

**Interação entre proteínas lácteas  
e extrato aquoso de cogumelo  
*Amanita ponderosa***

**João Filipe Quelhas Figueiredo**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

**Bioquímica**

(2º ciclo de estudos)

Orientador: Professora Doutora Ana Paula Coelho Duarte

Coorientador: Professor Doutor António José Galdes de Mendonça

**janeiro de 2022**



## **Dedicatória**

Dedico esta dissertação de mestrado à minha família (pais e irmão), por todo o apoio demonstrado, coragem transmitida, e pela fé que depositaram em mim e por tudo o que me ensinaram, sendo esses os alicerces do meu conhecimento. Dedico também minha namorada Catarina, o amor da minha vida, por toda a ajuda, a paciência e carinho, tal como por toda a confiança, que sempre teve em mim. Sendo estas pessoas os grandes alicerces da minha vida, e espero que, a elaboração desta dissertação de mestrado, os faça orgulhosos de mim.

A todos eles, o meu sincero bem-haja.

## Agradecimentos

A realização de uma Dissertação de Mestrado, devido à sua finalidade acadêmica, é um trabalho individual, porém o sucesso da mesma depende de todos aqueles que nos acompanham, sejam Professores, Colegas, Amigos ou Familiares. Assim sendo, a todos os que me ajudaram, diretamente ou indiretamente, para a concretização deste objetivo, deixo expressa a minha mais sincera gratidão.

Em primeiro lugar, pretendo agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Ana Paula Duarte, bem como ao meu co-orientador, Professor Doutor António Mendonça, por toda a orientação, dedicação, espírito crítico e paciência para comigo ao longo da elaboração desta dissertação. Agradeço também pela partilha de conhecimentos, pelas valiosas sugestões que contribuíram para o desenvolvimento mais aprimorado desta dissertação, para além de toda a disponibilidade demonstrada.

Em segundo lugar, agradecer à minha família, em especial aos meus pais, por todo o amor, carinho e compreensão que me deram e por estarem sempre presentes, sendo que sem eles nunca teria conseguido atingir este objetivo.

De seguida, quero agradecer à minha namorada, Catarina, pelo seu amor, companheirismo, confiança, incentivo, por ter estado presente nesta longa caminhada e me aturar nos bons e maus momentos.

Por fim, quero agradecer a todos os meus colegas de laboratório, que de alguma forma me ajudaram a ultrapassar as dificuldades que se deparavam no meu caminho, mas quero agradecer em especial, ao meu colega Alcides Vapor, por toda a ajuda demonstrada, por todos os ensinamentos nos manuseamentos dos aparelhos das diferentes técnicas, e pela disponibilidade em me ajudar em algumas dúvidas que eu tivesse.

A todas as pessoas mencionadas, e a outras que, por falta de lembrança, de alguma forma me ajudaram a ultrapassar mais uma etapa da minha vida, o meu sincero Bem-haja!

## Resumo

Os cogumelos são dos fungos mais apreciados atualmente a nível mundial. São descritos como “todo o fungo que apresenta um corpo de frutificação distinto, sendo grande o suficiente para ser visto a olho nu e coletado manualmente”. Os cogumelos, geralmente, apresentam um teor elevado de proteínas, carboidratos, fibras, e baixo de lipídios, o que tem gerado um maior interesse geral nestes fungos, dadas as suas possíveis aplicações médicas e o seu elevado valor biológico.

Os cogumelos *Amanita ponderosa* são uma espécie de cogumelos que cresce essencialmente na Península Ibérica e na zona Mediterrânea. São altamente dependentes do tipo do solo e das condições ambientais em que se desenvolve, sendo muito apreciados gastronomicamente, dado o seu elevado consumo pela população rural e o seu valor comercial.

As amostras de cogumelo *Amanita ponderosa* usadas neste estudo foram provenientes da zona do Fundão, e o seu extrato aquoso preparado laboratorialmente. Esta espécie foi estudada com o propósito de avaliar as interações das proteínas do Leite (Caseinato de Sódio e proteína do Leite – leite reconstituído) com o extrato aquoso desta espécie de cogumelo, e assim verificar se ocorrem alterações estruturais nas proteínas, que possam potenciar ou provocar reações adversas nos seus consumidores. Com essa finalidade foram usadas algumas técnicas espectroscópicas, como a Espectroscopia de Infravermelhos com Transformada de Fourier (FTIR) e a Espectroscopia de Fluorescência, de modo a avaliar essas possíveis alterações estruturais. Através destas duas técnicas observou-se que a amostra isolada de extrato de cogumelo não apresenta vestígios da presença de proteínas. Com base no estudo de FTIR, nas amostras de extrato que interagem com amostras proteicas, quer com caseinato de sódio, quer com leite reconstituído, denotou-se uma maior estabilidade estrutural em amostras de proteínas mais concentradas, enquanto nas amostras com maior concentração de extrato de cogumelo se observa uma maior instabilidade estrutural da proteína. Por outro lado, segundo o estudo de fluorescência, nas amostras com variação da concentração de proteína, verifica-se que a fluorescência detetada é maior, quanto maior a concentração da proteína. Já no que respeita a amostras em que se verifica uma variação da concentração do extrato de cogumelo, a fluorescência detetada é tanto maior, quanto menor a concentração de extrato nas amostras.

Assim, foi possível verificar a interferência de proteínas do leite na ingestão de cogumelos em conjunto com alimentos com esse tipo de proteína. Também se verificou que o extrato de cogumelo funciona como *quencher* de fluorescência.

## **Palavras-Chave**

Cogumelos *Amanita ponderosa*; Proteínas do Leite; Estrutura das Proteínas; FTIR; Bandas de amida; Fluorescência

## Abstract

Mushrooms are among the most prized fungi in the world today. They are described as “any fungus with a distinctive fruiting body, large enough to be seen by the naked eye and collected by hand”. Generally, these fungi are high on protein, carbohydrates, fibers and low on lipids, which has led to an increased general interest on them, given its possible medical application and its high biological value.

*Amanita ponderosa* mushrooms are a specie of mushrooms that grow mainly on the Iberian Peninsula and in the Mediterranean area. They are extremely dependent on the type of soil and environmental conditions in which they grow in. Mushrooms are indeed a very appreciated delicacy given by the rural population which has increase their commercial value.

The *Amanita ponderosa* mushroom samples, used in this study, were collected at Fundão, and its aqueous extract was prepared in the laboratory. This specie was studied with the purpose of analyzing the interactions of milk proteins (Sodium Caseinate and Milk Protein - reconstituted milk) with the aqueous extract of this mushroom specie. Thereby, we can verify if there are structural alterations in the proteins, which may enhance or cause adverse reactions in its consumers. For this purpose, spectroscopic techniques such as Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Fluorescence Spectroscopy were used. Through these two techniques, we could observe that the isolated mushroom extract sample shows no traces of the presence of the proteins. Based on the FTIR-ATR, in the extract samples interacting with protein samples, either with sodium caseinate or with reconstituted milk, a greater structural stability was denoted in more concentrated protein samples, while in the samples with higher concentration of mushroom extract a greater structural instability of the protein was observed. On the other hand, in the fluorescence study, we could determine a proportional measure: more protein concentration, more fluorescence detected. Regarding the samples with varying protein concentration, we observe the opposite: more fluorescence detected, less extract founded.

Therefore, it was possible to verify the interference of milk proteins in the ingestion of mushrooms in aggregation with food containing such protein. It was also noted that the mushroom extract functions as a fluorescence *quencher*.

## Keywords

Mushrooms *Amanita ponderosa*; Milk proteins; Proteins structure; FTIR; Amide bands  
Fluorescence

# Índice

<b>1. Introdução</b>	1
1.1. Descrição Taxonómica	2
1.1.1. Género <i>Amanita</i>	2
1.1.2. Espécie <i>Amanita ponderosa</i> Maleçons & Heim	6
1.2. Atividade Biológica dos Cogumelos	8
1.3. Consumo	9
1.4. Classificação	13
1.5. Proteínas do Leite	14
1.6. Técnicas Espectroscópicas	17
1.6.1. Espectroscopia de Infravermelho	17
1.6.2. Espectroscopia de Fluorescência	21
1.7. Objetivos	22
<b>2. Materiais e Métodos</b>	23
2.1. Seleção de Amostras de Cogumelos	23
2.2. Preparação de Amostras de Cogumelos	23
2.2.1. Liofilização	23
2.2.2. Extração	23
2.2.3. Filtração	24
2.3. Preparação das Amostras Proteicas	24
2.4. Espectroscopia	24
2.4.1. Espectroscopia de Infravermelhos	24
2.4.2. Espectroscopia de Fluorescência	25
<b>3. Análise de Resultados</b>	26
3.1. Espectroscopia Infravermelho (FTIR-ATR)	26
3.1.1. Extrato de cogumelo <i>Amanita ponderosa</i>	26
3.1.1.1. Extrato no Estado Líquido (Estudo prévio)	26
3.1.1.2. Extrato no Estado Sólido	27
3.1.2. Proteína	28
3.1.3. Interação de extrato de cogumelo com as proteínas em estudo (FTIR-ATR)	33
3.1.3.1. Efeito da variação da concentração da proteína	34
3.1.3.2. Efeito da variação da concentração do extrato	44
3.2. Espectroscopia de Fluorescência	51
3.2.1. Extrato de cogumelo <i>Amanita ponderosa</i> e amostras proteicas	51
3.2.1.1. Extrato <i>Amanita ponderosa</i> em água e proteínas em solução	51

3.2.2. Interação de extrato de cogumelo com as proteínas em estudo (fluorescência)	
.....	53
3.2.2.1. Efeito da variação da concentração da proteína	53
3.2.2.2. Efeito da variação da concentração do extrato	57
<b>4. Conclusão e Perspetivas Futuras</b>	<b>61</b>
Referências Bibliográficas	64
Apêndices	73
Apêndice A: Figuras <i>Deconvolução de Fourier</i>	73
Apêndice B: Tabelas <i>Deconvolução de Fourier</i>	81

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> - Ciclo Biológico de um Cogumelo .....	2
<b>Figura 2</b> - Composição e estrutura da família das Amatoxinas, toxinas presentes nos cogumelos venenosos .....	3
<b>Figura 3</b> - Composição e estrutura da família das Falotoxinas, toxinas presentes nos cogumelos venenosos .....	4
<b>Figura 4</b> - Composição e estrutura da família das Virotoxinas, toxinas presentes em alguns cogumelos venenosos .....	5
<b>Figura 5</b> - Componentes estruturais de um cogumelo.....	7
<b>Figura 6</b> - Fotografias da espécie de cogumelos <i>Amanita ponderosa</i> , em diferentes estágios de desenvolvimento .....	13
<b>Figura 7</b> - Processo de extração de caseína a partir do leite .....	15
<b>Figura 8</b> - Processo de produção de caseinato a partir da caseína .....	16
<b>Figura 9</b> - Espectros FTIR-ATR da amostra extrato em água, em comparação com o da amostra de água pura e a de extrato com água subtraída.....	26
<b>Figura 10</b> - Espectros FTIR-ATR da amostra de extrato com água subtraída .....	27
<b>Figura 11</b> - Espectros FTIR-ATR da amostra de extrato com água subtraída, em comparação com o da amostra de extrato sólido .....	28
<b>Figura 12</b> - Espectro FTIR-ATR da solução de caseinato de sódio .....	29
<b>Figura 13</b> - Espectro FTIR-ATR da amostra de leite reconstituído .....	30
<b>Figura 14</b> - Espectros FTIR-ATR das amostras de água subtraída, amostra de leite reconstituído e de caseinato de sódio .....	32
<b>Figura 15</b> - Espectros FTIR-ATR das amostras de caseinato de sódio interagindo com o extrato, com aumento da concentração de caseinato, comparando com a amostra de extrato e de caseinato de sódio .....	34
<b>Figura 16</b> - Espectros FTIR-ATR das amostras de caseinato de sódio interagindo com o extrato, com diminuição da concentração de caseinato, comparando com a amostra de extrato e de caseinato de sódio .....	37
<b>Figura 17</b> - Espectros FTIR-ATR das amostras de leite reconstituído, interagindo com o extrato, com aumento da concentração de leite reconstituído, comparando com a amostra de extrato e de leite reconstituído .....	39
<b>Figura 18</b> - Espectros FTIR-ATR das amostras de leite reconstituído interagindo com o extrato, com diminuição da concentração de leite reconstituído, comparando com a amostra de extrato e de leite reconstituído .....	42

<b>Figura 19</b> - Espectros FTIR-ATR das amostras de caseinato de sódio interagindo com o extrato, com aumento da concentração de extrato, comparando com a amostra de extrato e de caseinato de sódio .....	44
<b>Figura 20</b> - Espectros FTIR-ATR das amostras de caseinato de sódio interagindo com o extrato, com diminuição da concentração de extrato, comparando com a amostra de extrato e de caseinato de sódio .....	47
<b>Figura 21</b> - Espectros FTIR-ATR das amostras de leite reconstituído interagindo com o extrato, com aumento da concentração de extrato, comparando com a amostra de extrato e de caseinato de sódio .....	49
<b>Figura 22</b> - Espectros FTIR-ATR das amostras de leite reconstituído interagindo com o extrato, com diminuição da concentração de extrato, comparando com a amostra de extrato e de caseinato de sódio .....	50
<b>Figura 23</b> - Espectros de emissão de fluorescência da amostra de extrato <i>Amanita ponderosa</i> em água .....	52
<b>Figura 24</b> - Espectros de emissão de fluorescência das amostras de proteínas .....	52
<b>Figura 25</b> - Espectros de emissão de fluorescência das amostras de extrato com caseinato de sódio, aumentando a concentração de proteína, em comparação com a amostra de extrato e de caseinato de sódio .....	54
<b>Figura 26</b> - Espectros de emissão de fluorescência das amostras de extrato com caseinato de sódio, diminuindo a concentração de proteína, em comparação com a amostra de caseinato de sódio .....	54
<b>Figura 27</b> - Espectros de emissão de fluorescência das amostras de extrato com leite reconstituído, aumentando a concentração de proteína em comparação com a amostra de extrato e de leite reconstituído .....	55
<b>Figura 28</b> - Espectros de fluorescência das amostras de extrato com leite reconstituído, diminuindo a concentração de proteína .....	56
<b>Figura 29</b> - Espectros de emissão de fluorescência das amostras de extrato com caseinato de sódio, aumentando a concentração de extrato, em comparação com a amostra de extrato e de caseinato de sódio .....	57
<b>Figura 30</b> - Espectros de emissão de fluorescência das amostras de extrato com caseinato de sódio, diminuindo a concentração de extrato, em comparação com a amostra de caseinato de sódio .....	57
<b>Figura 31</b> - Espectros de emissão fluorescência das amostras de extrato com leite reconstituído, aumentando a concentração de extrato, em comparação com a amostra de extrato e de leite reconstituído .....	59

**Figura 32** - Espectros de emissão de fluorescência das amostras de extrato com leite reconstituído, diminuindo a concentração de extrato, em comparação com a amostra de leite reconstituído .....59

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Principais cogumelos do género <i>Amanita</i> .....	3
<b>Tabela 2</b> - Classificação da espécie <i>Amanita ponderosa</i> .....	6
<b>Tabela 3</b> - Principais Componentes dos Cogumelos .....	10
<b>Tabela 4</b> - Categorias dos cogumelos após completa maturação .....	13
<b>Tabela 5</b> - Composição dos principais produtos da Caseína .....	16
<b>Tabela 6</b> - Composição mineral dos principais produtos da Caseína .....	17
<b>Tabela 7</b> - Atribuição das posições da banda amida I e II, e à respetiva estrutura secundária .....	20
<b>Tabela 8</b> - Deconvolução de Fourier da banda da amida I referentes à amostra de caseinato de sódio .....	29
<b>Tabela 9</b> - Deconvolução de Fourier das bandas da amida I referentes à amostra de leite reconstituído .....	31
<b>Tabela 10</b> - Concentrações utilizadas nas diferentes amostras proteicas em interação com o extrato para ensaios de FTIR-ATR .....	33
<b>Tabela 11</b> - Deconvolução de Fourier da banda de amida I referentes às amostras de caseinato de sódio interagindo com o extrato, com aumento da concentração de caseinato .....	35
<b>Tabela 12</b> - Deconvolução de Fourier da banda de amida I referentes às amostras de caseinato interagindo com o extrato, com diminuição da concentração de caseinato .....	37
<b>Tabela 13</b> - Deconvolução de Fourier da banda da amida I referentes à amostra de leite reconstituído interagindo com o extrato, com aumento da concentração de leite reconstituído .....	40
<b>Tabela 14</b> - Deconvolução de Fourier da banda de amida I referentes à amostra de leite reconstituído interagindo com o extrato, com diminuição da concentração de leite reconstituído .....	43
<b>Tabela 15</b> - Deconvolução de Fourier da banda de amida I referentes às amostras de extrato com caseinato, aumentando a concentração de extrato .....	45
<b>Tabela 16</b> - Deconvolução de Fourier da banda de amida I referentes às amostras de extrato com caseinato, diminuindo a concentração de extrato .....	47
<b>Tabela 17</b> - Deconvolução de Fourier da banda de amida I referentes às amostras de extrato com leite reconstituído, diminuindo a concentração de extrato. ....	50

## Lista de Siglas e Acrónimos

AA	$\alpha$ -amanitina
ANN	Redes Neurais Artificiais ( <i>Artificial Neuronal Network</i> )
ATR	Reflexão Total Atenuada ( <i>Attenuated total reflection</i> )
BA	$\beta$ -amanitina
DW	Peso Seco ( <i>Dry Weight</i> )
E.D.	Estrutura Desordenada
FTIR-ATR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier usando Reflexão Total Atenuada ( <i>Fourier-transform infrared spectroscopic method with attenuated total reflectance</i> )
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier ( <i>Fourier-transform infrared spectroscopic</i> )
GA	$\gamma$ -amanitina
LA	<i>Lactalbumina</i>
LG	<i>Lactoglobulina</i>
IDR	Ingestão Diária Recomendada
IRE	Elemento de Reflexão Interna ( <i>Internal Reflection Elemente</i> )
IV	Infravermelho
MC	Micelas de Caseínas
MIR	Região Infravermelho -médio ( <i>Mid-infrared</i> )
mRNA	RNA mensageiro
PCD	Falacidina
PHD	Faloídina
PHS	Falisina
PNA	Polissacarídeos Não-Amiláceos
PPS	Complexo Proteína-Polissacarídeos
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
UV	Ultravioleta

# Capítulo 1

## Introdução

Os Fungos são organismos eucariotas pertencentes ao reino *Fungi*, no qual se incluem os microrganismos como as leveduras e bolores, e também os cogumelos, que são os fungos mais comuns (Mizuno, 1995). Normalmente, os cogumelos são organismos multicelulares que carecem de clorofila, e sem capacidade de produzir os seus próprios alimentos, pelo que necessitam de absorver nutrientes da matéria orgânica em decomposição (saprófitas) ou através de organismos vivos (parasitas) (Barceloux, 2008).

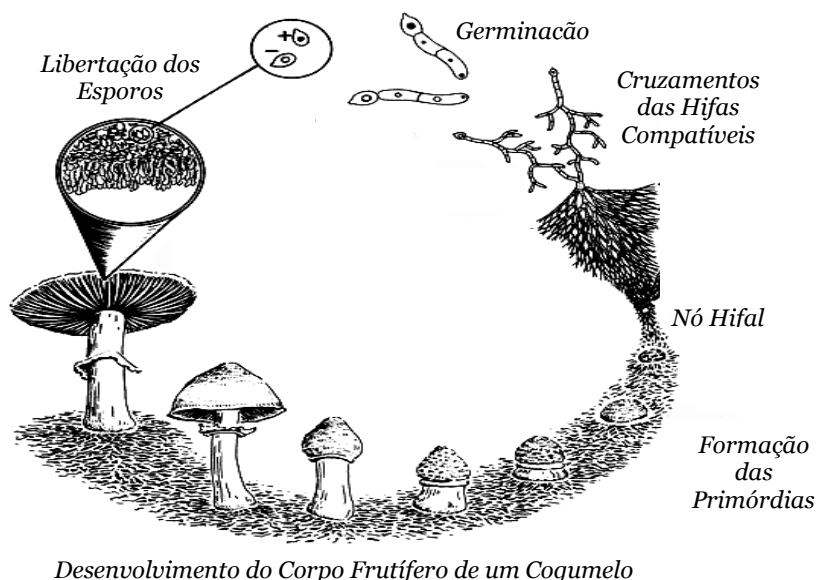
O Reino *Fungi* encontra-se dividido em seis Filos: *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota*, *Glomeromycota*, *Microsporidia*, e *Zygomycota*, incluindo-se nestes grupos uma grande variedade de organismos, de unicelulares a multicelulares. Os cogumelos, que pertencem ao Filo *Basidiomycota*, são considerados macrofungos ou fungos superiores, isto é, caracterizam-se por produzirem estruturas reprodutoras que são claramente visíveis a olho nu (Barceloux, 2008).

Num sentido mais alargado, o cogumelo foi definido como sendo “um macrofungo com um corpo frutífero distinto, que tanto pode ter uma germinação epígea como hipógea, e suficientemente grande para ser visto a olho nu e ser colhido à mão” (Chang & Miles, 1992). Assim, os cogumelos não precisam de apresentar as características mais habituais, como pertencerem ao Filo *Basidiomycota*, aéreos, carnudos e comestíveis; mas podem por outro lado, pertencer ao Filo *Ascomycota*, crescer no subsolo, apresentar uma textura não-fibrosa e não comestíveis (Chang, 2008). Esta definição pode ser aceite como base para estimar o número de cogumelos presentes na Terra (Hawksworth, 2001).

Um cogumelo, como o vemos a olho nu, é apenas a parte visível e reprodutora de um organismo, sendo o ciclo de vida dos cogumelos (figura 1) um ciclo rápido, no qual se verifica a formação de esporos, fundamentais para a reprodução dos cogumelos. Estes esporos são produzidos e libertados quando as condições ambientais (humidade, temperatura e nutrientes) são as ideais permitindo a germinação das hifas (Stamets, 1993). Estas são filamentos muito finos, que no seu conjunto se designam de Micélio, sendo que o processo de transformação dos esporos em micélio pode demorar alguns dias (Barceloux, 2008; Chang & Miles, 2004). O Micélio pode aglomerar-se e formar uma rede miceliana, que permite colonizar o substrato e obter nutrientes importantes para o seu crescimento. É também no Micélio que, após reunidas algumas condições essenciais (a secreção de enzimas digestivas; a absorção de nutrientes através das paredes celulares), é possível ocorrer a

diferenciação das estruturas resultantes da aglomeração das hifas, com o objetivo de produção de esporos. Essas estruturas obtidas do processo de aglomeração, que vulgarmente chamamos de cogumelos, são denominadas de esporóforo ou corpo frutífero (Barceloux, 2008; Baptista-Ferreira, 2013).

