), *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge University Press, United Kingdom.
- Ribeiro, M.M., Plomion, C., Petit, R., Vendramin, G.G., Szmidt, A.E. 2001. Variation in chloroplast single-sequence repeats in Portuguese maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Theoretical and Applied Genetics*, 102, 97 – 103.
- Richardson, D.M. 2000. *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge University Press. United Kingdom.

- Rodrigo, A., Retana, J., Pico, F.X. 2004. Direct regeneration is not the only response of Mediterranean forests to large fires. *Ecology*, 85, 716 – 729.
- Rodríguez, J.A.S. 2006. Guia de Cogumelos do Alto Tâmega. ADRAT, Portugal.
- Roginsky, V., Lissi, E.A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92, 235 – 254.
- Roody, W.C. 2003. Mushrooms of West Virginia and the Central Appalachians. The University Press of Kentucky, Kentucky.
- Roulund, H., Alpuim, M., Varela, M.C., Aguiar, A. 1988. A Tree Improvement Plan for *Pinus pinaster* in Portugal. EFN, Lisboa.
- Rudawska, M., Kieliszewska-Rokicka, B. 1997. Mycorrhizal formation by *Paxillus involutus* in relation to their IAA-synthesizing activity. *New Phytologist*, 137, 509 – 517.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 287 – 306.
- Seif, E., Leigh, J., Liu, Y., Roewer, I., Forget, L., Lang, B.F. 2005. Comparative mitochondrial genomics in zygomycetes: bacteria-like RNase P RNAs, mobile elements and a close source of the group I intron invasion in angiosperms. *Nucleic Acids Research*, 33, 734 – 744.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152 – 178.
- Smith, S.E., Read, D.J. 1997. Mycorrhizal symbiosis, 2nd Edition. Academic Press. London.
- Stamets, P. 2000. Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms, 3rd Edition. Ten Speed Press. California.
- Steenkamp, E.T, Wrigth, J., Baldauf, S.L. 2006. The protistan origins of animals and fungi. *Molecular Biology and Evolution*, 23, 93 – 106.
- Surh, Y.J. 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer*, 10, 768 – 780.
- Temple, N. J. 2000. Antioxidants and disease: More questions than answers. *Nutrition Research*, 20, 449 – 459.

- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39, 44 – 84.
- Voigt, E.L., Oliveira, V.L., Randi, A.M. 2000. Mycorrhizal colonization and phenolic compounds accumulation on roots of *Eucalyptus dunnii* Maiden inoculated with ectomycorrhizal fungi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35, 1905 – 1910.
- von Gadov, A., Joubert, E., Hansmann.1997. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of Roobies tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherol, BHT, and BHA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 632 – 638.
- Wacker, T.L., Safir, G.R., Stephens, C.T. 1990. Effects of ferulic acid on *Glomus fasciculatum* and associated effects on phosphorus uptake and growth of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Journal of Chemical Ecology*, 16, 901 – 909.
- Walker, R.F., West, D.C., McLaughlin, S.B., Amundsen, C.C. 1989. Growth, xylem pressure potential, and nutrient absorption of loblolly pine on a reclaimed surface mine as affected by an induced *Pisolithus tinctorius* infection. *Forest Science*, 35, 569 – 581.
- Wallander, H., Söderström, B. 1999. *Paxillus*. In: Cairney, J.W.G., Chambers, S.M. (Ed.), *Ectomycorrhizal Fungi. Key Genera in Profile*. Springer-Verlag, Berlin.
- Wasser, S.P., Weiss, A.L. 1999. Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushroom: Current perspectives. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1, 31 – 62.
- Webster, J., Weber, R.W.S. 2007. *Introduction to Fungi*, 3rd Edition. Cambridge University Press, United Kingdom.
- Wolfe, K., Wu, X., Liu, R.H. 2003. Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 609 – 614.
- Wood, J.E., Senthilmohan, S.T., Peskin, A.V. 2002. Antioxidant activity of procyanidin-containing plant extracts at different pHs. *Food Chemistry*, 77, 155 – 161.
- Worrall, J.J. 1999. *Structure and Dynamics of Fungal Populations*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Wright, J.S., Johnson, E.R., DiLabio, G.A. 2001. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to

major families of antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 123, 1173 – 1183.

Zlotnik, H., Fernandez, M.P., Bowers, B., Cabib, E. 1984. *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. *Journal of Bacteriology*, 159, 1018 – 1026.

VI. ANEXOS

Anexo 1. Publicação na revista LWT – Food Science and Technology.