O Micélio vai absorvendo energia necessária para se reproduzir, o que permite que este gere novas hifas à superfície. Estas hifas desenvolvem-se formando os corpos de frutificação (estruturas complexas formadoras de esporos), sendo a sua aparência afetada pelas condições ambientais, tais como humidade e temperatura. O tamanho, a forma, a cor e o exame microscópico dos esporos são alguns dos parâmetros que ajudam na correta identificação das espécies de cogumelos (Chang e Miles, 2004).



**Figura 1** - Ciclo Biológico de um Cogumelo (Adaptado de Stamets, 1993).

## 1.1. Descrição Taxonómica

### 1.1.1. Género *Amanita*

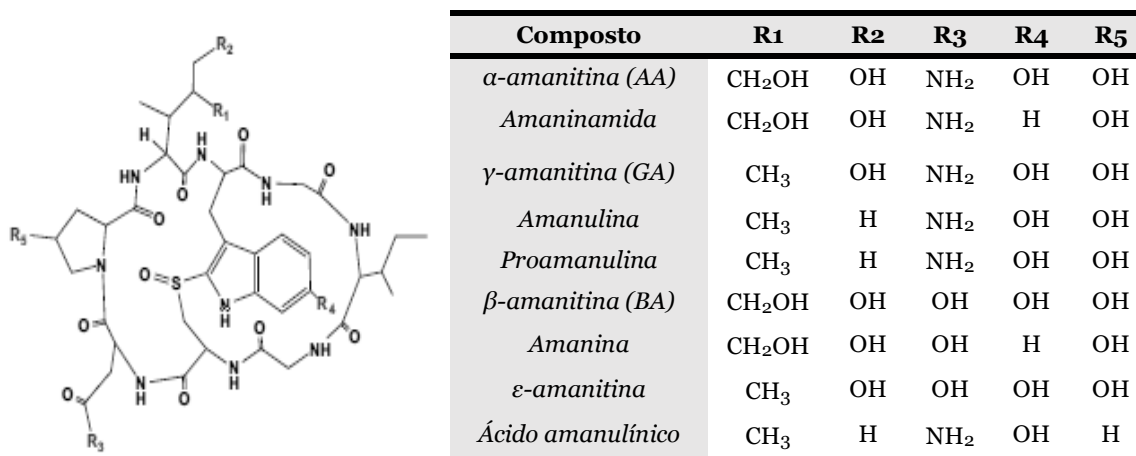
O Género *Amanita*, um dos mais conhecidos da ordem *Agaricales*, é um género de cogumelos, que inclui a maioria dos cogumelos tóxicos para o ser humano, e dos quais 900 a 1000 espécies diferentes já foram descritas (Tavassoli *et al.*, 2019). Estas espécies são muito importantes para o Homem, uma vez que podem ser comestíveis, porém em alguns casos podem ser venenosas e, eventualmente letais (Shi *et al.*, 2011; Salvador *et al.*, 2018), sendo responsáveis por 90 a 95% das intoxicações por ingestão de cogumelos (Garcia *et al.*,

2015a; Tavassoli *et al.*, 2019). Os principais cogumelos deste género encontram-se indicados na tabela 1.

**Tabela 1** – Principais cogumelos do género *Amanita* (Enjalbert *et al.*, 2002; Garcia *et al.*, 2015a; Tavassoli *et al.*, 2019).

Principais cogumelos do género <i>Amanita</i>	
<i>Amanita bisporigera</i>	<i>Amanita decipiens</i>
<i>Amanita hygrosopica</i>	<i>Amanita ocreata</i>
<i>Amanita muscaria</i>	<i>Amanita nauseosa</i>
<i>Amanita phalloides</i>	<i>Amanita smithiana</i>
<i>Amanita suballiacea</i>	<i>Amanita tenuifolia</i>
<i>Amanita thiersii</i>	<i>Amanita verna</i>
<i>Amanita virgineoides</i>	<i>Amanita virosa</i>

A possível letalidade dos cogumelos venenosos encontra-se associada aos diferentes ciclopéptidos presentes e, em especial, à amatoxina. Esta toxina, proveniente da família de octapéptidos bicíclicos, é produzida por algumas espécies de cogumelos (filo *Basidiomycota*, classe *Agaricomycetes*, ordem *Agaricales*) (Sgambelluri *et al.*, 2014). Apresenta uma massa molar de, aproximadamente, 900 g/mol (Garcia *et al.*, 2015a), sendo mais abundante no chapéu (figura 5) do cogumelo (Garcia *et al.*, 2015b). A composição do grupo de amatoxinas, bem como as suas estruturas, são apresentadas na figura 2.

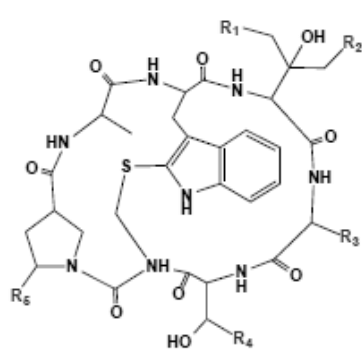


**Figura 2** – Composição e estrutura da família das Amatoxinas, toxinas presentes nos cogumelos venenosos (Garcia *et al.*, 2015a).

Esta toxina liga-se e inibe a RNA polimerase II, enzima vital na síntese de mRNA, microRNA, e de pequenos RNA nucleares, o que provoca uma interrupção da síntese de proteínas e, conseqüentemente, a morte celular (Tavassoli *et al.*, 2019). Esta inibição, aliada à sua grande resistência ao calor e ao trato digestivo, e a sua captação intestinal e celular ativa, permite considerar as amatoxinas como as principais agentes responsáveis pelo envenenamento humano, por intoxicação com cogumelos venenosos (Sgambelluri *et al.*,

2014; Garcia *et al.*, 2015a). Os sintomas mais frequentes dessa intoxicação incluem a insuficiência hepática aguda, havendo, em casos mais graves, a necessidade de se proceder a um transplante hepático (Sgambelluri *et al.*, 2014; Tavassoli *et al.*, 2019). Além das consequências graves que podem ocorrer a nível hepático, também se podem verificar insuficiência renal aguda, pelo que é muito importante que o paciente receba uma rápida terapia, caso contrário, a taxa de mortalidade é elevada (Shi *et al.*, 2011). Há casos, como nas intoxicações por ingestão dos cogumelos *Amanita muscaria* e *Amanita pantherina*, que contêm o ácido ibotênico e o muscimol, substâncias que produzem efeitos alucinogênicos além da insuficiência renal aguda (Tavassoli *et al.*, 2019).

Por outro lado, são também detetadas outras toxinas importantes nestes cogumelos, as falotoxinas e, em alguns, as virotoxinas. As falotoxinas são uma classe pertencente aos heptapéptidos bicíclicos, que se ligam à F-actina. Esta ligação estabiliza os filamentos de actina e evita a despolimerização de microfilamentos, perturbando a correta função do citoesqueleto, sendo então as responsáveis pelo bloqueio da despolimerização de F-actina (Enjalbert, *et al.* 1992; Garcia *et al.*, 2015a). Esta forte ligação à F-actina influencia a sua reduzida contribuição para a toxicidade, uma vez que não ocorre absorção no trato gastrointestinal (Tavassoli *et al.*, 2019). É na volva (figura 5) que esta toxina se apresenta em quantidades mais elevadas (Garcia *et al.*, 2015b). A constituição do grupo relativo a estas toxinas e as suas estruturas são observadas na figura 3.

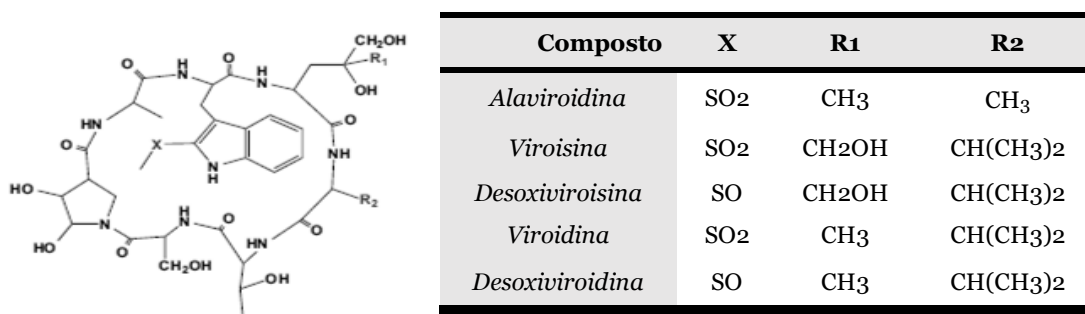


Composto	R1	R2	R3	R4	R5
<i>Falisina (PHS)</i>	OH	OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH
<i>Faloídina (PHD)</i>	OH	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH
<i>Faloína</i>	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH
<i>Profalina</i>	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
<i>Falisacina</i>	OH	OH	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COOH	OH
<i>Falacidina (PCD)</i>	OH	H	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COOH	OH
<i>Falacina</i>	H	H	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COOH	OH

**Figura 3** – Composição e estrutura da família das Falotoxinas, toxinas presentes nos cogumelos venenosos (Garcia *et al.*, 2015a).

As virotoxinas, presentes em alguns cogumelos, são péptidos monocíclicos, com uma estrutura e atividade biológica muito idêntica à das falotoxinas, o que sugere que ambas compartilham vias precursoras comuns, ou seja, derivam biossinteticamente de falotoxinas (Garcia *et al.*, 2015a; Tavassoli *et al.*, 2019). Estes dois tipos de toxinas são muito idênticos, uma vez que ambos apresentam efeitos tóxicos limitados após exposição oral, e a nível molecular, ambas interagem com a F-actina, o que vai impedir a despolimerização de microfilamentos, e por consequência afeta o adequado funcionamento do citoesqueleto (Garcia *et al.*, 2015a; Tavassoli *et al.*, 2019). Porém, as virotoxinas interagem

molecularmente com a actina de forma mais fraca que as falotoxinas, já que apresentam uma estrutura mais flexível e, ainda, a existência de dois grupos hidroxilos adicionais, o que pode provocar uma reatividade diferente destas toxinas (Garcia *et al.*, 2015a). A composição e as estruturas do grupo de virotoxinas são apresentadas na figura 4.



**Figura 4** – Composição e estrutura da família das Virotoxinas, toxinas presentes em alguns cogumelos venenosos (Garcia *et al.*, 2015a).

Apesar das falotoxinas e das virotoxinas agirem mais rapidamente que as amatoxinas, estas são muito mais tóxicas (10 a 20 vezes mais), e por esse motivo são as principais responsáveis pelas fatalidades que podem ocorrer. A principal propriedade físico-química de grande parte destas toxinas é a sua elevada resistência ao calor e aos processamentos alimentares, como o fritar ou grelhar, pelo que não são eliminadas completamente mesmo após os cogumelos serem cozinhados. Destacar também que a ação destas toxinas, no ser humano, pode durar entre 10 a 15 horas (Tavassoli *et al.*, 2019). Por isso, como forma de combater estas intoxicações, é importante uma rápida e adequada identificação dos cogumelos *Amanita*, para um melhor diagnóstico da intoxicação e, posterior, extração dessas toxinas (Shi *et al.*, 2011). A forma mais convencional de identificação de cogumelos baseia-se na morfologia do corpo frutífero e dos esporos. No entanto, não apresenta as características químicas que permitam um melhor uso e colheita dos cogumelos (Liu *et al.*, 2006). A importância dessas características distintivas é ainda maior, uma vez que existem várias espécies morfológicamente semelhantes, o que pode provocar confusões durante a sua colheita. Por exemplo, a espécie *Amanita ponderosa* (comestível) é muito semelhante à *Amanita boudieri* (tóxica), e às espécies *Amanita phalloides* e *Amanita verna*, ambas mortais. Estes enganos são mais suscetíveis de acontecer em estágios mais jovens, isto é, quando os cogumelos não se apresentam completamente maturados, essencialmente quando o seu corpo frutífero ainda se encontra totalmente envolvido pelo seu véu universal (Baptista-Ferreira, 2013). Por isso, é de especial importância uma adequada distinção de espécies de cogumelos, mesmo que pertençam ao mesmo género, dadas as semelhanças entre espécies comestíveis e venenosas (Meenu & Xu, 2019).

### 1.1.2. Espécie *Amanita ponderosa* Maleçons & Heim

A espécie de cogumelo *Amanita ponderosa*, vulgarmente chamada de *Silarca*, *Tortulho* ou *Míscaro* em Portugal e *Gurumelo* em Espanha, é um cogumelo grande, selvagem e comestível (Salvador *et al.*, 2018). Taxonomicamente falando, esta espécie pertence ao Género *Amanita*, sendo as restantes categorias taxonómicas observadas na tabela 2.

**Tabela 2** – Classificação da espécie *Amanita ponderosa*.

<b>Domínio</b>	<i>Eukaryota</i>
<b>Reino</b>	<i>Fungi</i>
<b>Filo</b>	<i>Basidiomycota</i>
<b>Classe</b>	<i>Agaricomycetes</i> ,
<b>Ordem</b>	<i>Agaricales</i>
<b>Família</b>	<i>Amanitaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Amanita</i>
<b>Espécie</b>	<i>Amanita ponderosa</i>

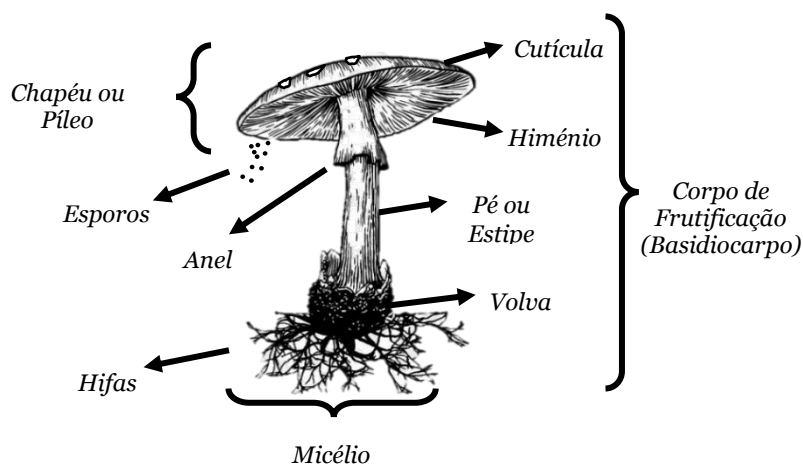
Esta espécie foi descrita pela primeira vez em 1942, por *Malençon & Heim*. É uma espécie muito abundante no sudoeste da Península Ibérica (Salvador *et al.*, 2012). Em Portugal, foi detetada pela primeira vez na Serra de Monchique (Moreno-Rojas *et al.*, 2004), e atualmente, é mais predominante em Espanha (Andaluzia), em Portugal (regiões do Alentejo interior e Trás-os-Montes, e no Distrito de Castelo Branco), em Marrocos, e mais raramente, em Itália (Salvador *et al.*, 2013; Baptista-Ferreira, 2013).

A nível da descrição estrutural da espécie em estudo, apresenta várias características importantes, destacando-se as várias estruturas, quer macroscópicas, quer microscópicas, que é possível observar na figura 5. A espécie *Amanita ponderosa* é caracterizada por possuir um grande e robusto corpo de frutificação (*Basidiocarpo*), estrutura responsável pelo suporte dos basídios, que são as células produtoras de basidiósporo, isto é, esporos produzidos sexualmente por fungos do filo *Basidiomycota* (Salvador *et al.*, 2013).

A nível macroscópico, pode verificar-se uma grande variedade de estruturas que ajudam na identificação desta espécie. O seu chapéu (ou píleo) apresenta um diâmetro variável e a sua morfologia modifica-se ao longo dos diferentes estágios de desenvolvimento. Assim, quando jovem é hemisférico, e quando maduro apresenta uma morfologia plano-convexa, com uma ligeira depressão no centro (Moreno-Rojas *et al.*, 2004). A beira do chapéu é curvada para dentro com a possibilidade apresentar o que resta de um véu parcial. O himénio, nesta espécie, é constituído principalmente por lâminas largas, apresentando uma

coloração esbranquiçada quando jovens, passando a rosa ou acastanhada com a maturidade ou se a estrutura estiver seca (Salvador *et al.*, 2013). O seu pé (ou estipe) é cilíndrico, variando entre o parcialmente liso a ligeiramente fibriloso. A sua cloração é mais pálida do que a do chapéu. O anel visível é pouco claro, normalmente é quebrado pelo crescimento do corpo de frutificação, sendo que o que resta deste cerca o pé sob a forma de pequenos fios, sendo pouco definido e fugaz (Salvador *et al.*, 2012). Na base do pé é possível detetar uma estrutura membranosa persistente e espessa, a volva, que tem a capacidade de se apresentar sob uma forma saciforme (sob a forma de saco), tendo uma coloração igual ao resto do corpo de frutificação. Por fim, a “carne” é muito compacta e firme, variando a sua coloração com o contacto com o ar, passando de branca a rosada, tendo como propriedades organoléticas, o sabor pungente e o odor a terra húmida (Moreno-Rojas *et al.*, 2004).

Quando se estudam estes cogumelos ao microscópio, podem-se observar três estruturas primordiais: o basídio, a cutícula e os esporos. (Salvador *et al.*, 2013). Os basídios são tetráspóricos claviformes (sob forma de clave), apresentando esporos amilóides elípticos, lisos e transparentes, com um apículo lateral. Os esporos, apresentam uma coloração branca quando frescos e creme quando secos, podendo encontrarem-se espalhados ou aglomerados. A cutícula é lisa, de cor creme quando jovem, tornando-se castanha-avermelhada com o amadurecimento e/ou por danos físicos (Moreno-Rojas *et al.*, 2004).



**Figura 5** – Componentes estruturais de um cogumelo. (Adaptado do sítio: [https://melbournechapter.net/explore/drawing-mushroom-fungus/#gal\\_post\\_5060\\_acid-drawing-mushroom-5.png](https://melbournechapter.net/explore/drawing-mushroom-fungus/#gal_post_5060_acid-drawing-mushroom-5.png) . Acedido no dia 12 de outubro de 2020).

Os cogumelos apresentam relações simbióticas, e no caso dos cogumelos *Amanita ponderosa*, estes apresentam-nas com azinheiros e sobreiros (Salvador *et al.*, 2013). Os cogumelos são seres que não conseguem produzir o seu próprio alimento, pelo que absorvem o mesmo através destas relações simbióticas e através da decomposição da matéria orgânica (Barceloux, 2008). De referir ainda, que a espécie *Amanita ponderosa* exhibe um hábito semi-hipógeo, uma vez que, nos primeiros estágios de desenvolvimento

crece subterraneamente, acabando por emergir parcial ou totalmente, após a expansão do chapéu (Salvador *et al.*, 2013).

## **1.2. Atividade Biológica dos Cogumelos**

Nos últimos anos, tem-se verificado um aumento do interesse nas propriedades medicinais dos cogumelos que ajudam o organismo a combater e a prevenir doenças, estimando-se que das 14000-15000 espécies de cogumelos conhecidas, apenas 10 a 15% sejam conhecidas (Hawksworth, 2001; Lindequist *et al.*, 2005). Das espécies conhecidas calcula-se que cerca de 700 possuam propriedades medicinais, mas estima-se que existam outras 1800 com potenciais atributos medicinais (Chang & Miles, 2004). Os cogumelos medicinais não têm um propósito culinário, mas contêm componentes bioativos com grande aplicação medicinal (Cheung, 2010; Salvador *et al.*, 2018). Estes cogumelos são denominados de cogumelos nutracêuticos, tendo sido definidos como um “suplemento dietético que fornece uma forma concentrada de um presumível agente bioativo de um alimento, apresentado em matriz não alimentar, e usado para melhorar a saúde em níveis de dosagem superiores aos que poderiam ser obtidos a partir de alimentos normais.” (Zeisel, 1999). É usado para descrever uma classe de compostos que são extraídos do micélio ou do corpo de frutificação do cogumelo, incorporando as características nutricionais e medicinais de ambas as estruturas (Chang & Buswell, 1996). Normalmente, é consumido sob a forma de cápsula ou comprimidos (Chang & Miles, 2004). Estudos reportaram as propriedades medicinais em cogumelos comestíveis, como propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anti-tumorais e/ou anti-hiperglicémicas (Kaewnarin *et al.*, 2016). Com efeito, os cogumelos são muito ricos em antioxidantes, o que pode impedir danos causados por radicais livres e reduzir o risco de doenças, sendo também usados como suplementos dietéticos, bem como alimentos funcionais (Diplock *et al.*, 1998; Salvador *et al.*, 2015; Ganesan & Xu, 2018).

O estudo dos cogumelos tem evidenciado essas propriedades que os tornam produtos de grande interesse para os consumidores, desde que se encontrem em boas condições e sejam recolhidos adequadamente. Nos últimos tempos, um crescente número de investigadores tem vindo a verificar os efeitos positivos dos cogumelos nas mais diversificadas áreas científicas: na atividade imunomodulatória, antiviral e anti-tumoral (Borchers *et al.*, 1999; Borchers *et al.*, 2004; Moradali *et al.*, 2007); na atividade antidiabética (Kim *et al.*, 2005; Kaur *et al.*, 2015); com potencial antioxidante (Cheung *et al.*, 2003; Puttaraju *et al.*, 2006; Barros *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2008a); na atividade antibacteriana (Suay *et al.*, 2000; Shittu *et al.*, 2005; Adams & Frostick, 2008; Alves, *et al.*, 2013); nos efeitos anti-obesidade (Zhang *et al.*, 2012a; Amin *et al.*, 2012; Ganesan & Xu, 2018); e na atividade anti-

inflamatória (Elsayed *et al.*, 2014; Taofiq *et al.*, 2015; Taofiq *et al.*, 2016). Destacam-se também alguns estudos (Lindequist *et al.*, 2005; Friedman *et al.*, 2016; Cör *et al.*, 2018) que abordam algumas destas áreas em conjunto.

Relativamente ao cogumelo *Amanita ponderosa* destacam-se os seguintes estudos: avaliação dos efeitos que o meio ambiente pode provocar nestes cogumelos (Moreno-Rojas *et al.*, 2004); do potencial destes cogumelos como fonte de novos compostos hipercolesterémicos (Gil-Ramirez *et al.*, 2011); estudo da inibição da atividade da lipase pancreática provocada pelos cogumelos (Palanisamy *et al.*, 2012); a modelagem de dados moleculares e inorgânicos, desta espécie de cogumelos, usando redes neuronais artificiais (ANN, Artificial Neuronal Networks) (Salvador *et al.*, 2013); o estudo que se baseia na caracterização dos polissacáridos ligados a proteínas bioativas (complexos proteína-polissacarídeos - PPS) produzidas por culturas de cogumelos *Amanita ponderosa* (Salvador *et al.*, 2015); por fim, um estudo que efetuou a análise da composição inorgânica dos *corpos de frutificação* dos cogumelos *Amanita ponderosa* (Salvador *et al.*, 2018).

### **1.3. Consumo**

Os cogumelos comestíveis são muito apreciados gastronomicamente, tendo um elevado potencial de exportação (Salvador *et al.*, 2012). Além disso, o seu interesse tem aumentado devido à sua importância a nível nutricional e medicinal (Ribeiro *et al.*, 2008b). Os cogumelos são considerados um alimento saudável porque apresentam um baixo conteúdo de gorduras e colesterol, fornecendo um baixo nível de energia (360-419 kcal/Kg). No entanto, são uma fonte importante de proteínas minerais, de compostos de alto valor biológico (vitaminas) e glúcidos, contribuindo para o fornecimento de micro e macronutrientes (Chiocchetti *et al.*, 2019; Gómez-Flores *et al.*, 2019). Este aumento de interesse e, conseqüentemente, consumo deve-se principalmente a três características essenciais: às propriedades organoléticas (palatabilidade), à sua composição química; e às suas propriedades medicinais. Relativamente às propriedades organoléticas dos cogumelos comestíveis, estes apresentam algumas características, como cor, paladar, textura, sabor e odor, que os tornam atrativos para consumo humano (Salvador *et al.*, 2013; Ganesan & Xu, 2018). Relativamente à composição química estes apresentam um elevado valor nutricional uma vez que, apresentam algumas características importantes com impacto no corpo humano e protegem de doenças. Esta composição e, por conseguinte, o conteúdo nutricional dos cogumelos varia de acordo com fatores como: a espécie e o seu grau de maturação; a região, época do ano e tipo de solo onde se desenvolve (Gómez-Flores *et al.*, 2019); a existência de plantas parasíticas nas áreas circundantes, e parâmetros

meteorológicos, como a temperatura e precipitação (Meenu & Xu, 2019). Os principais componentes dos cogumelos constam da tabela 3 (Chang e Miles, 2004; Salvador *et al.*, 2013).

**Tabela 3** – Principais Componentes dos Cogumelos (Salvador *et al.*, 2013; Chang e Miles, 2004).

Conteúdo Elevado	Conteúdo Reduzido
Proteínas	
Aminoácidos	Lípidos
Fibras Dietéticas	Glúcidos
Vitaminas	Minerais ( <i>Cu, Zn, Mn, Mo, Cd</i> )
Minerais ( <i>K, P, Na, Ca, Mg</i> )	

Relativamente aos lípidos, verifica-se a presença de várias classes de compostos lipídicos, como ácidos gordos livres; mono-, di-, triglicerídeos; esteróis, ésteres de esteróis e fosfolipídios, nos cogumelos comestíveis. Nestes cogumelos detetam-se também ácidos gordos insaturados, em especial, o ácido linoleico, essencial para a nossa dieta. Além disso, apresentam uma concentração baixa de ácidos gordos saturados, prejudiciais para a saúde (Chang e Miles, 2004).

A nível dos glúcidos, existem dois tipos: os digeríveis e os não-digeríveis. No grupo dos glúcidos digeríveis apresentam-se compostos como a glicose, o manitol e o glicogénio. A baixa presença de glicose e a alta de manitol é benéfica para os diabéticos, e também o facto de os cogumelos serem uma fonte reduzida de energia, favorece a perda de peso (Cheung, 2010; Ganesan & Xu, 2018). Os não digeríveis incluem oligossacarídeos, como a treolose, e os polissacarídeos não-amiláceos (PNA), como a quitina e os  $\beta$ -glucanos. Os PNAs são a maior porção de glúcidos presentes nos cogumelos, e também podem ser considerados como fibras dietéticas, o que acarreta benefícios para os seres humanos (Cheung, 2010). A fibra é uma peça-chave para uma dieta equilibrada e saudável. A sua presença nos cogumelos torna-os uma importante fonte de fibras alimentares, constituídas principalmente por fibras insolúveis (a quitina e os  $\beta$ -glucanos) (Chiocchetti *et al.*, 2019). No entanto, o seu teor é variável, existindo cogumelos que apresentam baixo teor, como os casos dos *Tremella fuciformis* (1,4%DW), *Tricholoma giganteum* (4,5%DW), e *Boletus edulis* (8%DW), em contrapartida com os cogumelos *Tuber melanosporum* (27,9%DW) e *Ganoderma tsugae* (73,4%DW), que apresentam um teor de fibras mais elevado (Cheung, 2010). Em geral, 100g de cogumelos frescos fornecem 5% a 25% de ingestão diária recomendada (IDR) de fibra dietética (Manzi *et al.*, 2001).

O teor de proteína em cogumelos comestíveis é dependente da espécie e do estágio de desenvolvimento do corpo frutífero, variando entre os 15% e os 35% do seu peso seco (Cheung, 2010). Os aminoácidos são um indicador importante de valor nutricional, uma vez

que alguns contribuem para o sabor muito atrativo dos cogumelos, o que os torna cativantes para consumo humano (Ribeiro *et al.*, 2008b). Além disso, aminoácidos essenciais como a lisina, metionina, triptofano, treonina, valina, leucina e fenilalanina encontram-se presentes na maioria das espécies de cogumelos comestíveis (Meenu & Xu, 2019). Este tipo de cogumelo é considerado uma importante fonte de vitaminas, destacando-se o elevado teor de vitaminas do complexo-B, principalmente a riboflavina (B2) e a niacina (B3), também se detetando, na maioria dos cogumelos, vestígios de outras vitaminas do mesmo complexo, como a vitamina B1 (tiamina), B7 (biotina), e B12 (cobalamina), para além de vitaminas C (ácido ascórbico) e E (tocoferol) (Chang e Miles, 2004; Guillamón *et al.*, 2010; Salvador *et al.*, 2018). Por outro lado, o ergocalciferol (vitamina D2), praticamente não se deteta, detetando-se sim um dos seus precursores, o ergosterol (Provitamina D2), que na presença de radiação UV da luz solar é convertido em vitamina D2 (Cheung, 2010; Salvador *et al.*, 2018). Os cogumelos são, assim, a única fonte não animal de vitamina D, estando por esse motivo, muito enraizados na alimentação das pessoas que não ingerem produtos de origem animal. Além deste precursor, também se detetaram vestígios de um outro, o  $\beta$ -caroteno, precursor da vitamina A (Guillamón *et al.*, 2010).

Considerando os minerais presentes nos cogumelos, os que se encontram presentes no substrato são absorvidos pelo micélio e translocados para os esporóforos (Chang e Miles, 2004). Elementos minerais, como o Cádmio (Cd), Mercúrio (Hg) e Cobre (Cu) acumulam-se principalmente nos esporóforos, sendo que elementos como o Chumbo (Pb) e o Ferro (Fe) se acumulam principalmente no substrato. Já outros minerais, como o Zinco (Zn) e o Manganês (Mn), encontram-se em concentrações semelhantes quer no esporóforo, quer no substrato. Segundo Kalac e Svoboda, as maiores concentrações destes metais ocorrem, em geral, nos cogumelos cujos esporóforos são mais jovens (Kalac & Svoboda, 2000). Outro elemento importante é o Arsénio (As) presente em elevadas concentrações nalguns cogumelos. Também se apresenta sob uma grande variedade de formas químicas e, até mesmo, na sua forma inorgânica (Arsenieto,  $As^{3+}$ ), a espécie mais tóxica destes compostos nos alimentos (Chiocchetti *et al.*, 2019). Também presentes estão o Cálcio (Ca), Fósforo (P), Potássio (K), Magnésio (Mg) e Sódio (Na), havendo também outros elementos vestigiais, como o Boro (B), Vanádio (V) e o Selénio (Se) (Vetter, 2005; Meenu & Xu, 2019).

A composição mineral e orgânica dos cogumelos é variável com o ecossistema onde o cogumelo está inserido. As concentrações destes elementos tóxicos podem ser altas mesmo quando coletados em zonas não contaminadas. Por exemplo, este pode acumular elevadas concentrações de alguns elementos tóxicos, dadas as relações simbióticas que este realize com algumas plantas nos seus habitats, sendo assim importante determinar o seu conteúdo inorgânico, antes de uma eventual comercialização (Salvador *et al.*, 2012; Salvador *et al.*, 2018; Chiocchetti *et al.*, 2019). Também importante é a apropriada diferenciação e

identificação dos cogumelos comestíveis dada a grande diversidade de cogumelos presentes na natureza (Salvador *et al.*, 2012).

Alguns cogumelos apresentam outros compostos químicos na sua constituição, como o caso dos alcaloides. Num sentido mais amplo, os alcaloides são definidos como “qualquer composto químico biologicamente ativo e heterocíclico, que contém nitrogénios, podendo apresentar alguma atividade farmacológica, e em muitos casos, de uso medicinal” (Aniszewski, 2007). A classificação dos alcaloides baseia-se nos aminoácidos dos quais provém o seu átomo de nitrogénio (N) e parte do seu esqueleto (Aniszewski, 2007). Em vários estudos tem-se verificado que a maior quantidade de alcaloides presentes nos cogumelos, se encontram no *Chapéu* e no *Pé* (ou estipe) (Ribeiro *et al.*, 2008). Em alguns cogumelos, verificou-se a presença de alcaloides e taninos, como no estudo de Dabbour e Takruri. Estudo esse que indicou a possibilidade de os alcaloides poderem levar à necrose hepática, enquanto os taninos podem provocar a uma diminuição da absorção de aminoácidos e minerais, sendo letais quando a sua concentração nos alimentos é superior a 2% (Dabbour e Takruri, 2002). Outro exemplo da presença de alcaloides em cogumelos é o caso da Muscarina, um alcaloide extremamente venenoso presente em cogumelos, como a *Amanita muscaria*, que tem uma ação semelhante á acetilcolina, já que causa a inibição cardíaca e a estimulação do trato gastrointestinal (Chang e Miles, 2004).

Todos estes compostos bioativos são excelentes antioxidantes e agentes anti-inflamatórios benéficos para o Sistema Nervoso Central (SNC), coração, rim e fígado, e podendo ainda atuar como agentes quimiopreventivos e protegerem de doenças mais graves (como a diabetes, doenças neurodegenerativas ou cardiovasculares) (Ganesan & Xu, 2018).

Como forma de determinar a qualidade dos cogumelos é importante ter em atenção alguns parâmetros de qualidade, como, por exemplo, a perecibilidade dos cogumelos, já que Normalmente, são dos produtos alimentares mais perecíveis, com um tempo de vida útil máximo de 3 a 4 dias, à temperatura ambiente. Este facto deve-se aos cogumelos não possuírem uma cutícula que ofereça proteção contra a perda de água, ataques microbianos e danos físicos. A título de exemplo, os cogumelos podem ser facilmente danificados por stress físico durante a colheita, manuseio ou transporte do mesmo, o que vai desencadear um processo de escurecimento das amostras de cogumelos colhidas, sendo a principal causa de perda de valor económico no mercado. Um outro parâmetro qualitativo é o período decorrido entre a colheita e a entrega no mercado, sendo este muito importante para um qualquer país exportador de cogumelos (O’Gorman *et al.*, 2010; Meenu & Xu, 2019). A maioria dos produtores mistura cogumelos de alta qualidade com outros de qualidade inferior, a fim de obter benefícios económicos, sendo bastante difícil para a consumidor comum conseguir distingui-los visualmente (Meenu & Xu, 2019).

## 1.4. Classificação

Os cogumelos podem ser classificados de três formas distintas: uma é baseada na sua aplicação na vida humana, após este se encontrar completamente maturado; outra, através das suas características anatómicas observadas a olho nu, e por fim, uma outra classificando-os tendo em conta a sua importância ecológica (Chang, 2008; Baptista-Ferreira, 2013).

Analisando os cogumelos que, após um período de crescimento e sob condições favoráveis, se encontrem completamente maturados, é possível agrupá-los em três categorias principais, apresentadas na tabela 4.

**Tabela 4** – Categorias dos cogumelos após completa maturação (Adaptado de Chang, 2008).

Categoria	Características	Exemplos
Comestíveis	Apresentam a estrutura frutífera carnuda e comestível	<i>Amanita ponderosa</i> (figura 6) <i>Tricholoma terreum</i>
Medicinais	Apresentam-se como fonte de compostos biologicamente ativos de valor medicinal	<i>Ganoderma lucidum</i> <i>Lentinula edodes</i>
Venenosos	Apresentam substâncias tóxicas e causam grandes danos quando ingeridos pelos seres humanos, podendo provocar sérios problemas de saúde	<i>Amanita phalloides</i> <i>Amanita verna</i>



**Figura 6** – Fotografias da espécie de cogumelos comestível *Amanita ponderosa*, em diferentes estágios de desenvolvimento.

Uma outra categoria que existe são os cogumelos comestíveis condicionais, que são venenosos na sua forma bruta ou apresentam um sabor amargo. Nestes cogumelos, após o cozedura, as substâncias tóxicas dissolvem-se na água, tornando-se viáveis para consumo humano. Outros cogumelos tornam-se comestíveis após serem processados, por secagem, imersão ou outros pré-tratamentos. É de salientar que alguns destes cogumelos apresentam

um sabor agradável (Govorushko *et al.*, 2019). Para além destes, existem outros que ainda não foram corretamente identificados, não sendo possível uma correta classificação. Esta classificação não é única, absoluta nem exclusiva, verificando-se casos em que os cogumelos, para além de ser comestíveis, apresentam outras qualidades medicinais, que os permitem ser agrupados em mais que uma destas categorias (Chang, 2008).

## 1.5. Proteínas do Leite

As proteínas do leite são, desde há muito, conhecidas pelo seu valor nutricional elevado, boa digestibilidade e o seu alto teor de aminoácidos essenciais (Hambraeus & Lonnerdal, 2003) quando comparadas com as restantes proteínas, sendo, por isso, um elemento importante na dieta humana, constituindo-se como uma fonte importante de nitrogénio e aminoácidos essenciais (Sindayikengera *et al.*, 2006). Estas proteínas são também os grandes impulsionadores da formação de estruturas em produtos lácteos (Corredig *et al.*, 2019). Os dois principais grupos proteicos do leite são as proteínas do soro e as caseínas, sendo que estas últimas representam cerca de 80% do total de quantidade proteica (Sarode *et al.*, 2016). Estes dois grupos são isolados do leite através de dois tipos de precipitação: ácida e isoelétrica (Sindayikengera *et al.*, 2006).

As proteínas do soro mais abundantes são as  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -LA) e a  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG), que representam, respetivamente, 25 e 65% do total das proteínas do soro no leite (Corredig *et al.*, 2019).

As caseínas do leite são o componente proteico mais importante aí existente, sendo consideradas como uma família de fosfoproteínas hidrofóbicas. Estas contêm entre 0,7 a 0,9% de fósforo, ligando-se covalentemente às proteínas através de uma ligação serina-éster (Sarode *et al.*, 2016). A caseína é uma fonte rica de aminoácidos essenciais, excetuando a cisteína, sendo por isso considerada como “proteína muito nutritiva” (Sarode *et al.*, 2016). São glicoproteínas fosforiladas com duas cisteínas, que se ligam por pontes de dissulfureto intermoleculares. Apresentam também estruturas externas flexíveis, caracterizadas como aleatórias, ao invés da maioria das proteínas, que apresentam estruturas secundárias e terciárias definidas (Sirocic *et al.*, 2016).

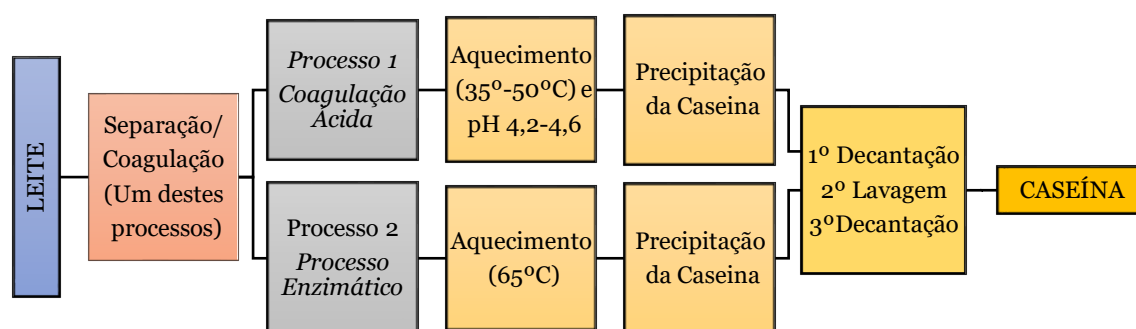
O principal papel dado às caseínas é a capacidade de ligação e de transporte de minerais, em especial, de cálcio e fósforo (Pereira *et al.*, 2014). Estas proteínas não são solúveis em água nem em meios pouco ácidos, mas são dispersíveis em soluções salinas neutras (Chandra, 2015), sendo também proteínas flexíveis e termicamente estáveis (Sindayikengera *et al.*, 2006). De referir ainda que, estas proteínas não são desnaturáveis, uma vez que não possuem estrutura terciária (Belitz *et al.*, 2009).

As principais frações das caseínas são:  $\alpha_{s1}$ -caseína, que representa 40% das caseínas, sendo a única que sofre glicosilação;  $\alpha_{s2}$ -caseína, que representa 10%;  $\beta$ -caseína, cerca de 35%;  $\kappa$ -caseína, que representa cerca de 15% (Sarode *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2019). Estas frações adaptam a sua estrutura às mudanças ambientais, como o pH, força iónica, temperatura ou a presença de enzimas, e agrupam-se de forma a originar agregados coloidais, designados de micelas de caseínas (MC) (Corredig *et al.*, 2019, Silva *et al.*, 2019). São partículas porosas, polidispersas e altamente hidratadas. Apresentam um diâmetro médio de 200 nm, sendo constituídas, basicamente, por moléculas de caseínas, água e minerais, em especial os sais de fosfato de cálcio (Silva *et al.*, 2019), que constituem entre 6% a 8% da massa total das MC (Corredig *et al.*, 2019).

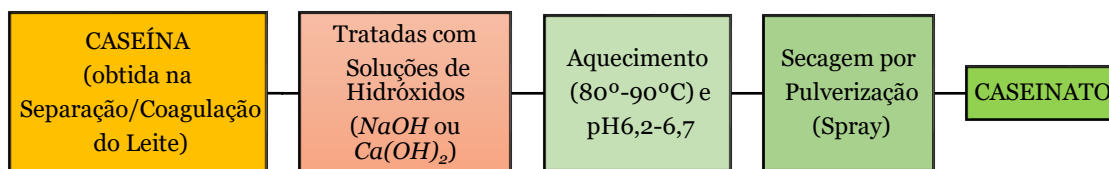
As proteínas do leite são reconhecidas como uma das principais fontes de péptidos bioativos. Após o consumo de produtos lácteos, os peptídeos com atividades fisiológicas são libertados destas proteínas, por ação de enzimas proteolíticas no intestino, e podem influenciar os principais sistemas do organismo (Chandra, 2014). As caseínas dão origem a vários peptídeos bioativos, com vários benefícios na saúde humana, onde se incluem ações sobre os sistemas nervoso, cardiovascular, digestivo e imunológico. Estas devem-se à capacidade antioxidante, imunomodulatória, citomodulatória, antitrombótica e anti-hipertensiva dos diferentes peptídeos bioativos (Phelan *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2014).

Os peptídeos bioativos são definidos como tendo uma atividade hormonal e/ou farmacológica, que pode regular a função fisiológica através de interações de ligação a recetores específicos em células-alvo, conduzindo a respostas fisiológicas específicas (Fitzgerald & Murray, 2006).

Dadas as características das caseínas não é possível o seu estudo específico neste trabalho, uma vez que as caseínas não se dissolvem em água. Por este motivo utiliza-se a fração de caseínas, obtidas a partir do leite reconstituído (leite em pó), bem como a forma de caseína mais comum para utilização industrial, o caseinato de sódio. Este composto é uma mistura das quatro frações da caseína, que formam complexos e agregados quando em solução (Singh *et al.*, 2003), e que são obtidos através de uma sequência de processos que são apresentados nas figuras 7 e 8.



**Figura 7** – Processo de extração de caseínas a partir do leite (Adaptado de Belitz *et al.*, 2009).



**Figura 8** – Processo de produção de caseinato a partir da caseína (Adaptado de Belitz et al., 2009).

A extração de caseína, isto é, a separação e coagulação da caseína do leite (figura 7), pode ser obtida através de dois processos de aquecimento: acidificação do leite (pela adição de ácidos ou através da fermentação com ácido láctico), ou a ação de enzimas proteínases (como a pepsina) (Belitz *et al.*, 2009). Aquando da coagulação ácida do leite, se atingida a temperatura de 35-50°C e pH 4,2-4,6, as caseínas acabam por precipitar e, após processos de decantação e lavagem, permite obter a fração de caseínas. Por outro lado, quando se opta pelo processo enzimático, a temperatura atingida é superior ao processo anterior, podendo chegar aos 65°C (Belitz *et al.*, 2009).

Para a produção de caseinato (figura 8), são utilizadas dispersões de caseínas obtidas a partir da separação e coagulação do leite. Estas dispersões são tratadas com soluções de hidróxidos de sódio (NaOH) ou de cálcio (Ca(OH)<sub>2</sub>), a uma temperatura de 80-90°C e pH 6,2-6,7. Ao produto solubilizado é então efetuada uma secagem por pulverização (spray), sendo obtido o caseinato (Belitz *et al.*, 2009).

Na tabela 5 apresenta-se a composição típica da caseína mais comum, ácida, e a dos dois tipos de caseinatos mais usados industrialmente, o de sódio e o de cálcio, através da qual se podem comparar, com base em alguns parâmetros (humidade, proteína, cinzas, lactose, gordura e pH).

**Tabela 5** – Composição dos principais produtos da Caseína (Adaptado de Sarode, *et al.*, 2016).

Parâmetros	Produtos de Caseínas		
	Caseína (Ácida)	Caseinato de Sódio	Caseinato de Cálcio
Humidade (%)	12,0	3,8	3,8
Proteína (%)	90,0	91,4	91,2
Cinzas (%)	2,5	3,8	3,6
Lactose (%)	1,0	0,1	0,1
Gordura (%)	2,0	1,1	1,1
pH		6,5-6,9	6,8-7,0

A nível da composição destaca-se o facto de as amostras de caseinato apresentarem um menor teor de humidade que a caseína, devido a estes serem obtidos através de secagem por pulverização, e, por consequência, apresentam um maior teor de proteínas. Nas amostras de caseinato realça-se o maior teor de cinzas e o menor de lactose e gordura, quando comparada com a amostra de caseína (Sarode *et al.*, 2016). As duas amostras de

caseinato, de sódio e de cálcio, apresentam diferentes composições minerais, destacadas na tabela 6 (Sarode *et al.*, 2016).

**Tabela 6** – Composição mineral dos principais produtos da Caseína (Adaptado de Sarode *et al.*, 2016).

<b>Minerais</b>	Caseinato de Sódio	Caseinato de Cálcio
Na (%)	1,2-1,4	0,1
Ca (%)	0,1	1,3-1,6
Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	3-20	10-40
Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	1-2	1-2
Pb (mg kg <sup>-1</sup> )	<1	<1

A fração de caseínas e os caseinatos têm diversas utilidades, quer alimentares, quer não, destacando-se a sua utilização alimentar no enriquecimento de alimentos em proteínas, na estabilização de certas propriedades físicas de carnes processadas ou em medicamentos dietéticos. Já a nível não alimentar, são muito utilizadas no fabrico de colas impermeáveis, no revestimento para papéis de melhor qualidade ou na indústria têxtil (Belitz *et al.*, 2009).

## 1.6. Técnicas Espectroscópicas

As principais técnicas espectroscópicas, como a de Infravermelho (IV), onde se integra a Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier usando Reflexão Total Atenuada (FTIR-ATR); e a de Fluorescência, são técnicas muito utilizadas para estudar a interação ligando-proteína e a caracterização estrutural das proteínas, devido a algumas características importantes, como a sua elevada sensibilidade e reprodutibilidade. Estas técnicas, baseadas em espectroscopia, estão relacionadas com a deteção e análise de radiação transmitida pela amostra em estudo, em consequência da interação entre moléculas e biomoléculas (Zhang *et al.*, 2012b).

### 1.6.1. Espectroscopia de Infravermelho

A espectroscopia de infravermelho (IV) é uma das técnicas experimentais mais usadas para a caracterização estrutural das proteínas e péptidos e, também para a caracterização das suas interações com as membranas lipídicas (Tatulian, 2019). A estimativa da composição da estrutura secundária é uma das mais importantes informações, obtidas por esta técnica, para o estudo de uma proteína de estrutura desconhecida (Bunaciu *et al.*, 2014). Esta

espectroscopia é definida como a medição da radiação IV emitida por um material ou mistura em função do número de onda (ou frequência), sendo o espectro de IV o gráfico resultante desta análise. Este espectro permite caracterizar a intensidade e forma das diferentes bandas detetadas, sendo o número de onda expresso em centímetros recíprocos ( $\text{cm}^{-1}$ ) (Pavia *et al.*, 2010). O número de onda é diretamente proporcional à energia de radiação eletromagnética, isto é, um maior o número de onda corresponde a uma maior energia; mas por outro lado, é inversamente proporcional ao comprimento de onda (Pavia *et al.*, 2010).

Uma vantagem muito importante da espectroscopia FTIR para caracterização estrutural é a não dependência do estado físico da amostra, ou seja, as amostras podem ser prontamente analisadas como soluções orgânicas, dispersões não homogêneas ou sólidos. Assim sendo, as proteínas podem ser estudadas por espectroscopia de FTIR em todos esses estados físicos (Bunaciu *et al.*, 2014). Esta técnica oferece outras vantagens adicionais como: uma maior sensibilidade; permite determinar a orientação das proteínas ligadas à membrana; e a inexistência de problemas ao nível da dispersão de luz, que pode ocorrer noutros métodos (dicroísmo circular e fluorescência). A facilidade experimental, tempo de medição curto, baixa quantidade de amostra necessária e o baixo custo envolvido, tornam este método experimental muito utilizado para estudos estruturais (Barth, 2007; Tatulian, 2019). A capacidade de todas as ligações polares contribuírem para a absorção infravermelha é um ponto fundamental para a espectroscopia no IV, uma vez que, praticamente todas as biomoléculas absorvem esta radiação. No entanto, os espectros de moléculas maiores apresentam bandas sobrepostas, o que dificulta a sua análise, já que muita da informação pode estar escondida sob as bandas de absorção mais amplas e sem apresentar bandas características específicas (Barth, 2007).

A FTIR-ATR é uma técnica não destrutiva, que permite a análise rápida de uma gama diversificada de amostras. Não necessita de reagentes e apresenta alta produtividade, sendo útil para caracterização estrutural de proteínas e polipeptídeos (Yang *et al.*, 2015).

A reflexão total atenuada (ATR) é uma técnica experimental muito importante na espectroscopia no IV, devido à ocorrência da reflexão da luz num cristal de alto índice de refração, denominado de elemento de reflexão interna (IRE) (Ruyschaert & Raussens, 2018). Esta técnica é uma das poucas técnicas estruturais de baixa resolução que permite distinguir entre as conformações paralelas e antiparalelas da estrutura folha- $\beta$ , muito importantes para o estudo, por exemplo, de proteínas amilóides. Os espectros obtidos são complexos e permitem obter informações valiosas sobre as diferentes conformações presentes na estrutura secundária das proteínas, resultando em bandas de absorção diferentes (O’Gorman *et al.*, 2010; Bunaciu *et al.*, 2014). A técnica de ATR apresenta também outras vantagens, em especial para amostras biológicas e macromoleculares, como

o facto de a amostra poder estar em contacto com a superfície e a possível remoção do excesso de água (o sinal de água líquida no espectro pode ser reduzido ou eliminado). Outra vantagem importante é o facto de se trabalhar diretamente na superfície do IRE (Ruyschaert & Raussens, 2018).

A gama de números de onda, nos espectros, varia entre os 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  (situada na região *mid-infrared* - MIR), sendo dividida, normalmente, em quatro regiões. A primeira, situada entre os 4000 e 1800  $\text{cm}^{-1}$ , é associada à absorção devido ao modo de estiramento da ligação do grupo hidroxilo; a segunda, registada entre os 1800 e os 1500  $\text{cm}^{-1}$ , é associada ao grupo carbonilo e à ligação dupla Carbono-Carbono; a terceira região, entre os 1500 e 1200  $\text{cm}^{-1}$ , encontra-se associada de diferentes formas a proteínas, polissacarídeos e lípidos. Nesta terceira região encontram-se algumas bandas que são características de vibrações e deformações de ligações, como por exemplo: a deformação das ligações  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  e a vibração de alongamento de COO (1458-1420  $\text{cm}^{-1}$ ); a ligação de COH e deformação de  $\text{CH}_2$  (1320  $\text{cm}^{-1}$ ); e o estiramento de CO (1260-1236  $\text{cm}^{-1}$ ). A região situada entre os 1200 e os 700  $\text{cm}^{-1}$ , é dominada por bandas de polissacarídeos, onde as bandas normalmente fracas, situadas entre os 950 e 750  $\text{cm}^{-1}$ , são úteis na identificação da configuração anomérica do polissacarídeo (Liu *et al.*, 2006; Zhao, *et al.*, 2006). A região mais sensível aos componentes da estrutura secundária da proteína é a região situada entre 1800-1500  $\text{cm}^{-1}$ , sendo por isso a região espectral analisada ao longo deste trabalho. Nesta região, a zona espectral mais intimamente relacionada com cada elemento da estrutura secundária das proteínas está situada entre os 1700 e os 1600  $\text{cm}^{-1}$ , zona característica da banda da amida I, banda esta que se deve, em grande parte (cerca de 76%), às bandas de estiramento CO das ligações peptídicas (Bunaciu *et al.*, 2014, Tatulian, 2019). A restante parte deve-se às bandas de estiramento da ligação CN (11%) e à deformação da ligação CCN (8%) fora do plano, e à banda de dobramento da ligação NH no plano (5%) (Barth, 2007; Pavia *et al.*, 2010; Tatulian, 2019). Por outro lado, a banda da amida II, situada entre 1580 e 1480  $\text{cm}^{-1}$ , é mais complexa do que a amida I, e deriva da banda de dobramento da ligação NH no plano (45% da energia potencial) e da banda de estiramento da ligação CN (30%) (Pavia *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2015; Tatulian, 2019). A restante percentagem encontra-se dividida entre a banda de dobramento da ligação CO (10%) e as bandas de estiramento da ligação CC (8%) e NC (7%) (Barth, 2007; Pavia *et al.*, 2010, Tatulian, 2019). À banda da amida III atribui-se a região espectral compreendida entre os 1350 e 1200  $\text{cm}^{-1}$  (Wang *et al.*, 2019). A banda da amida III e outras bandas vibracionais de amida (amidas A e B, e amidas IV, V, VI e VII, em ordem decrescente de frequência) são bandas muito complexas, e dependem de vários fatores (o campo de força, a natureza das cadeias laterais, e da ligação de hidrogénio), o que as torna de pouca utilidade prática para estudos conformacionais das proteínas (Carbonaro & Nucara, 2010; Yang *et al.*, 2015).

Assim sendo, a estrutura secundária da proteína é determinada, principalmente, a partir da forma da banda da amida I, mas também da banda da amida II, ainda que de forma mais complexa (Barth, 2007). Por esse motivo, ainda são poucos os estudos que utilizam a banda de amida II para determinar a estrutura secundária da proteína numa amostra (Adochitei & Drochioiu, 2011; Bunaciu et al., 2014).

No presente trabalho serão analisadas as duas bandas, mas de forma mais detalhada a banda da amida I, visto que esta apresenta uma elevada sensibilidade à estrutura secundária, sendo por isso, a banda mais estudada (Pelton & McLean, 2000; Ahmed-Ouameur et al., 2006; Nafisi et al., 2012; Zhang *et al.*, 2012b; Abrosimova *et al.*, 2016).

Devido às composições e às variações estruturais, determinadas pela espectroscopia de FTIR, serem muito complexas e, de forma a aumentar a resolução espectral nas regiões das bandas anteriormente mencionadas, foi aplicada a *Deconvolução de Fourier*, que permite adquirir espectros de melhor resolução (Ahmed-Ouameur *et al.*, 2006).

A realização da *Deconvolução de Fourier* para além de facilitar a interpretação qualitativa do espectro de IV, fornece uma base para uma análise quantitativa da estrutura secundária da proteína. Consequentemente, é possível atribuir a estrutura secundária às posições das bandas de amida deconvoluídas, tendo como base o valor máximo de cada sinal deconvoluido e comparar com o ponto médio das bandas de Amida I (referidas por John Pelton e Larry McLean), o que se pode observar na tabela 7 (Pelton & McLean, 2000). Nesta também é possível comparar os dados obtidos com os pontos médios da banda da amida II, de dois estudos (Adochitei & Drochioiu, 2011; Bunaciu *et al.*, 2014), que estudaram a obtenção da estrutura secundária de uma proteína através da análise dessa banda.

**Tabela 7** - Atribuição das posições da banda amida I (Pelton & McLean, 2000<sup>A</sup>) e II (Adochitei & Drochioiu, 2011<sup>B</sup>; Bunaciu et al., 2014<sup>C</sup>) à respetiva estrutura secundária.

Estrutura Secundária	Banda Amida I (cm <sup>-1</sup> ) <sup>A</sup>	Banda Amida II (cm <sup>-1</sup> ) <sup>B</sup>	Banda Amida II (cm <sup>-1</sup> ) <sup>C</sup>
Folha-β Antiparalelas ( <i>β-Sheet</i> )	1626 1680 (fraco)	---	---
Volta-β ( <i>β-Turn</i> )	1665 1688	1528;1577	---
Hélice-α ( <i>α-Hélix</i> )	1654	1545	1545-1551
Estrutura Desordenada (E.D.) ( <i>Random Coil</i> )	1646	---	---
Folha-β Paralelas ( <i>β-Sheet</i> )	1633	1530	1521-1525

A subtração de dois espectros (Espectroscopia Diferencial) é uma forma de simplificar um espectro experimental e extrair bandas sobrepostas, podendo revelar as diferenças entre

dois espectros semelhantes, e assim fornecer informações mais detalhadas sobre alterações conformacionais em proteínas (Shi *et al.*, 2011; Adochitei & Drochioiu, 2011).

### 1.6.2. Espectroscopia de Fluorescência

Luminescência, de raiz latina *lumen*, significa *luz*, foi introduzida por Wiedemann, em 1888, para os fenômenos de luz não dependentes do aumento da temperatura. Por definição, este fenômeno é a “emissão espontânea de radiação de uma espécie eletronicamente ou vibracionalmente excitada não equilibrada termicamente com o seu meio ambiente.” (Braslavsky, 2007).

Os diferentes tipos de luminescência são definidos tendo em atenção o seu modo de excitação, destacando-se a fotoluminescência, que é a emissão de luz proveniente da fotoexcitação direta das espécies emissoras. As duas principais formas usadas atualmente são a fluorescência e fosforescência. Em 1925, Perrin verificou pela primeira vez, a existência de uma condição essencial para que se possa observar a fosforescência, espécie excitada que passe por um estado intermédio antes da emissão (Valeur & Berberan-Santos, 2011). Na atualidade, a fluorescência, ocorre, essencialmente, em sistemas químicos gasosos, líquidos ou sólidos, e é o resultado de um processo de três estágios: excitação, estado excitado e emissão de fluorescência. Sendo um processo que ocorre em poucos nanossegundos (ns), sendo este um intervalo de tempo nos quais muitos processos ocorrem a nível molecular. Assim, a fluorescência fornece informações muito importantes sobre a dinâmica e estrutura molecular dos sistemas em estudo. As moléculas, onde estes fenômenos de fluorescência ocorrem, são denominados de fluoróforos ou marcadores fluorescentes (Warner *et al.*, 1975).

A fluorimetria é uma técnica que permite determinar quantitativa e qualitativamente substâncias que têm a capacidade de emitir fluorescência. O método fluorimétrico tem-se tornado cada vez mais importante devido à sua alta sensibilidade (cerca de 100 vezes superior à da espectroscopia UV-visível) e maior seletividade, já que nem todas as substâncias que absorvem radiação eletromagnética são capazes de emitir fluorescência. Assim sendo, o seu campo de aplicação limita-se apenas a moléculas capazes de emitir fluorescência (Santos *et al.*, 2010).

A alteração espectral observada na ligação de um fluoróforo à proteína é uma ferramenta poderosa para investigar a topologia do sítio de ligação e as mudanças conformacionais e caracterização do substrato ligado (Li *et al.*, 2014).

A Fluorescência pode ser estudada, tanto para acompanhar o percurso de uma proteína ou fármaco marcado com um fluoróforo, como para o estudo da influência de uma molécula

sobre a fluorescência intrínseca de uma proteína, devido aos aminoácidos fluorescentes. Os aminoácidos que apresentam estas propriedades fluorescente são eles próprios fluoróforos, sendo os casos da Fenilalanina (Phe), da Tirosina (Tyr), e principalmente, do Triptofano (Trp), os que apresentam cadeias aromáticas. O aminoácido Trp domina a fluorescência de proteínas e, em geral, absorve a luz a 280nm e emite-a a 340nm na região do UV (Lakowicz, 2006).

As alterações verificadas num espectro de fluorescência de resíduos de aminoácido podem ser causadas por alterações no ambiente em que se encontra, podendo provocar modificações ao nível da conformação das proteínas. Por exemplo, quando uma determinada proteína sofre uma alteração estrutural, um aminoácido pode ter a sua área de exposição ao solvente alterada, ou pode ter a sua interação com outros aminoácidos modificada. Estas mudanças podem estar refletidas no espectro de fluorescência (Lakowicz, 2006).

## 1.7. Objetivos

O problema subjacente que origina este trabalho é verificar se os componentes dos cogumelos interagem com as proteínas do leite ou não, dado que a ingestão de cogumelos em conjunto com produtos lácteos pode provocar transtornos gastrointestinais.

O presente trabalho visa ao estudo da interação de extratos aquosos de cogumelos *Amanita ponderosa* com proteínas do leite de modo a avaliar se as interações originam alterações da estrutura secundária e/ou terciária das proteínas, que possam potenciar ou provocar reações adversas no consumidor.

Assim, no presente trabalho são estudadas as interações entre os extratos aquosos provenientes da amostra de cogumelo *Amanita ponderosa* analisado, com a fração de caseínas (obtidas a partir do Leite reconstituído) e caseinato de sódio. As interações são analisadas através de duas técnicas espectroscópicas: Infravermelho (FTIR) e Fluorescência.

## Capítulo 2

### Materiais e Métodos

#### 2.1. Seleção de Amostras de Cogumelos

Os cogumelos da espécie *Amanita ponderosa* foram recolhidos na zona do Fundão e congelados (-20°C) até ao início do estudo.

Os cogumelos, ainda congelados, foram fragmentados em pequenos pedaços e introduzidos em tubos tipo *Falcon* tarados, e posteriormente, pesados para controlo da massa de cogumelo presente. De seguida, estes tubos foram colocados novamente no congelador.

#### 2.2. Preparação de Amostras de Cogumelos

##### 2.2.1. Liofilização

As amostras de cogumelos, preparadas em 2.1., presentes nos tubos foram tapadas com *Parafilm* e foram efetuados pequenos furos nessa cobertura, para que ocorresse a libertação de água das amostras. De seguida, foram congeladas (a uma temperatura de -80°C) durante cerca de 15 a 20 minutos. Após esse período, os tubos *Falcon* foram, rapidamente, retirados do congelador e colocados no liofilizador ScanVac CoolSafe (*LaboGene's, Holanda*). Os tubos permaneceram no aparelho durante 3 dias, e após esse tempo verificou-se por meio de pesagem, se as amostras se encontravam secas ou não. Caso estas não se encontrassem secas voltariam a ser colocadas no liofilizador mais 3 dias.

##### 2.2.2. Extração

As amostras de cogumelo liofilizado, preparadas em 2.2.1., presentes nos tubos *Falcon* (3g) foram moídas num almofariz e, posteriormente, transferidas para um novo tubo *Falcon*, ao qual se adicionou 30 mL de água ultrapurificada (mili-Q). Após o líquido cobrir toda a amostra foi introduzido um agitador magnético. O tubo foi colocado no interior de um copo com água, e este foi colocado numa placa de aquecimento com agitação magnética. O

processo de extração com água quente durou, aproximadamente, 8 horas, a uma velocidade de 1100 rpm e a uma temperatura de 35°C, aproximadamente. Após 8 horas, a placa de aquecimento foi desligada, mantendo-se em agitação durante mais 1,5 dias.

### 2.2.3. Filtração

Neste processo foi utilizado um papel de filtro Whatman nº 541 (GE Healthcare Life Science, *Chicago, Illinois, USA*), com o objetivo de reter as partículas sólidas provenientes da amostra obtida do processo de extração (2.2.2.), separando-as do líquido. Realizou-se a filtração a vácuo. O filtrado (extrato) foi colocado num tubo *Falcon* na câmara frigorífica (5°C) e o material sólido que ficou depositado no filtro foi desprezado, tal como aconteceu com o papel de filtro.

Após a filtração a vácuo, no caso do filtrado se encontrar escuro, realizava-se uma nova extração com agitação durante 2 dias, após os quais se voltou a realizar nova Filtração. Caso se encontrasse claro, era guardado no congelador. No início, verificou-se o pH da amostra, que era 4,68.

## 2.3. Preparação das amostras de proteínas

As proteínas estudadas foram o caseinato de sódio (36mg/mL) e a fração de caseínas (45 mg/mL), obtidas a partir do leite reconstituído (leite em pó magro – Páturages), sendo que ambas as amostras foram preparadas em solução tampão fosfato 0,1M e pH 7,4. Esta diferença de concentrações de proteína, deve-se ao facto de a amostra de leite reconstituído apresentar apenas 80% de caseínas, enquanto a amostra de caseinato de sódio apresenta 100%. De referir, que todas as soluções foram preparadas com água ultrapurificada (mili-Q).

## 2.4. Espectroscopia

### 2.4.1. Espectroscopia de Infravermelhos

Os espectros das amostras analisadas foram obtidos através do espectrómetro Nicolet iS10 (Thermo Scientific, *Waltham, Massachusetts, EUA*). A partir da amostra obtida em 2.3.,

foram pipetados 10  $\mu\text{L}$  de amostra e colocados sobre o cristal do aparelho, com o objetivo de elucidar acerca da estrutura secundária da proteína. Todos os espectros foram obtidos pelo método ATR com uma resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$  efetuando 64 varreduras (*Scans*), tendo, os referidos espectros, sido registados nas faixas de frequência de 400 a  $4000\text{ cm}^{-1}$ , em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 e temperatura ambiente. Os espectros foram analisados através do software OMNIC Specta (versão 9.2.86, Thermo Scientific, *Waltham, Massachusetts, EUA*), normalizados e acertada a sua linha de base, e são o resultado da média dos espectros registados durante as *Scans* realizadas.

Os valores das absorvâncias relativas às soluções tampão registados foram subtraídos aos valores das absorvâncias das restantes amostras analisadas, bem como os valores relativos à água ultrapurificada (mili-Q). As composições da estrutura secundária do extrato com os dois complexos proteicos analisados (com o caseinato de sódio, ou com a fração de caseínas, obtidas do leite reconstituído) foram estimadas pelos espectros de FTIR e os resultados ajustados pela *Deconvolução de Fourier*.

#### 2.4.2. Espectroscopia de Fluorescência

As medições de Fluorescência das amostras analisadas foram realizadas no Espectrofluorímetro FluoroMax-4 (HORIBA Jobin Yvon, Madrid, Espanha). Os ensaios foram realizados numa célula de quartzo (Hellma Analytics, Alemanha) de 3,5mL, com o percurso ótico de 1 cm. Os espectros de emissão foram registados no intervalo de comprimentos de onda de 295 a 795 nm, com incremento de 1 nm, após uma excitação a 280nm. As larguras de bandas (*Slit*) de Excitação e Emissão foram, ambas, ajustadas a 3 nm. Todos os espectros foram obtidos através do *software* informático FluorEssence v.3.5 (HORIBA Jobin Yvon, Madrid, Espanha) e através dele, foi possível obter um espectro de correção do sinal. Cada espectro processado é o resultado da média da acumulação de 3 espectros individuais.

## Capítulo 3

### Análise de Resultados

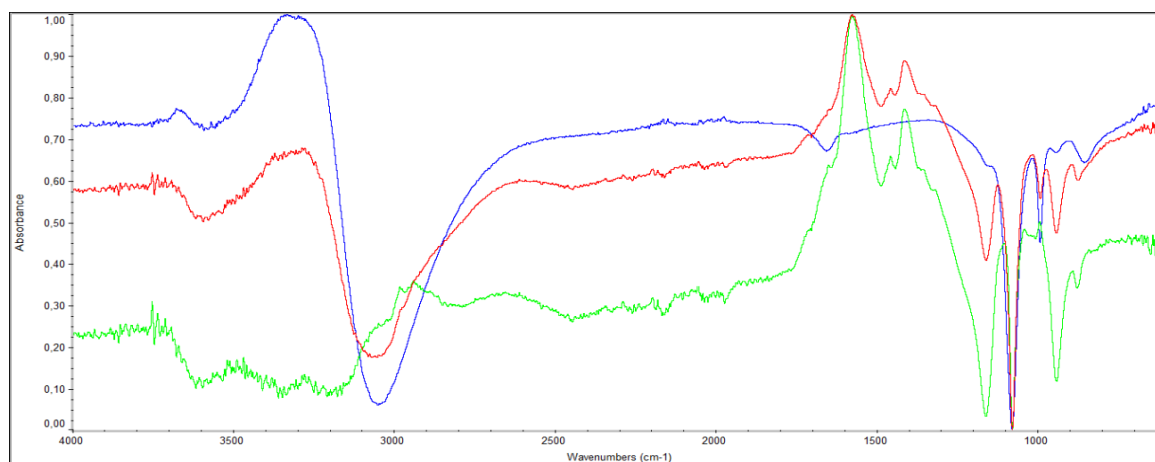
#### 3.1. Espectroscopia Infravermelho (FTIR-ATR)

##### 3.1.1. Extrato de cogumelos *Amanita ponderosa*

Utilizaram-se amostras provenientes de extratos obtidos a partir de cogumelos *Amanita ponderosa*, preparados previamente em 2.

##### 3.1.1.1. Extrato no Estado Líquido (Estudo prévio)

Foram pipetados 10 $\mu$ L da amostra de extrato (de cogumelo preparado previamente em 2.) em água (figura 9 – A), sendo depositados sobre o cristal de ATR do aparelho FTIR, e foi adquirido o espectro da amostra, de acordo com 2.4.1.. Após isto, o espectro da amostra de água pura (figura 9 – B), previamente registado nas mesmas condições experimentais, foi subtraído ao espectro da amostra A (figura 9), obtendo-se assim o espectro de extrato (de cogumelo preparado previamente em 2.) com água subtraída (figura 9 – C).



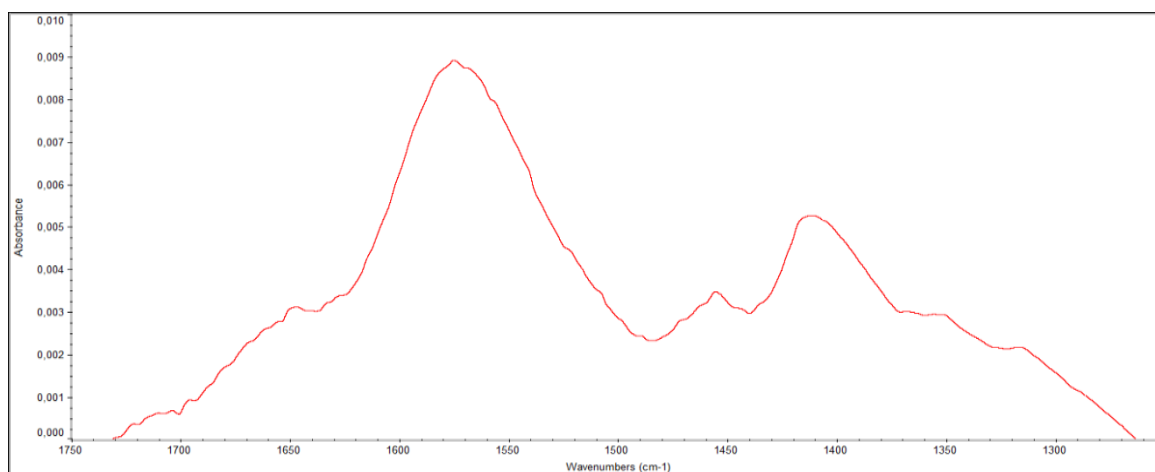
**Legenda:**

— (A) Extrato em Água      — (B) Água pura      — (C) Extrato com Água Subtraída

**Figura 9** – Espectros FTIR-ATR da amostra extrato de cogumelo *Amanita ponderosa* em água, em comparação com o da amostra de água pura e a de extrato com água subtraída (4000-600  $\text{cm}^{-1}$ ).

De forma a facilitar a análise dos espectros da figura 9, estes são apresentados no intervalo de número de onda 1250-1700  $\text{cm}^{-1}$ , já que é nessa zona que se encontram as bandas de amida I e II, que permitem estimar a estrutura secundária das proteínas, pelo que, vão ser abordadas ao longo desta dissertação.

O espectro relativo à amostra que se pretende estudar, isto é, a amostra de extrato de cogumelo (preparado em 2.), depois de subtraída a água (figura 9 - C), está representado na figura 10.



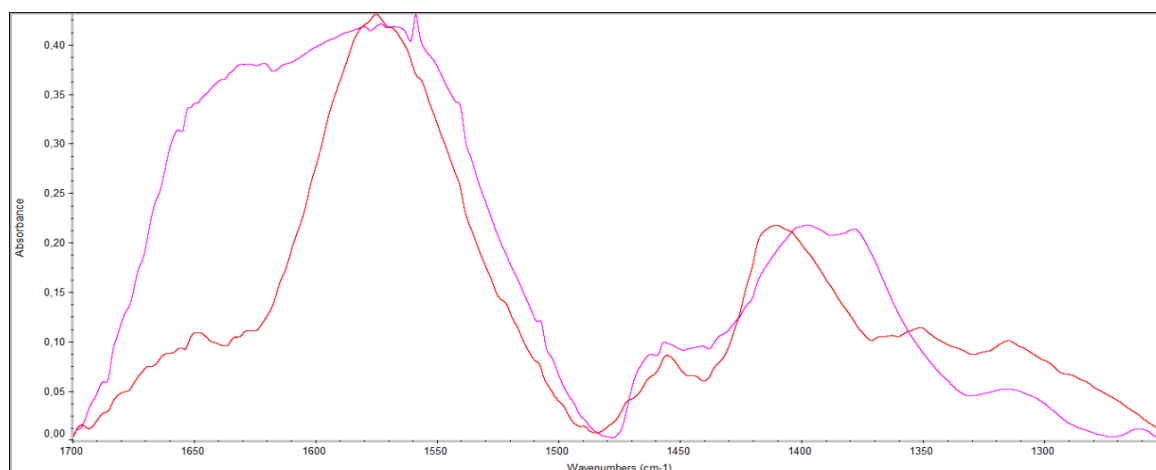
**Figura 10** – Espectros FTIR-ATR da amostra de extrato com água subtraída (3mg/mL) (1730-1250  $\text{cm}^{-1}$ ).

Ao investigar o espectro da figura 10, verificou-se a presença de dois máximos principais: um mais intenso a 1575  $\text{cm}^{-1}$ , que pode dever-se à deformação da ligação N-H em amidas secundárias (sinal típico da banda da amida II, em proteínas); e um menos intenso a 1411  $\text{cm}^{-1}$ , que se pode dever à vibração de estiramento da ligação C-N em amidas primárias (sinal típico da banda da amida III, em proteínas). Contudo, não é possível concluir acerca da presença de proteína na amostra de extrato.

Como não foi possível concluir nada acerca da presença de proteína na amostra, não se realizou a *Deconvolução de Fourier*, já que na amostra de extrato em tampão fosfato 0,1M, apenas se detetou uma das bandas de amida característica da presença de proteínas (banda da amida II).

### 3.1.1.2. Extrato no Estado Sólido

Colocaram-se 5 mg de amostra de extrato sólido, obtido em 2.2., sobre o cristal de ATR do aparelho FTIR e registou-se o respetivo espectro (figura 11), de acordo com 2.4.1..



**Legenda:**

— (A) Extrato aquoso com água subtraída

— (B) Extrato sólido

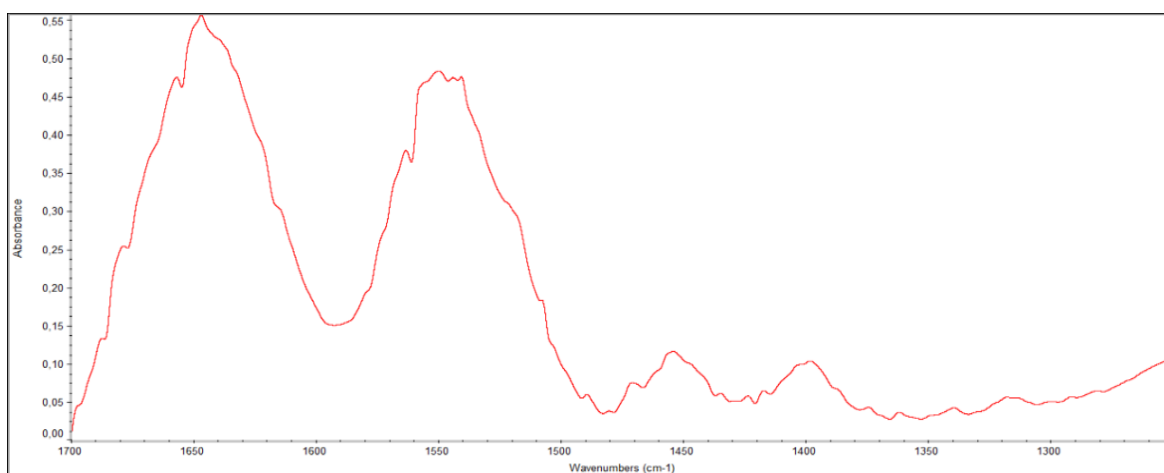
**Figura 11** – Espectros FTIR-ATR da amostra de extrato com água subtraída, em comparação com o da amostra de extrato sólido (1700-1250  $\text{cm}^{-1}$ ).

Através da análise dos espectros presentes na figura 11, é possível verificar as diferenças existentes entre a amostra no estado aquoso (figura 11 - A) e a amostra de extrato sólido (figura 11 - B). No espectro relativo a amostra B, verifica-se a existência de dois máximos típicos: um relativo à banda da amida III (1398  $\text{cm}^{-1}$ ) e um mais amplo (1559  $\text{cm}^{-1}$ ), que, devido à sua amplitude, não permite avaliar corretamente acerca da banda de amida característica (I ou II). Assim sendo, a amostra sólida apresenta mais componentes do que os que constam do extrato aquoso, dada a largura da banda situada entre os 1500-1700  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.1.2. Proteína

#### a) Solução de Caseinato de Sódio

A solução de caseinato de sódio utilizada foi preparada como mencionado em 2.3.. Para a obtenção do espectro relativo a essa solução, foram pipetados 10 $\mu\text{L}$  da amostra. De seguida, depositados sobre o cristal de ATR do aparelho FTIR, e foi adquirido o respetivo espectro (figura 12), de acordo com 2.4.1., no qual foi subtraído o tampão utilizado.



**Figura 12** – Espectro FTIR-ATR da solução de caseinato de sódio (36mg/mL) em tampão fosfato 0,1M e pH 7,4.

Na figura 12, é possível destacar a presença de dois sinais principais, igualmente intensos: um a  $1647\text{ cm}^{-1}$  e outro a  $1550\text{ cm}^{-1}$ . O primeiro é característico das vibrações de estiramento C=O das ligações peptídicas, em amidas secundárias (sinal típico da banda da amida I), e o segundo é característico da deformação da ligação N-H, em amidas secundárias (sinal típico da banda da amida II), bandas características de proteínas. Neste caso já se efetuou a *Deconvolução de Fourier* da banda da amida I da referida amostra, e apurou-se quais as estruturas secundárias da proteína presentes, bem como a predominância de cada uma delas, ao analisar a tabela 8 e a figura A1 (Apêndice A).

**Tabela 8** - *Deconvolução de Fourier* da banda da amida I referentes à amostra de caseinato de sódio do espectro representado na figura 12 (figura A1 do Apêndice A).

	Banda Amida I				
Números de Onda Máximos ( $\text{cm}^{-1}$ )	1678	1664	1648	1634	1620
Estrutura Secundária da solução de Caseinato de Sódio	Folha- $\beta$ Antiparalela	Volta- $\beta$	E.D.	Folha- $\beta$ Paralela	Folha- $\beta$ Antiparalela
Estrutura Secundária da solução de Caseinato de Sódio (%)	15,54	21,28	27,01	22,34	13,83

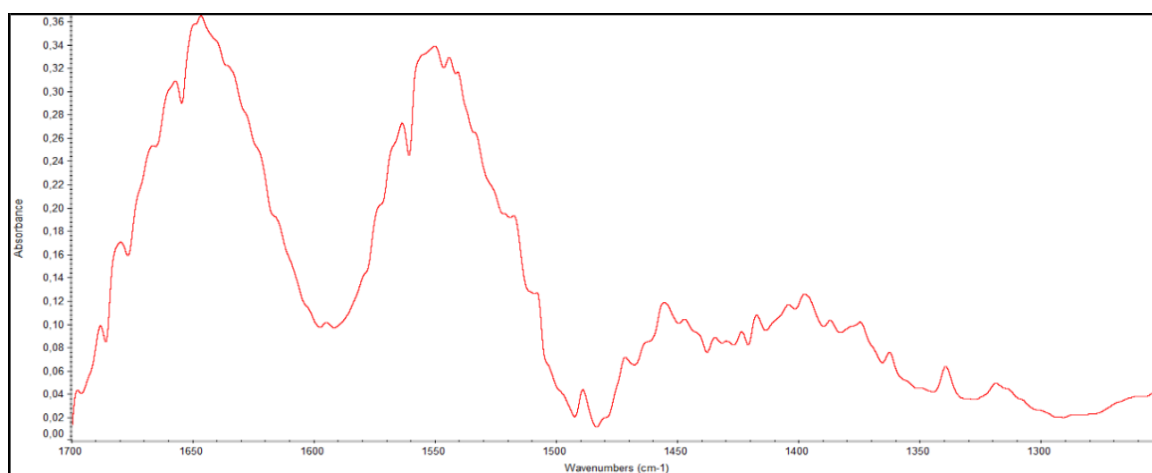
Considerando os dados da tabela 7 (subcapítulo 1.6.1.), relativos à banda da amida I, é possível analisar os dados transcritos na tabela 8 e na figura A1 do Apêndice A, relativos à *Deconvolução de Fourier* dessa banda. No espectro adquirido, detetou-se a presença de três estruturas diferentes nos sinais observados. O pico a  $1648\text{ cm}^{-1}$ , relativo à estrutura desordenada, é o que apresenta uma maior área em comparação com a área total (maior percentagem), cerca de 27,01%. No entanto, a estrutura folha- $\beta$  apresenta três máximos: a  $1678$  e  $1620\text{ cm}^{-1}$ , referentes à conformação antiparalela, e um a  $1634\text{ cm}^{-1}$ , referente à conformação paralela, a conformação menos estável da estrutura folha- $\beta$ . Na sua globalidade, esta estrutura, é a mais preponderante, com 51,71% da área total de sinais

detetados. Por fim também se deteta a estrutura volta- $\beta$ , sendo a menos predominante das estruturas detetadas, com pico a  $1664\text{ cm}^{-1}$ , e uma percentagem de 21,28%.

A percentagem considerável de estruturas secundárias desordenadas (27,01%), bem como a menor predominância relativa à volta- $\beta$ , indiciam uma elevada instabilidade da amostra, como seria de esperar pelo facto de estas serem compostos considerados como sendo desprovidos de estruturas secundárias ou terciária.

### b) Leite Reconstituído

O leite reconstituído, obtido do leite em pó, foi preparado como mencionado em 2.3.. Para a obtenção do respetivo espectro, tal como efetuado para a solução de caseinato de sódio, foi necessário proceder-se à pipetagem de  $10\mu\text{L}$  da amostra, e, posterior, deposição sobre o cristal do aparelho FTIR. De seguida, foi adquirido o respetivo espectro (figura 13), de acordo com 2.4.1., no qual foi subtraído o tampão utilizado.



**Figura 13** – Espectro FTIR-ATR da amostra de leite reconstituído (45mg/mL) em tampão fosfato 0,1M e pH 7,4).

No espectro relativo à amostra de leite reconstituído (figura 13), pode constatar-se a presença das duas bandas: com máximos a  $1646\text{ cm}^{-1}$  e a  $1550\text{ cm}^{-1}$ . O primeiro é característico das vibrações de estiramento C=O das ligações peptídicas, em amidas secundárias (sinal típico da banda da amida I), e o segundo é característico da deformação da ligação N-H, em amidas secundárias (sinal típico da banda da amida II), bandas características de proteínas. Atendendo à presença destas bandas, efetuou-se a *Deconvolução de Fourier* da banda da amida I da referida solução, e inquiriu-se acerca de quais as estruturas secundárias da proteína presentes na amostra, bem como a sua predominância, sendo para isso observados os dados da tabela 9 e a figura A2 (Apêndice A).

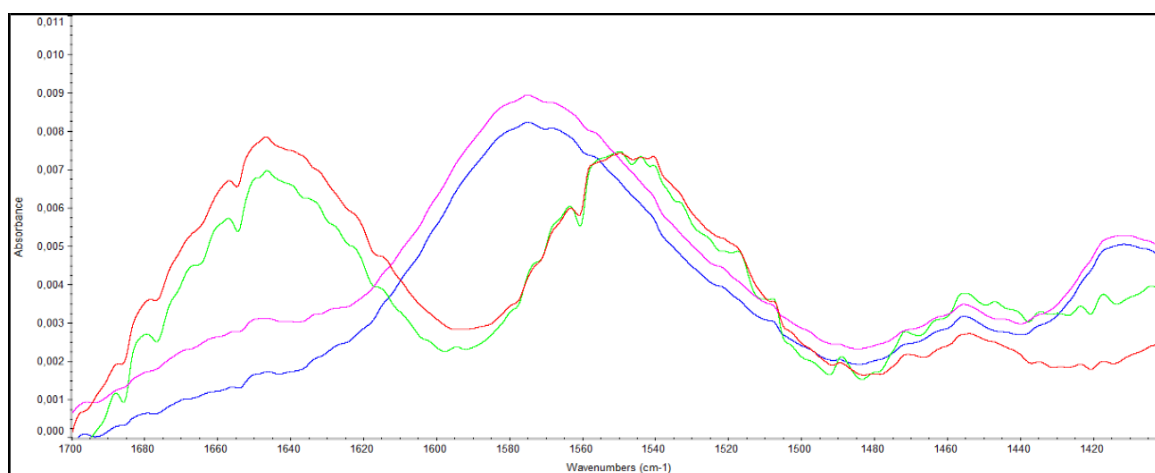
**Tabela 9** - *Deconvolução de Fourier* das bandas da amida I referentes à amostra de leite reconstituído do espectro representado na figura 13 (figura A2 do Apêndice A).

	Banda Amida I				
Números de Onda Máximos ( $cm^{-1}$ )	1679	1664	1647	1631	1617
Estrutura Secundária do leite reconstituído	Folha- $\beta$ Antiparalela	Volta- $\beta$	E.D.	Folha- $\beta$ Paralela	Folha- $\beta$ Antiparalela
Estrutura Secundária do leite reconstituído (%)	5,90	25,72	35,80	26,46	6,12

Tendo por base os dados presentes na tabela 7 (subcapítulo 1.6.1.), relativos à banda da amida I, é possível analisar os dados transcritos na tabela 9. Ao avaliar a *Deconvolução de Fourier* da banda da amida I (figura A2 do Apêndice A), detetou-se a presença de três estruturas secundárias diferentes nos sinais observados, sendo que a estrutura folha- $\beta$  apresenta duas conformações diferentes: paralela e antiparalela. Verificou-se que o máximo a  $1647\text{ cm}^{-1}$  apresenta uma maior área quando comparado com a área total (maior percentagem, 35,80%), sendo que este é característico da estrutura desordenada, a estrutura mais predominante na amostra. Os restantes sinais apresentam percentagens inferiores quando comparados com a percentagem relativa à estrutura desordenada, sendo relativos a duas estruturas diferentes: os máximos situados a  $1617$  e  $1679\text{ cm}^{-1}$  são característicos da conformação antiparalela da estrutura folha- $\beta$ , e o situado a  $1631\text{ cm}^{-1}$  é característico da conformação paralela, representado na sua globalidade 38,48% da área total da amostra; o máximo a  $1664\text{ cm}^{-1}$ , característico da volta- $\beta$ , representa 25,72% da área total. Assim sendo, as elevadas percentagens relativas às folha- $\beta$  (38,48%) e às estruturas desordenadas (35,80%), sugerem uma elevada variabilidade nas estruturas proteicas.

c) *Comparação da solução de Caseinato de Sódio com a amostra de Leite reconstituído*

Na figura seguinte, estão representados os espectros relativos às amostras de extrato com água subtraída, a solução de caseinato de sódio e a amostra de leite reconstituído, tendo sido previamente preparadas como mencionado em 2.2. e 2.3., sendo assim, possível comparar os espectros relativos a estas amostras.

**Legenda:**

- Extrato com água subtraída
- Extrato em água
- Caseinato de Sódio
- Leite reconstituído

**Figura 14** – Espectros FTIR-ATR das amostras de água subtraída, amostra de leite reconstituído e de caseinato de sódio (1700-1400  $\text{cm}^{-1}$ ).

Seguidamente procedeu-se à determinação da frequência das estruturas secundárias tal como feito anteriormente nos subcapítulos 3.1.2. a) e b). Conforme os dados da tabela 8 e 9 e as figuras A1 e A2 do Apêndice A, é possível comparar as estruturas secundárias das proteínas presentes na solução de caseinato de sódio e na amostra de leite reconstituído. Relativamente aos números de onda máximos obtidos em cada uma das deconvoluções, os valores apresentados são muito similares em ambas as amostras, havendo variações muito residuais (1 a 3  $\text{cm}^{-1}$ ). Assim sendo, é possível verificar que ambas as amostras apresentam o mesmo tipo de estruturas secundárias (volta- $\beta$ , estrutura desordenada e folha- $\beta$ ) e as mesmas conformações da estrutura folha- $\beta$  (antiparalela e paralela), mas com variações ao nível da predominância de cada uma das estruturas.

Ao comparar as percentagens das diferentes estruturas secundárias das duas soluções em estudo, regista-se que a percentagem relativa à estrutura volta- $\beta$ , nas duas amostras, são similares (21,28% para a solução de caseinato de sódio, e 25,72% para a amostra de leite reconstituído). No que se refere à amostra de leite reconstituído, verifica-se que os valores relativos às estruturas mais predominantes (estrutura desordenada e folha- $\beta$ ) são mais próximos, não havendo uma estrutura que se destaque, variando os valores entre 38,48% e os 35,80%, respetivamente. Já no que respeita à solução de caseinato de sódio, destaca-se uma maior proximidade entre os valores percentuais relativos às duas estruturas menos predominantes nestas amostras: a estrutura volta- $\beta$  apresenta uma percentagem de 21,28%, enquanto a estrutura desordenada tem 27,01% da área total da amostra (diferença de 5,73%); na amostra de leite reconstituído, essa diferença é superior, cerca de 10,08% (volta- $\beta$ : 25,72%; estrutura desordenada: 35,80%). Destaca-se também que a folha- $\beta$  é a mais

predominante na amostra de caseinato (51,71%, contra os 38,48% na amostra de leite reconstituído), e por fim, salientar que nas amostras proteicas analisadas, a estrutura folha- $\beta$  apresenta duas conformações características, a antiparalela e a paralela, bem como a inexistência de quaisquer sinais característicos da estrutura hélice- $\alpha$ .

### 3.1.3. Interação de extrato de cogumelo com as proteínas em estudo (FTIR-ATR)

Para analisar a interação do extrato de cogumelo *Amanita ponderosa*, obtido em 2.2., com a proteína, foram utilizadas duas amostras de proteínas, preparadas em 2.3.. Assim, foram preparados dois tipos de amostras:

- amostras proteicas, em interação com o extrato (Ei), com variação da concentração de proteína mantendo a concentração de extrato de 3mg/mL (sete amostras de caseinato de sódio, EiCi a EiC6; e sete amostras de leite reconstituído, EiLi a EiL6);
- amostras proteicas, em interação com o extrato (Ei), mas desta vez com variação da concentração de extrato, mantendo a das amostras proteicas, 36 mg/mL para o caseinato de sódio e 45 mg/mL para o leite reconstituído (sete amostras de caseinato de sódio, EiCi a E6Ci; e sete amostras de leite reconstituído, EiLi a E6Li).

De referir que nas amostras de leite reconstituído, a concentração de proteína foi variada em função da massa de leite em pó considerada. As amostras foram preparadas à temperatura ambiente e analisadas espectroscopicamente 45 minutos após a sua preparação. Os valores obtidos através da *Deconvolução de Fourier* são valores médios resultado de 3 ensaios realizados. As concentrações das amostras de caseinato de sódio e de leite reconstituído em interação com o extrato, encontram-se descritas na tabela 10.

**Tabela 10** – Concentrações utilizadas nas diferentes amostras proteicas em interação com o extrato para ensaios de FTIR-ATR

	Amostras						
	EiCi	EiC1	EiC2	EiC3	EiC4	EiC5	EiC6
Concentração das amostras de Caseinato de Sódio (mg/mL)	36	54	60	72	18	12	9
	EiLi	EiL1	EiL2	EiL3	EiL4	EiL5	EiL6
Concentração das amostras de leite reconstituído (mg/mL)	45	67,5	75	90	22,5	15	11
	EiCi	E1C	E2C	E3C	E4C	E5C	E6C
	EiLi	E1L	E2L	E3L	E4L	E5L	E6L
Concentração das amostras de extrato de cogumelo(mg/mL)	3	6	9	12	2	1	0,5

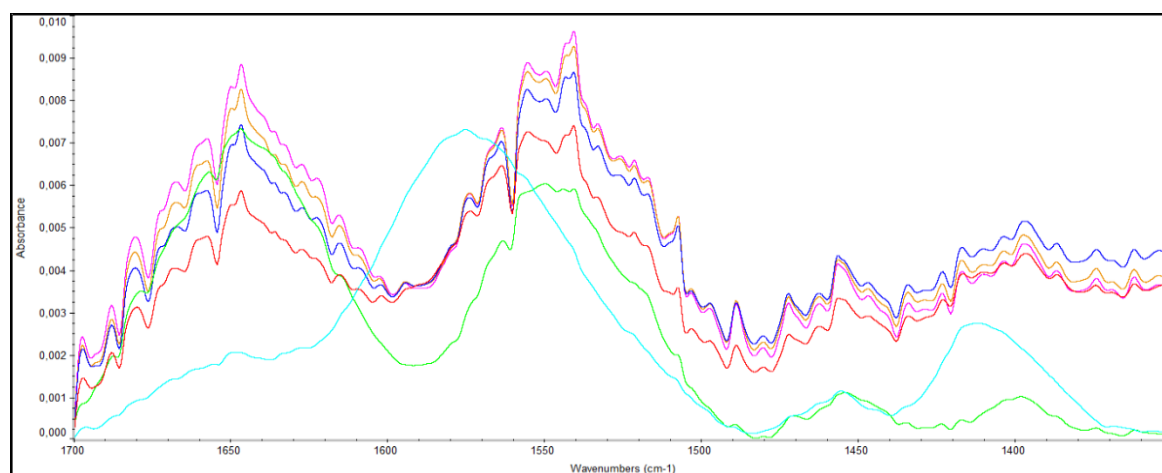
C = Caseinato de Sódio; L = Leite reconstituído; E = Extrato de cogumelo, i = amostra inicial

### 3.1.3.1 Efeito da variação da concentração da proteína

#### a) Interação de extrato de cogumelo com o caseinato de sódio.

As amostras utilizadas para a elaboração desta análise foram extratos de cogumelo *Amanita ponderosa* em interação com as soluções de caseinato de sódio, tendo ambas as amostras sido previamente preparadas em 2.2. e 2.3., respetivamente. Posteriormente, foram misturadas de acordo com as diferentes concentrações descritas em 3.1.3., e, em todas estas amostras, o tampão utilizado foi subtraído.

De forma a obter os espectros relativos às amostras de extrato com caseinato de sódio foi necessário proceder-se como em 3.1.2. a), estando representados, nas figuras 15 e 16, os espectros obtidos.



#### Legenda:

- Caseinato de sódio (C)
- Extrato (E)
- EiCi (Amostra inicial – i; 36 mg/mL)
- EiC1 (54 mg/mL)
- EiC2 (60 mg/mL)
- EiC3 (72 mg/mL)

**Figura 15** – Espectros FTIR-ATR das amostras de caseinato de sódio interagindo com o extrato (3 mg/mL), com aumento da concentração de caseinato, comparando com a amostra de extrato e de caseinato de sódio (1700-1250  $\text{cm}^{-1}$ ).

Em primeiro lugar, estudaram-se os espectros das amostras de caseinato de sódio interagindo com o extrato, com aumento da concentração da proteína (figura 15). Ao avaliar os máximos relativos às bandas de amida I e II, é possível destacar que estes se encontram na mesma zona, mas com variação ao nível da absorvância detetada. Os dois conjuntos de sinais relativos a essas bandas de amida apresentam intensidades e valores de intensidade da absorvância similares nas amostras em análise (EiCi a EiC3). Mas, ainda assim, verifica-se a ação dessa variação de concentração proteica nestas amostras, já que se observarmos as quatro amostras localizadas na zona da banda da amida I (1700 - 1600  $\text{cm}^{-1}$ ) destaca-se

a existência de um incremento da absorvância registrada, aquando desse aumento da concentração de caseinato de sódio nas amostras. Por conseguinte, a amostra EiC3 é a que apresenta maior absorvância, ao passo que a amostra EiCi é que apresenta menor. Por outro lado, se avaliar a zona da banda da amida II (1580-1480 cm<sup>-1</sup>) verifica-se o inverso, já que a amostra que apresenta maior absorvância é a amostra inicial (EiCi), ao que se pode concluir que se aumentar a concentração de caseinato de sódio, a absorvância da amostra vai decair. Efetuou-se de seguida a *Deconvolução de Fourier* da banda da amida I de cada uma destas amostras, para quantificar a composição estrutural secundária das proteínas, cujos dados se encontram indicados nas figuras A1, A3-A6 (Apêndice A) e nas tabelas 12, B1-B4 (Apêndice B).

**Tabela 11-** *Deconvolução de Fourier* da banda de amida I referentes às amostras de caseinato de sódio interagindo com o extrato, com aumento da concentração de caseinato.

Estrutura Secundária (%)	Amostras				
	Caseinato de sódio (36 mg/mL)	EiCi (36 mg/mL)	EiC1 (54 mg/mL)	EiC2 (60 mg/mL)	EiC3 (72 mg/mL)
Volta- $\beta$	21,28	37,24	29,95	28,71	29,77
Hélice- $\alpha$	----	----	----	----	----
Estrutura Desordenada	27,01	10,12	26,87	30,09	12,96
Folha- $\beta$ Antiparalela	29,37	27,98	24,98	22,75	30,69
Folha- $\beta$ Paralela	22,34	24,66	23,55	18,45	26,58

*Nota:* os valores relativos à concentração são relativos à concentração de proteína nas amostras. C = Caseinato de Sódio; E = Extrato de cogumelo, i = amostra inicial

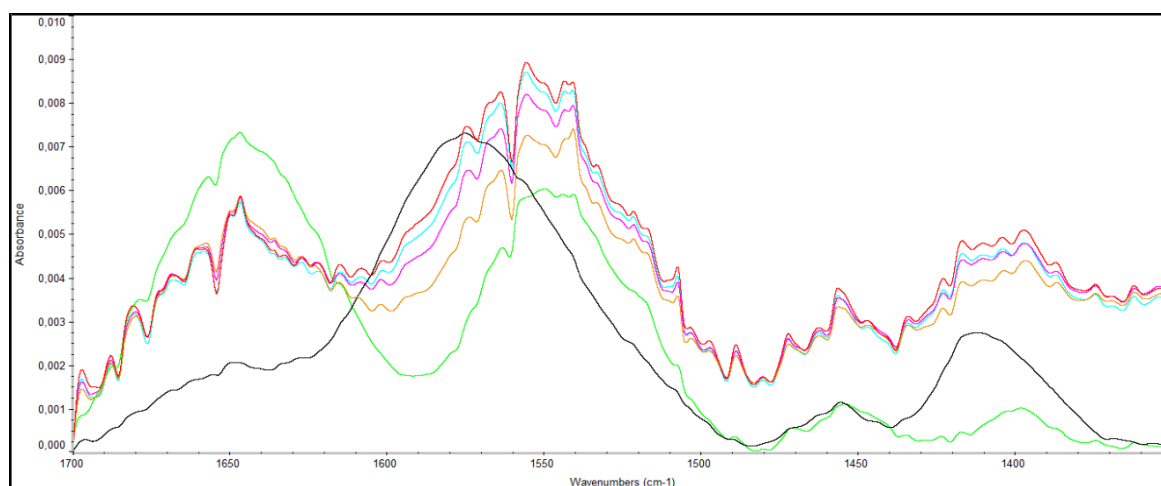
Com os dados relativos à *Deconvolução de Fourier* da amostra de caseinato de sódio interagindo com o extrato, com aumento da concentração proteica, presentes na tabela 11, destaca-se a grande predominância da estrutura folha- $\beta$ , que representa 51,71% da percentagem total de estruturas da amostra, estando o restante valor repartido entre a estrutura desordenada (27,01%) e a estrutura volta- $\beta$  (21,28%).

Quando se comparam os resultados, obtidos pela *Deconvolução de Fourier* da banda de amida I, da amostra EiCi com os da solução de caseinato de sódio (amostra isolada) averiguou-se um aumento de 15,96% da estrutura volta- $\beta$  (21,28 para 37,24%), e uma diminuição de 16,89% da estrutura desordenada (27,01 para 10,12%). Já a estrutura folha- $\beta$  apresenta um valor similar (diferença inferior a 1%), variando ligeiramente as suas conformações: a paralela apresenta uma ligeira subida de valor percentual (2,32%); já a antiparalela apresenta uma quebra ligeira (1,39%), pelo que são diferenças residuais. Estas variações percentuais, aumento da estrutura volta- $\beta$  e quebra da estrutura desordenada, deve-se à interação da proteína-proteína.

Avaliando as porcentagens das estruturas secundárias das amostras com concentrações mais elevadas de caseinato de sódio (EiC1 a EiC3), obtidas pelo estudo da banda da amida I, destaca-se a predominância da estrutura folha- $\beta$ , na sua globalidade (somatório das duas conformações). Caso se aumente a concentração de caseinato de sódio na amostra, verifica-se que a estrutura secundária volta- $\beta$  apresenta valores sempre elevados, variando entre os 37,24% na amostra inicial EiCi e os 29,95%, na amostra EiC1. Esta amostra e as restantes (EiC2 e EiC3) com concentrações mais elevadas da proteína em estudo, apresentam valores percentuais muito similar, próximo dos 29%. A estrutura desordenada é a estrutura que apresenta variações mais inconsistentes, uma vez que apresenta valores elevados nas amostras EiC1 (26,87%) e EiC2 (30,09%), comparando com os valores mais reduzidos nas amostras EiCi (10,12%) e na EiC3 (12,96%). Ainda assim, apresenta, maioritariamente, valores mais reduzidos que os verificados na amostra de proteína isolada (27,01%).

Em conclusão, é possível denotar que as variações percentuais existentes nas amostras analisadas com aumento da concentração de caseinato de sódio, não apresentam uma tendência completamente definida, verificando-se uma diminuição das estruturas folha- $\beta$ , o aumento das estruturas desordenada e variação residual da estrutura volta- $\beta$ . Estes dados preveem um aumento da estabilidade estrutural da proteína devido ao acréscimo de interações proteína-proteína, já que as caseínas são hidrofóbicas e por esse motivo tendem a agregarem-se. O caseinato apesar de ser menos hidrofóbico que a caseína, tende a agregar-se também, apresentando uma estruturas secundária e/ou terciária, melhor definida. (Brasil *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2019). Também importante a diminuição da absorvância detetada quando se aumenta a concentração de caseinato de sódio, o que evidencia a ocorrência interações que vão afetar as ligações N-H.

De seguida analisou-se a figura 16, na qual constam os espectros das amostras de extrato com caseinato, diminuindo a concentração dessa proteína, sendo considerados para análise os picos relativos às bandas de amida I e II.



**Legenda:**

- Caseinato de sódio (C)
- Extrato (E)
- EiC1 (Amostra inicial – i; 36 mg/mL)
- EiC4 (18 mg/mL)
- EiC5 (12 mg/mL)
- EiC6 (9 mg/mL)

**Figura 16** – Espectros FTIR-ATR das amostras de caseinato de sódio interagindo com o extrato (3 mg/mL), com diminuição da concentração de caseinato, comparando com a amostra de extrato e de caseinato de sódio (1700-1250 cm<sup>-1</sup>).

Nesta figura, é possível verificar a ocorrência alterações nas zonas relativas à banda da amida (I e II), à medida que se diminui a concentração de caseinato de sódio nas amostras, sendo mais acentuadas na zona relativa à banda de amida I.

Ao analisar os referidos máximos destacou-se a diminuição acentuada do máximo relativo à banda da amida II. Já no que respeita ao máximo relativo à banda de amida I apresenta valores de absorvância semelhantes nas quatro amostras em análise, apesar de se notar um ligeiro incremento da intensidade da absorvância com a diminuição da concentração da proteína presente nas amostras. Posteriormente, realizou-se a *Deconvolução de Fourier* de cada uma destas amostras na banda da amida I, cujos dados estão indicados nas tabelas 12, B5-B7 (Apêndice B) e nas figuras A7-A9 (Apêndice A).

**Tabela 12** -*Deconvolução de Fourier* da banda de amida I referentes às amostras de caseinato interagindo com o extrato, com diminuição da concentração de caseinato.

Estrutura Secundária (%)	Amostras		
	EiC4 (18 mg/mL)	EiC5 (12 mg/mL)	EiC6 (9 mg/mL)
Volta-β	48,60	39,71	30,41
Hélice-α	---	---	---
Estrutura Desordenada	12,60	26,35	39,61
Folha-β	<i>Antiparalela</i>	12,58	9,11
	<i>Paralela</i>	26,22	24,83

*Nota:* os valores relativos à concentração são relativos à concentração de proteína nas amostras.

C = Caseinato de Sódio; E = Extrato de cogumelo, i = amostra inicial

Com os dados relativos à *Deconvolução de Fourier*, presentes na tabela 12, relativos às amostras de caseinato de sódio interagindo com o extrato, com diminuição da concentração proteica, destaca-se a predominância das estruturas volta- $\beta$  e folha- $\beta$ , mas regista-se uma quebra da percentagem destas estruturas com essa variação da concentração de caseinato de sódio. Por outro lado, verifica-se um incremento da percentagem da estrutura desordenada, principalmente na amostra EiC6, a amostra com menor concentração proteica.

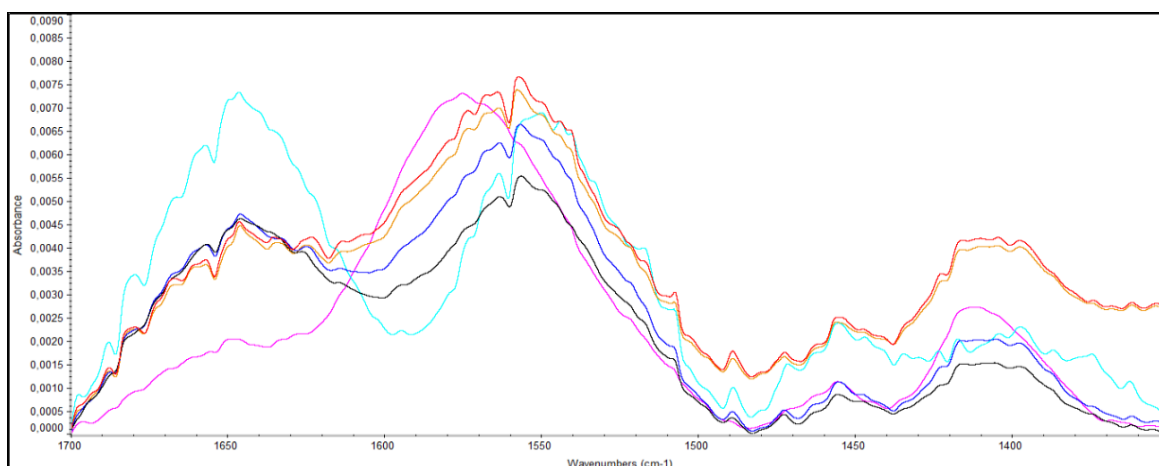
Com a diminuição da concentração de caseinato de sódio na amostra, verifica-se que a estrutura secundária volta- $\beta$  apresenta valores sempre elevados (entre os 48,60% e os 30,41%), mas com uma quebra mais acentuada (de 18,19%), entre EiC4 e a EiC6. É na amostra EiC4 que esta estrutura apresenta um valor mais elevado (48,60%), enquanto nas restantes duas amostras, esta estrutura apresenta uma diminuição (8,89%) da sua percentagem, para os 39,71% na amostra EiC5, e mais acentuada na amostra EiC6, como mencionado anteriormente. Analisando o resultado da diminuição de concentração proteica sobre a estrutura folha- $\beta$ , a mais predominante na amostra EiCi (tabela 11), é acentuada: ocorre uma diminuição de 22,66% entre a amostra EiCi (tabela 11) e a amostra EiC6, passando dos 52,64 para os 29,98%, o que demonstra a perda da sua influência com a diminuição da concentração de caseinato de sódio na amostra. A estrutura desordenada, que apresenta uma percentagem de 10,12% na amostra EiCi (tabela 11), é a estrutura que apresenta variações mais consistentes, uma vez que os seus valores vão aumentando à medida que decresce a concentração de proteína. Esta estrutura apresenta-se como a menos predominante na amostra inicial (tabela 11) (EiCi: 10,12%), mas vai ganhando maior predominância nas amostras intermédias (EiC4: 12,60%; EiC5: 26,35%), até ser a estrutura em maior percentagem (39,61%) na amostra EiC6.

Em conclusão, neste conjunto de amostras (tabela 12), constata-se uma diminuição estrutura volta- $\beta$  e da folha- $\beta$ . Por outro lado, observa-se um aumento muito acentuado da estrutura desordenada, e estes dados podem indiciar uma maior instabilidade estrutural da proteína por ação do extrato.

#### *b) Interação de extrato de cogumelo com o leite reconstituído.*

As amostras utilizadas para a elaboração desta análise foram extratos de cogumelo *Amanita ponderosa*, interagindo com as amostras de leite reconstituído, sendo previamente preparadas em 2.2. e 2.3., respetivamente. De seguida, foram misturadas de acordo com as diferentes concentrações descritas em 3.1.3., e em todas, estas amostras, o tampão utilizado foi subtraído.

Para adquirir os espectros relativos às amostras de extrato com leite reconstituído com aumento da concentração dessa proteína, procedeu-se como em 3.1.2. b), encontrando-se representados, nas figuras 17 e 18, os espectros obtidos.



**Legenda:**

- Leite reconstituído (L)
- Extrato (E)
- EiLi (Amostra inicial - i; 45 mg/mL)
- EiL1 (67,5 mg/mL)
- EiL2 (75 mg/mL)
- EiL3 (90 mg/mL)

**Figura 17** – Espectros FTIR-ATR das amostras de leite reconstituído, interagindo com o extrato (3 mg/mL), com aumento da concentração de leite reconstituído, comparando com a amostra de extrato e de leite reconstituído (1700-1250 cm<sup>-1</sup>).

Na figura 17, é possível verificar a ocorrência alterações nas zonas relativas à banda da amida (I e II), à medida que se aumenta a concentração de proteína (leite reconstituído) nas amostras, sendo mais acentuadas na zona da banda de amida II.

Ao analisar os referidos máximos verificou-se que o relativo à banda da amida II apresenta um aumento significativo da sua intensidade e absorvância quando ocorre o aumento da concentração da proteína na amostra, mais exatamente, quando se passa da amostra EiLi para EiL1. Tal se verifica, mas numa escala mais reduzida, com o aumentar da concentração da proteína nas restantes amostras (EiL2 e EiL3).

Já no que respeita ao máximo característico da banda da amida I, apresenta uma diminuição da sua intensidade à medida que se aumenta a concentração de proteína presente na amostra, ou seja, a amostra EiLi é a que apresenta este sinal com maior intensidade, e a amostra EiL3 é a que se apresenta com menor intensidade, apesar dessa diferença ser reduzida. Depois, realizou-se a *Deconvolução de Fourier* da banda da amida I, de cada uma destas amostras, cujos dados estão descritos nas tabelas 13, B8-B11 (Apêndice B) e nas figuras A2, A10-A13 (Apêndice A).

**Tabela 13-** *Deconvolução de Fourier* da banda da amida I referentes à amostra de leite reconstituído interagindo com o extrato, com aumento da concentração de leite reconstituído.

Estrutura Secundária (%)	Amostras				
	Leite reconstituído (45mg/mL)	EiLi (45 mg/mL)	EiL1 (67,5 mg/mL)	EiL2 (75 mg/mL)	EiL3 (90 mg/mL)
Volta- $\beta$	25,72	22,80	34,34	35,34	35,54
Hélice- $\alpha$	----	----	----	----	----
Estrutura Desordenada	35,80	25,79	15,43	15,49	14,25
<i>Antiparalela</i>	26,46	31,40	31,48	24,94	23,38
Folha- $\beta$					
<i>Paralela</i>	12,02	20,01	18,75	24,22	26,83

Nota: os valores relativos à concentração são relativos à concentração de proteína nas amostras.

C = Caseinato de Sódio; E = Extrato de cogumelo, i = amostra inicial

Com os dados relativos à *Deconvolução de Fourier* das amostras de leite reconstituído interagindo com o extrato com aumento da concentração da proteína, presentes na tabela 13, salientam-se, principalmente, a elevada predominância das estruturas desordenada e folhas- $\beta$ , que representam mais de 74% das estruturas da amostra de leite reconstituído, enquanto a estrutura volta- $\beta$  apresenta uma percentagem de 25,72%. De referir também que não se deteta a presença da estrutura hélice- $\alpha$  nas diferentes amostras da anterior tabela.

De seguida, ao comparar a amostra de EiLi (tabela 13) com a amostra EiCi (tabela 11) podemos verificar que ocorrem algumas diferenças ao nível das estruturas predominantes. A estrutura folha- $\beta$  são as predominantes em ambas as amostras, com a conformação antiparalela a ser a mais predominante, porém com uma percentagem muito maior na amostra EiLi (31,40%) quando comparado com a da amostra EiCi (27,98%).

No que respeita às duas restantes estruturas detetadas nas duas amostras destacar a elevada percentagem da estrutura volta- $\beta$  na amostra EiCi, com 37,24%, sendo a segunda estrutura com maior predominância da referida amostra. Já a estrutura desordenada apresenta apenas 10,12%. Por outro lado, na amostra EiLi, a segunda estrutura mais predominante é a estrutura desordenada com 25,79%, comparando com os 22,80% da estrutura volta- $\beta$ .

Ao comparar os resultados obtidos pela *Deconvolução de Fourier* da banda da amida I da amostra EiLi com os da amostra de leite reconstituído (proteína isolada), nota-se um aumento (superior a 12%) da percentagem da estrutura folhas- $\beta$ , representado 51,41% das estruturas detetadas. Ainda no que se refere a esta estrutura, também se evidencia um aumento das suas conformações, passando a apresentar 31,40 % da conformação antiparalela (+4,94%) e 20,01% da conformação paralela (+7,99%). Por outro lado, realçar a diminuição da percentagem das restantes estruturas detetadas: uma mais acentuada da

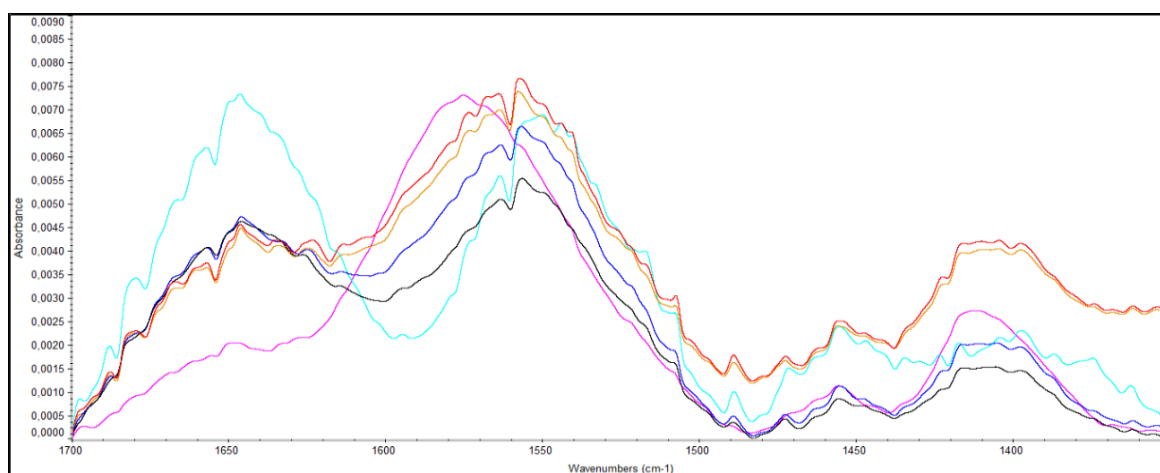
estrutura desordenada, para os 25,79% (-10%), e uma mais reduzida na estrutura volta- $\beta$ , para os 22,80% (-2,92%).

Analisando a *Deconvolução de Fourier* das diferentes amostras, aquando do aumento da proteína em estudo (EiL1 – EiL3), observa-se o efeito desse aumento na estrutura volta- $\beta$ , já que se observa um incremento da sua percentagem entre a amostra EiLi e as restantes amostras, apresentando percentagens entre os 34,34% (+11,54%) na amostra EiL1 e os 35,54% (+12,74%) na amostra EiL3. O inverso acontece quando se fala da estrutura desordenada, uma vez que apresenta uma quebra de percentagem entre a amostra EiLi e a EiL1, ligeiramente superior a 10% (EiLi: 25,79%; EiL1: 15,43%). Porém, salientar que, nas restantes amostras, a sua percentagem é estável, uma vez que a sua variação, entre as diferentes amostras não é substancial, variando entre os 15,43 % (EiL1) e os 14,25% (EiL3). Por fim, no que se refere à estrutura folha- $\beta$ , não se denota uma alteração entre os valores das diferentes amostras (EiL1 a EiL3), já que variação máxima detetada é de apenas 2%, pelo que se mantém estável com o aumento da concentração proteica. Relativamente às variações das percentagens das suas conformações nas amostras com aumento da concentração de leite reconstituído, denota-se que, no que se refere à conformação antiparalela verifica-se que a sua predominância decresce à medida que se aumenta a concentração de leite reconstituído, já que se verifica uma quebra de 8,10% entre a amostra EiL1 (31,48%) e a EiL2 (23,38%); já no que respeita à conformação Paralela, verifica-se o inverso, já que existe um aumento de 8,08% entre a amostra EiL1 (18,75%) e a EiL3 (26,83%), e verifica-se que esta percentagem diminui com o aumento da concentração da proteína.

Em conclusão, quando se compara a amostra de leite reconstituído com a amostra inicial EiLi, verifica-se uma diminuição ligeira das volta- $\beta$ , e uma mais acentuada das estruturas desordenadas; enquanto a estrutura folha- $\beta$  apresenta um aumento mais substancial.

Ao comparar a amostra EiLi com as restantes amostras (EiL1 a EiL3), destaca-se a diminuição das estruturas desordenadas, o aumento da volta- $\beta$ , e a estabilização da percentagem da estrutura folha- $\beta$ , dados que podem sugerir uma maior estabilização da amostra com o aumentar da concentração de proteína em estudo.

Posteriormente, analisou-se a figura 18, na qual constam os espectros das amostras de extrato com leite reconstituído com diminuição da concentração da proteína, sendo considerados para análise os máximos relativos às bandas de amida I e II.



**Legenda:**

- Leite reconstituído (L)      ■ Extrato (E)      ■ EiLi (Amostra inicial - i; 45 mg/mL)
- EiL4 (22,5 mg/mL)      ■ EiL5 (15 mg/mL)      ■ EiL6 (11 mg/mL)

**Figura 18** – Espectros FTIR-ATR das amostras de leite reconstituído interagindo com o extrato (3 mg/mL), com diminuição da concentração de leite reconstituído, comparando com a amostra de extrato e de leite reconstituído (1700-1250  $\text{cm}^{-1}$ ).

Na figura 18, é possível verificar a ocorrência alterações nas zonas relativas às bandas de amida (I e II), à medida que se diminui a concentração de leite reconstituído nas amostras. Ao observar os espectros, destacam-se desde logo os dois máximos relativos às bandas de amida: no que se refere à banda da amida I (próximo dos 1650  $\text{cm}^{-1}$ ), verifica-se que a sua intensidade vai diminuindo à medida que se reduz a concentração da proteína na amostra, pelo que é a amostra EiLi que apresenta uma intensidade mais elevada; por seu lado, o máximo relativo à banda de amida II (próximo dos 1550  $\text{cm}^{-1}$ ), vai aumentando de intensidade à medida que é maior a redução da concentração da proteína, sendo a amostra EiLi a que apresenta o sinal menos intenso, e a EiL6 a que apresenta o sinal mais intenso. A *Deconvolução de Fourier* da banda de amida I de cada uma destas amostras estão apresentadas nas tabelas 14, B8 e B12 (Apêndice B), e nas figuras A2, A10 e A14 (Apêndice A). No entanto, verifica-se que à medida que se diminui a concentração da proteína na mistura com extrato de cogumelo, ou seja, a partir da amostra EiL5, o sinal relativo a esta banda vai aumentando a sua amplitude, o que não permite uma correta visualização da mesma. Por este motivo, não é possível realizar a *Deconvolução de Fourier* da banda da amida I dessas amostras, pelo que assim, apenas se realizou a *Deconvolução* das amostras EiLi e EiL4 (tabela 14).

**Tabela 14-** *Deconvolução de Fourier* da banda de amida I referentes à amostra de leite reconstituído interagindo com o extrato, com diminuição da concentração de leite reconstituído.

Estrutura Secundária (%)	Amostras		
	Leite reconstituído (45mg/mL)	EiLi (45 mg/mL)	EiL4 (22,5 mg/mL)
Volta- $\beta$	25,72	22,80	26,74
Hélice- $\alpha$	---	---	17,61
Estrutura Desordenada	35,80	25,79	31,97
Folha- $\beta$ Antiparalela	26,46	31,40	16,20
Folha- $\beta$ Paralela	12,02	20,01	7,48

Nota: os valores relativos à concentração são relativos à concentração de proteína nas amostras.

C = Caseinato de Sódio; E = Extrato de cogumelo, i = amostra inicial

Com os dados relativos à *Deconvolução de Fourier* das amostras de leite reconstituído interagindo com o extrato, com diminuição da concentração da proteína, presentes na tabela 14, evidenciam-se desde logo o aparecimento de uma nova estrutura que ainda não tinha sido detetada nas *Deconvoluções* anteriores, a estrutura hélice- $\alpha$ , que apresenta uma percentagem superior a 17%. A estrutura mais predominante na amostra EiLi é a folha- $\beta$ , que, quando comparada com a amostra EiL4, apresenta uma quebra de 27,73% dessa estrutura (EiLi: 51,41% e EiL4: 23,68%). Nesse seguimento ambas as conformações são afetadas, sendo que a antiparalela apresenta uma de quebra de 15,20% (EiLi:31,40% e EiL4:16,20), contrapondo com os 12,53% da percentagem da conformação paralela, (EiLi:20,01% e EiL4:7,48). A estrutura desordenada, a segunda mais predominante na amostra, apresenta um incremento da sua percentagem (+6,18%), passando dos 25,79%, na amostra EiLi para os 31,97%, na amostra EiL4, sendo assim a mais predominante nesta amostra. A volta- $\beta$  apresenta um aumento ligeiro de predominância, passando dos 22,80% na amostra EiLi para os 26,74% na amostra EiL4, ficando como a segunda estrutura em maior percentagem nesta amostra.

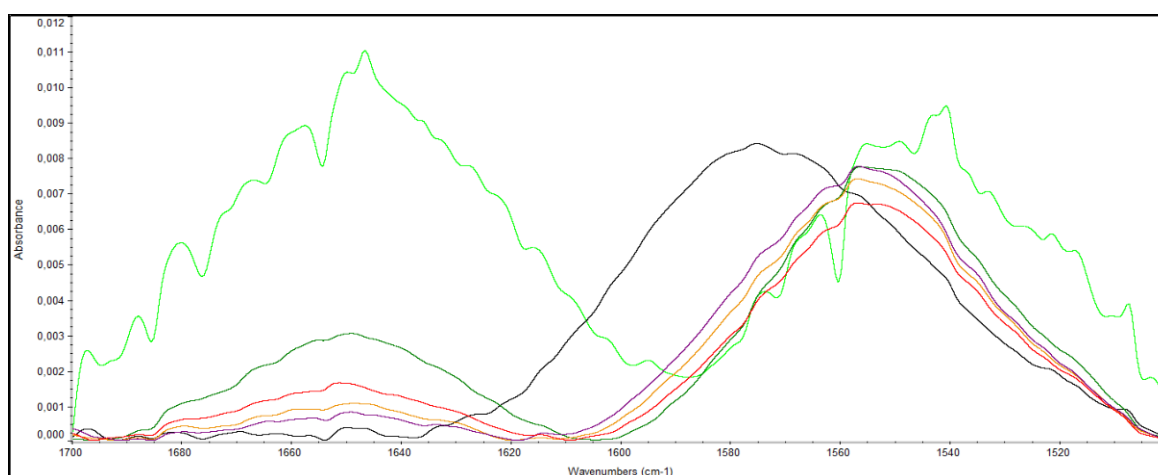
Em jeito de conclusão, observa-se uma diminuição substancial da percentagem relativa à estrutura folha- $\beta$ , o aumento ligeiro da estrutura desordenada e volta- $\beta$ , e o aparecimento da estrutura hélice- $\alpha$ , aquando da diminuição da concentração da proteína na amostra. Como dito anteriormente, foi impossível de realizar a *Deconvolução de Fourier* das amostras EiL5 e EiL6, mas, com os dados obtidos das duas amostras que apresentam picos na zona da banda da amida I (EiLi e EiL4) é possível verificar uma variação estrutural da amostra.

### 3.1.3.2. Efeito da variação da concentração de extrato

#### a) Interação de extrato de cogumelo com o caseinato de sódio.

As amostras utilizadas para a elaboração desta análise foram extratos de cogumelo *Amanita ponderosa* interagindo com as soluções de caseinato de sódio, tendo ambas as amostras sido previamente preparadas em 2.2. e 2.3., respetivamente. De seguida, foram misturadas de acordo com as diferentes concentrações descritas em 3.1.3., e, em todas estas amostras, o tampão utilizado foi subtraído.

De forma a obter os espectros relativos às amostras de extrato com caseinato de sódio foi necessário proceder-se como em 3.1.2. a), encontrando-se representados, nas figuras 19 e 20, os espectros obtidos.



#### Legenda:

- Caseinato de sódio (C)
- Extrato (E)
- E1Ci (6 mg/mL)
- E2Ci (9 mg/mL)
- E3Ci (12 mg/mL)
- EiCi (Amostra inicial – i; 3 mg/mL)

**Figura 19** – Espectros FTIR-ATR das amostras de caseinato de sódio (36 mg/mL) interagindo com o extrato, com aumento da concentração de extrato, comparando com a amostra de extrato e de caseinato de sódio (1700-1250  $\text{cm}^{-1}$ ).

Na figura 19, é possível verificar a ocorrência alterações nas zonas relativas às bandas de amida (I e II), à medida que se aumenta a concentração de extrato nas amostras, verificando-se variações mais significativas na zona da banda da amida II.

Ao avaliar os picos relativos às bandas de amida I e II, é possível verificar que estes se encontram na mesma zona, mas com variação ao nível da absorvância detetada.

Os dois conjuntos de sinais relativos a essas bandas de amida apresentam números de onda similares, mas com intensidades e valores de intensidade da absorvância muito diferentes

nas quatro amostras em análise (EiCi a E3Ci), pelo que se, verifica a ação dessa variação de concentração de extrato nas amostras.

Ao analisar as amostras, na zona da banda da amida I, destaca-se a existência de um incremento da absorvância registada, ou seja, a amostra E3Ci é a que apresenta maior absorvância, ao passo que a amostra EiCi é que apresenta menor. Mas por outro lado, se estudar a zona da banda da amida II constata-se exatamente o inverso, já que a amostra que apresenta maior absorvância é a amostra EiCi, concluindo-se que ao aumentar a concentração de extrato a absorvância da amostra, nesta banda, vai decair, notando-se uma maior amplitude da banda e maior dificuldade de deteção do máximo da mesma.

De seguida, efetuou-se a *Deconvolução de Fourier* da banda da amida I de cada uma destas amostras, para quantificar a composição estrutural secundária das proteínas, cujos dados estão indicados nas figuras A3, A15- A17 (Apêndice A) e nas tabelas 16, B1, B13- B15 (Apêndice B).

**Tabela 15-** *Deconvolução de Fourier* da banda de amida I referentes às amostras de extrato com caseinato, aumentando a concentração de extrato, representado na figura 19 (figuras A3, A15-A17 do Apêndice A).

Estrutura Secundária (%)	Amostras			
	EiCi (3 mg/mL)	E1Ci (6 mg/mL)	E2Ci (9 mg/mL)	E3Ci (12 mg/mL)
Volta- $\beta$	37,24	19,76	19,02	27,73
Hélice- $\alpha$	----	30,72	20,86	24,93
Estrutura Desordenada	10,12	17,15	30,76	24,42
Folha- $\beta$	Antiparalela	27,98	13,22	9,72
	Paralela	24,66	19,16	17,90

*Nota:* os valores relativos à concentração são relativos à concentração de extrato nas amostras.

C = Caseinato de Sódio; E = Extrato de cogumelo, i = amostra inicial

Com os dados relativos à *Deconvolução de Fourier* das amostras de caseinato de sódio interagindo com o extrato, com aumento da concentração deste último, presentes na tabela 15, verifica-se desde logo o aparecimento de uma nova estrutura secundária, quando se compara a amostra EiCi com as amostras E1Ci, a estrutura hélice- $\alpha$ , sendo a mais representativa nessa amostra (30,72%). Também de salientar o aumento da estrutura desordenada (de 10,12% para 17,15%), enquanto as restantes amostras apresentam quebras nas suas percentagens, destacando-se a estrutura volta- $\beta$  que apresenta uma quebra muito acentuada (17,48%). Já a estrutura folha- $\beta$  apresenta uma quebra acentuada na sua globalidade (-20,26%) variando de forma mais ligeira as suas conformações: a paralela apresenta um ligeiro decréscimo de valor percentual (-5,50%); já a conformação antiparalela apresenta uma quebra mais acentuada (-14,76%). As variações percentuais

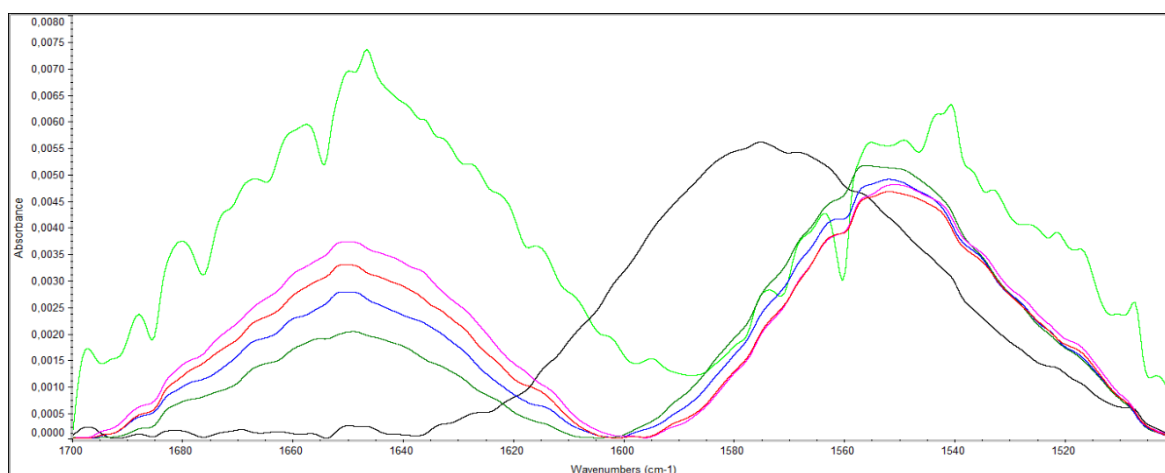
observadas são: diminuição acentuada da volta- $\beta$  e folha- $\beta$ , bem como o aumento da estrutura desordenada deve-se menor à interação da proteína-proteína, já que se aumenta a concentração de extrato na amostra.

Ao comparar os valores percentuais das estruturas secundárias das amostras com maiores concentrações de extrato (E1C1 a E3C1), obtidas pelo estudo da *Deconvolução* da banda da amida I, destaca-se a presença das 4 estruturas secundárias em todas as amostras, apresentando algumas variações da sua predominância aquando do aumento da concentração de extrato na amostra. Começando pela estrutura secundária volta- $\beta$ , denota-se um aumento da sua predominância com o aumentar da concentração de extrato, sendo a mais predominante na amostra E3C1 (com maior concentração de extrato). A estrutura desordenada também apresenta um acréscimo do seu valor percentual, enquanto a hélice- $\alpha$ , apesar de permanecer como uma das estruturas mais predominantes nestas amostras, vai diminuindo ligeiramente a sua percentagem. Por fim referir a estrutura folha- $\beta$ , vai perdendo alguma preponderância, já que ambas as conformações vão diminuindo as suas percentagens ao longo das amostras de extrato mais concentradas, sendo que, no entanto, apresentam sempre uma percentagem superior a 20% na sua globalidade.

Em conclusão, é possível menciona as variações percentuais existentes nas amostras analisadas com aumento da concentração de extrato, destacando-se o aumento da predominância de estruturas, como a volta- $\beta$  e a estrutura desordenada; a diminuição da importância das estruturas folha- $\beta$  e da hélice- $\alpha$ , ainda que esta apresente quebras pouco acentuadas. Estes dados preveem um aumento da instabilidade estrutural da proteína devido à diminuição das interações proteína-proteína, já que se aumenta a concentração de extrato.

Também importante salientar a diminuição da absorvância detetada com o aumentar da concentração de extrato nesta banda de amida.

Em seguida analisou-se a figura 20, na qual constam os espectros das amostras de extrato com caseinato, diminuindo a concentração de extrato (figura 20), sendo considerados para análise os picos relativos às bandas de amida I e II.



**Legenda:**

- Caseinato de sódio (C)      — Extrato (E)      — E1Ci (Amostra inicial – i; 3 mg/mL)
- E4Ci (2 mg/mL)      — E5Ci (1 mg/mL)      — E6Ci (0,5 mg/mL)

**Figura 20** – Espectros FTIR-ATR das amostras de caseinato de sódio (36mg/mL) interagindo com o extrato, com diminuição da concentração de extrato, comparando com a amostra de extrato e de caseinato de sódio (1700-1250 cm<sup>-1</sup>).

Na figura 20, é possível verificar a ocorrência alterações nas zonas relativas à banda da amida (I e II), à medida que diminui a concentração de extrato nas amostras.

Ao analisar os referidos picos destacou-se o aumento acentuado do sinal relativo à banda da amida I. Já no que respeita ao pico relativo à banda de amida II, destaca-se que os valores de absorvância são muito similares mesmo à medida que a concentração de extrato vai diminuindo. Posteriormente, realizou-se a *Deconvolução de Fourier* de cada uma destas amostras na banda da amida I, cujos dados estão indicados nas tabelas 17, B1, B16-B18 (Apêndice B) e nas figuras A3, A18-A20 (Apêndice A).

**Tabela 16** - *Deconvolução de Fourier* da banda de amida I referentes às amostras de extrato com caseinato, diminuindo a concentração de extrato, representado na figura 20 (figuras A3, A18-A20 do Apêndice A).

Estrutura Secundária (%)	Amostras			
	EiCi (3 mg/mL)	E4Ci (2 mg/mL)	E5Ci (1 mg/mL)	E6Ci (0,5 mg/mL)
Volta-β	37,24	21,65	17,69	17,64
Hélice-α	----	37,91	28,28	26,32
Estrutura Desordenada	10,12	----	22,07	22,66
Folha-β Antiparalela	27,98	14,89	31,97	33,38
Folha-β Paralela	24,66	25,54	----	----

*Nota:* os valores relativos à concentração são relativos à concentração de extrato nas amostras.

C = Caseinato de Sódio; E = Extrato de cogumelo, i = amostra inicial

Com os dados relativos à *Deconvolução de Fourier* das amostras de caseinato de sódio interagindo com o extrato, com aumento da concentração de extrato, presentes na tabela 16, destaca-se desde logo é o aparecimento da hélice- $\alpha$ , sendo a segunda estrutura mais representativa nessa amostra (37,91%) quando se compara a amostra E4Ci com a amostra E4Ci. As restantes estruturas apresentam quebras nas suas percentagens, destacando-se a estrutura volta- $\beta$  que apresenta uma quebra muito acentuada (-15,59%). A estrutura folha- $\beta$  apresenta uma quebra da sua predominância (-12,21%), mas as suas conformações variam de forma diferente: a antiparalela apresenta um elevado decréscimo de valor percentual (-13,09%); por outro lado, a conformação paralela apresenta um valor muito similar (24,66% para 25,54%). As variações percentuais detetadas, como a diminuição acentuada da volta- $\beta$  e folha- $\beta$  deve-se à menor interação da proteína-proteína, mesmo apesar da diminuição da concentração de extrato na amostra.

Quando se comparam os valores percentuais das estruturas secundárias das amostras E4Ci a E6C1, destaca-se a presença das 4 estruturas secundárias principais em todas as amostras, apesar de conformação paralela da estrutura folha- $\beta$  não estar representada em duas das amostras (as de menor concentração de extrato). No que respeita a cada uma dessas estruturas, iniciando pela estrutura secundária volta- $\beta$ , regista-se que a sua predominância vai diminuindo com a diminuição da concentração de extrato, sendo a menos predominante na amostra E6Ci. A estrutura desordenada também apresenta um acréscimo do seu valor percentual com a diminuição da concentração de extrato, ao invés do que acontece com a hélice- $\alpha$ , que diminui a sua predominância. Por fim, de salientar que na estrutura folha- $\beta$ , a conformação antiparalela vai ganhando preponderância, já que o seu valor percentual vai aumentando ao longo das amostras, passando de 14,89% na E4Ci para os 33,38 na amostra E6Ci.

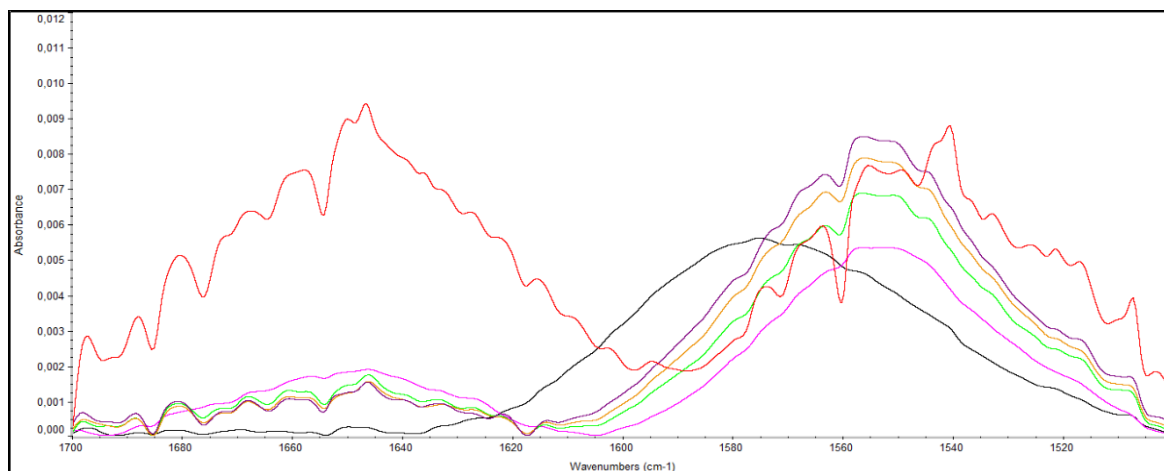
Em conclusão, verificam-se variações na estrutura secundária da proteína com a diminuição da concentração de extrato, destacando-se a diminuição da predominância de estruturas como a volta- $\beta$  e hélice- $\alpha$ , e a diminuição da importância das estruturas folha- $\beta$  (apesar do aumento da percentagem relativa à conformação antiparalela), ainda que esta apresenta quebras pouco acentuadas. Estes dados podem indiciar uma maior instabilidade estrutural da proteína por ação da diminuição da concentração de extrato nas amostras.

#### *b) Interação de extrato de cogumelo com o leite reconstituído.*

As amostras utilizadas para a elaboração desta análise foram extratos de cogumelo *Amanita ponderosa* interagindo com as soluções de caseinato de sódio, tendo ambas as amostras sido previamente preparadas em 2.2. e 2.3., respetivamente. De seguida, foram misturadas

de acordo com as diferentes concentrações descritas em 3.1.3., e, em todas estas amostras, o tampão utilizado foi subtraído.

De forma a obter os espectros relativos às amostras de extrato com caseinato de sódio foi necessário proceder-se como em 3.1.2. b), encontrando-se representados, nas figuras 21 e 22, os espectros obtidos.



**Legenda:**

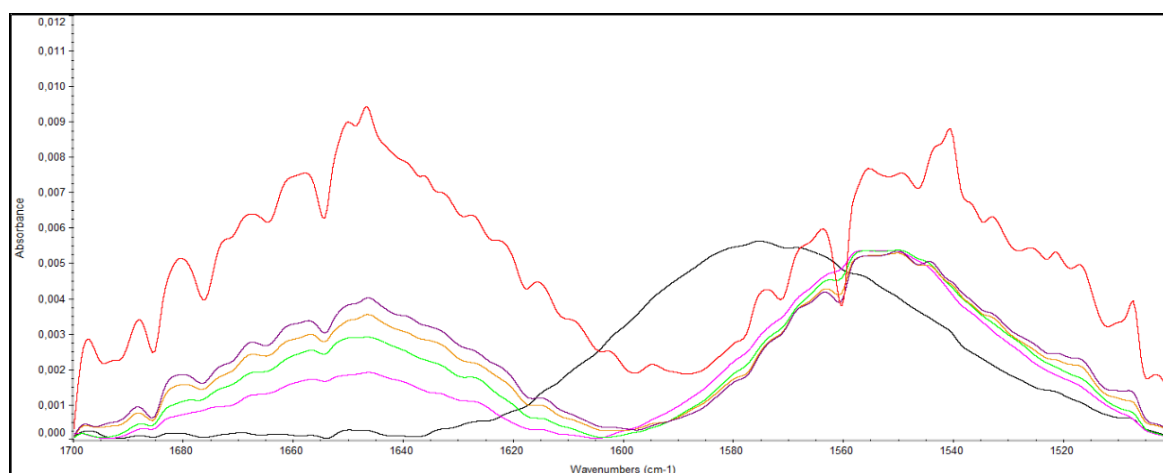
- Leite reconstituído (L)
- Extrato (E)
- EiLi (Amostra inicial – i; 3 mg/mL)
- EiLi (6 mg/mL)
- E2Li (9 mg/mL)
- E3Li (12 mg/mL)

**Figura 21** – Espectros FTIR-ATR das amostras de leite reconstituído (45 mg/mL) interagindo com o extrato, com aumento da concentração de extrato, comparando com a amostra de extrato e de caseinato de sódio (1700-1250  $\text{cm}^{-1}$ ).

Na figura 21, é possível verificar a ocorrência alterações nas zonas relativas à banda da amida (I e II), à medida que se aumenta a concentração de extrato nas amostras.

Ao analisar os referidos picos destacou-se que o sinal relativo à banda da amida I, muito amplo que não permitiu detetar os picos de cada uma das amostras. Já no que respeita ao pico relativo à banda de amida II, destaca-se que os valores de absorvância vão aumentando à medida que se aumenta a concentração de extrato. Neste caso não realizou a *Deconvolução de Fourier* de cada uma destas amostras na banda da amida I, já que banda é muito ampla e não permite uma correta a análise das amostras.

De seguida, analisou-se a figura 22, na qual constam os espectros das amostras de extrato com leite reconstituído, diminuindo a concentração de extrato, sendo considerados para análise os picos relativos às bandas de amida I e II.



**Legenda:**

- Leite reconstituído (L)      ■ Extrato (E)      ■ EiLi (Amostra inicial – i; 3 mg/mL)
- E4Li (2mg/mL)      ■ E5Li (1 mg/mL)      ■ E6Li (0,5 mg/mL)

**Figura 22** – Espectros FTIR-ATR das amostras de leite reconstituído (45 mg/mL) interagindo com o extrato, com diminuição da concentração de extrato, comparando com a amostra de extrato e de caseinato de sódio (1700-1250 cm<sup>-1</sup>).

Na figura 22, é possível verificar o aumento acentuado do sinal relativo à banda da amida I, à medida que se diminui a concentração de extrato nas amostras, enquanto na zona relativa à banda de amida II, as amostras apresentam intensidades e absorvâncias muito similares. Ao analisar os referidos picos destacou-se o aumento acentuado do sinal relativo à banda da amida I. Posteriormente, realizou-se a *Deconvolução de Fourier* de cada uma destas amostras na banda da amida I, cujos dados estão indicados nas tabelas 17, B8, B19-B21 (Apêndice B) e nas figuras A10, A21-A23 (Apêndice A).

**Tabela 17** - *Deconvolução de Fourier* da banda de amida I referentes às amostras de extrato com leite reconstituído, diminuindo a concentração de extrato.

Estrutura Secundária (%)	Amostras			
	EiLi (3 mg/mL)	E4Li (2 mg/mL)	E5Li (1 mg/mL)	E6Li (0,5 mg/mL)
Volta-β	22,80	19,63	18,11	18,40
Hélice-α	----	----	18,87	19,19
Estrutura Desordenada	25,79	46,10	33,58	31,39
Folha-β				
<i>Antiparalela</i>	31,40	34,26	29,43	31,02
<i>Paralela</i>	20,01	----	----	----

*Nota:* os valores relativos à concentração são relativos à concentração de extrato nas amostras.

L = Leite reconstituído; E = Extrato de cogumelo, i = amostra inicial

Com os dados relativos à *Deconvolução de Fourier* das amostras de leite reconstituído interagindo com o extrato, com diminuição da concentração de extrato, presentes na tabela 17, destaca-se desde logo a estrutura desordenada, a mais predominante na amostra, que se apresenta como metade das estruturas verificadas (46,10%), quando se compara a amostra EiLi com a E4Li. A segunda estrutura mais predominante na amostra é a folha- $\beta$  antiparalela, que representa 34,26% de toda a amostra. Por fim, a estrutura volta- $\beta$ , apresenta um valor muito similar em todas as amostras de extrato com leite reconstituído, diminuindo a concentração de extrato. A diminuição da folha- $\beta$ , e o aumento da estrutura desordenada pode indicar um aumento da instabilidade estrutural das amostras de extrato interagindo com o leite reconstituído, com a diminuição da concentração de proteína.

Ao comparar os valores percentuais das estruturas secundárias das amostras com menores concentrações de extrato (E5Li a E6Li), obtidas pelo estudo da banda da amida I, destaca-se a desde logo o aparecimento da estrutura hélice- $\alpha$ , com uma percentagem similar nas duas amostras (18-19%). Também de salientar um ligeiro acréscimo da conformação antiparalela da estrutura folha- $\beta$  entre as amostras E5Li e E6Li. Por fim de referir que a estrutura volta- $\beta$ , apresenta valores muito similares nestas duas amostras.

Em conclusão, das variações percentuais existentes nas amostras analisadas verificadas com a diminuição da concentração de extrato, destaca-se, principalmente, a diminuição da predominância de estruturas como a estrutura desordenada, enquanto as restantes estruturas detetadas se apresentam com valores sempre muito similares. Estes dados podem indiciar uma maior instabilidade estrutural da proteína.

## **3.2. Espectroscopia de Fluorescência**

### **3.2.1. Extrato de cogumelos *Amanita ponderosa* e amostras proteicas**

Utilizaram-se amostras provenientes de extratos obtidos a partir de cogumelos *Amanita ponderosa*, preparados previamente em 2.2..

Já as amostras proteicas utilizadas foram preparadas, como mencionado previamente em 2.3..

#### **3.2.1.1. Extrato *Amanita ponderosa* em água e proteínas em solução**

Para o estudo da amostra de extrato em água foram pipetados 2 mL da amostra de extrato (de cogumelo, preparado previamente em 2.2.) em água para uma célula, sendo esta

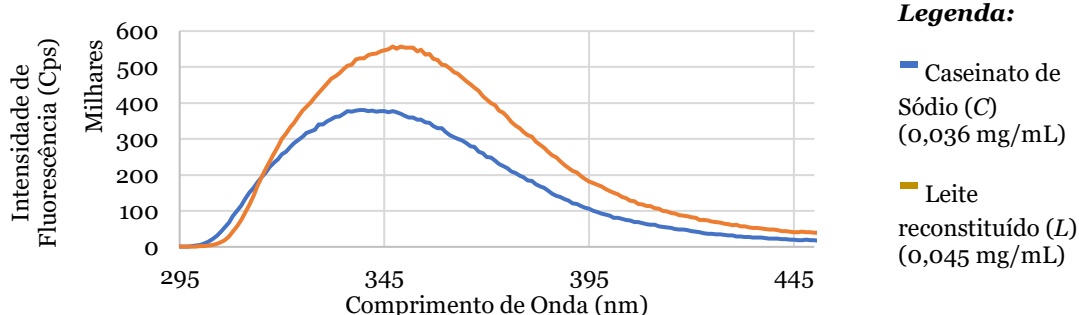
colocada no espectrofluorímetro e, de seguida, foi adquirido o espectro de emissão da amostra de extrato, de acordo com 2.4.2..



**Figura 23** – Espectros de emissão de fluorescência da amostra de extrato *Amanita ponderosa* (0,003 mg/mL) em água (445 – 295 nm).

Iniciando pelo estudo da amostra de extrato de cogumelo em água (figura 23), verificou-se que a intensidade se mantém muito residual até ao comprimento de onda 445 nm. Por esse motivo, pode concluir-se a inexistência de proteína na amostra de cogumelo, dado que a proteína deve “emitir” fluorescência num comprimento de onda próximo dos 350 nm, comprimento de onda máximo característico da emissão de triptofano (Lakowicz, J.R., 2006).

Já para o estudo das amostras de proteína em solução foram pipetados 2 mL da amostra da amostra de proteína (caseinato de sódio e leite reconstituído, previamente preparado em 2.3.) em água, para uma célula, que foi colocada no espectrofluorímetro, e, posteriormente, foi adquirido o espectro de emissão das amostras, de acordo com 2.4.2..



**Figura 24** – Espectros de emissão de fluorescência das amostras de proteínas (445 – 295 nm).

No que se refere ao espectro da figura 24, os espectros de emissão das proteínas, apresentam fluorescência na zona entre os 295 e os 450 nm, como seria de esperar, sendo os comprimentos de onda máximos detetados 340nm (caseinato de sódio) e 347 nm (leite reconstituído). Também é possível reparar que, as curvas relativas aos espectros de proteína em análise são idênticas, variando ligeiramente o nível de intensidade de fluorescência das amostras, devido à diferença de concentração existente. Por esse motivo, e como a

concentração de proteína do soro no leite é mais elevada, a sua intensidade de fluorescência também é superior à verificada para a amostra de caseinato de sódio.

### 3.2.2. Interação de extrato de cogumelo com as proteínas em estudo (fluorescência)

Para analisar a interação do extrato de cogumelo *Amanita ponderosa*, obtido em 2.2., com a proteína, preparada em 2.3., foram preparados dois tipos de amostras:

- amostras proteicas, em interação com o extrato (Ei), com variação da concentração de proteína mantendo a concentração de extrato, 0,003 mg/mL (sete amostras de caseinato de sódio, EiCi a EiC6; e sete amostras de leite reconstituído, EiLi a EiL6);
- amostras proteicas, em interação com o extrato (Ei), mas com variação da concentração de extrato, mantendo a das amostras proteicas, 0,036 mg/mL para o caseinato de sódio e 0,045 mg/mL para o leite reconstituído (sete amostras de caseinato de sódio, EiCi a E6Ci; e sete amostras de leite reconstituído, EiLi a E6Li).

De referir que nas amostras de leite reconstituído, a concentração de proteína foi variada em função da massa de leite em pó considerada.

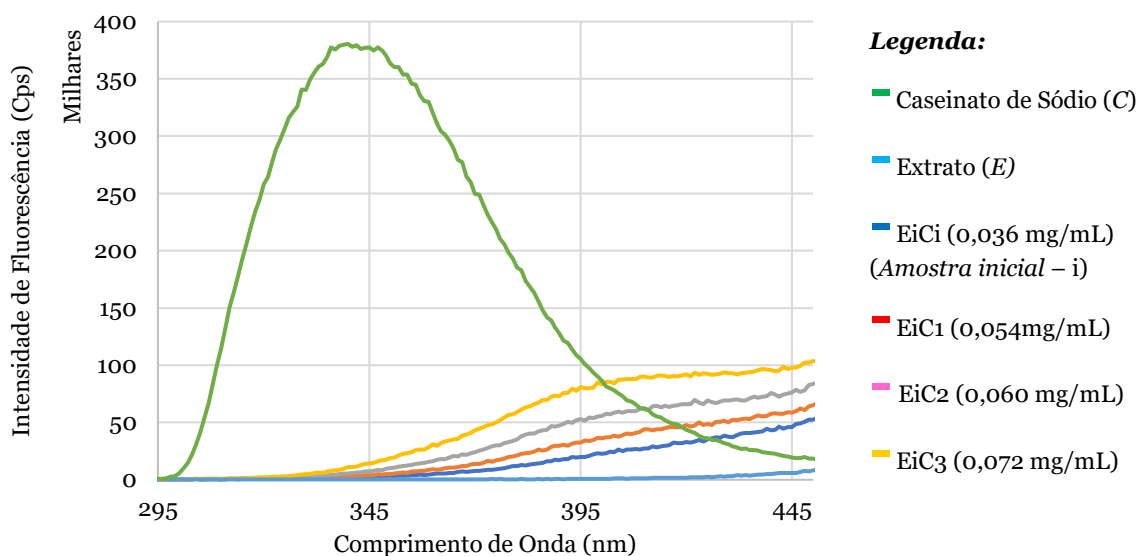
As amostras de proteína (caseinato de sódio e leite reconstituído) em interação com o extrato foram preparadas à temperatura ambiente e analisadas 45 minutos após a sua preparação. Os valores obtidos são valores médios resultado de 3 ensaios realizados. As concentrações das amostras de caseinato de sódio e de leite reconstituído em interação com o extrato, encontram-se descritas na tabela 10 (estudo de espectroscopia de infravermelhos), sendo que para o estudo da fluorescência as mesmas encontram-se todas reduzidas  $10^{-3}$  vezes.

#### 3.2.2.1 Efeito da variação da concentração da proteína

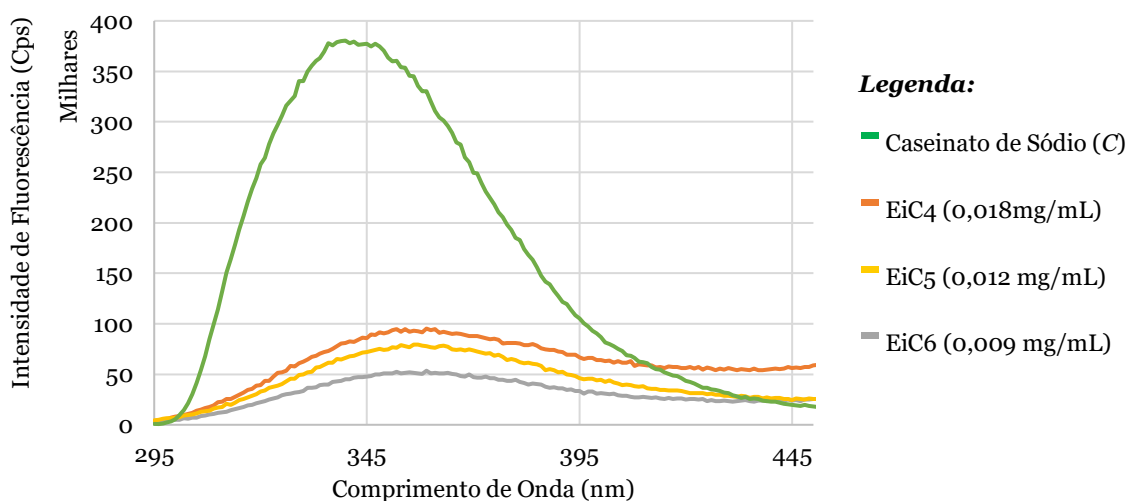
##### a) *Interação de extrato de cogumelo com o caseinato de sódio.*

As amostras utilizadas para a elaboração desta análise foram extratos de cogumelo *Amanita ponderosa* em interação com as soluções de caseinato de sódio, tendo sido previamente preparadas em 2.2. e 2.3., respetivamente. Posteriormente, foram misturadas de acordo com 3.2.2., e, em todas as amostras usadas para espectros de fluorescência, o tampão utilizado foi subtraído.

De forma a obter os espectros de emissão de fluorescência relativos às amostras de extrato com caseinato de sódio foi necessário proceder-se como em 3.2.1., estando representados, nas figuras 25 e 26, os espectros obtidos.



**Figura 25** – Espectros de emissão de fluorescência das amostras de extrato (concentração 0,003 mg/mL) com caseinato de sódio, aumentando a concentração de proteína (valores relatados na legenda), em comparação com a amostra de extrato e de caseinato de sódio (450-295 nm).



**Figura 26** – Espectros de emissão de fluorescência das amostras de extrato (concentração 0,003mg/mL) com caseinato de sódio, diminuindo a concentração de proteína (valores relatados na legenda), em comparação com a amostra de caseinato de sódio (450-295 nm).

Tal como verificado anteriormente (figura 24), a amostra de caseinato de sódio apresenta elevada intensidade de fluorescência, e o comprimento de onda a que atinge o máximo de fluorescência detetada é a 340nm. De seguida, ao analisar na sua globalidade, os espectros de emissão da amostra inicial (EiCi) em comparação com as amostras onde ocorreu aumento da concentração de proteína (EiC1 a EiC3), verificou-se que a intensidade de fluorescência vai aumentando à medida que se aumenta a concentração de proteína, sendo

a amostra EiC3 é a que apresenta uma intensidade de fluorescência mais elevada. Já no que se refere ao comprimento de onda onde as amostras atingem o seu nível máximo de intensidade neste espectro mantém-se a 450nm.

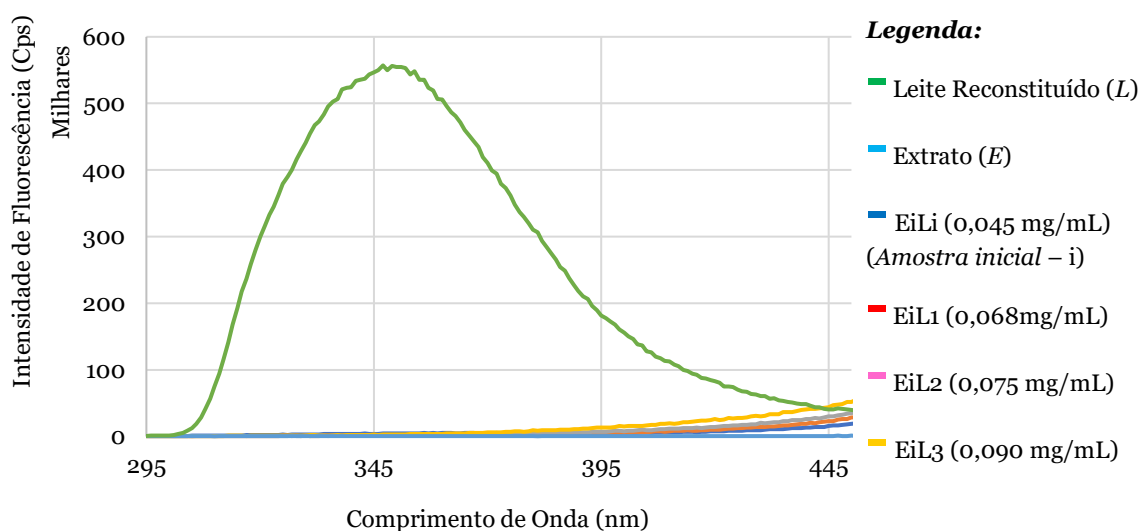
Depois analisaram-se os espectros de emissão das amostras EiC4 a EiC6, amostras nas quais ocorre uma diminuição da concentração da proteína, e verificou-se uma diminuição da intensidade de fluorescência à medida que se diminui a concentração da proteína na amostra. No que se refere ao comprimento de onda máximo, este mantém-se estável a 357-359 nm.

Quando se comparam as amostras com aumento da concentração da proteína (EiC1 a EiC3) com as amostras com diminuição dessa concentração (EiC4 a EiC6) denota-se que esta últimas (EiC4 a EiC6) apresentam fluorescência na zona entre os 295 nm e os 395 nm, tal como ocorre aquando do espectro relativo à emissão de fluorescência do caseinato de sódio, mas a uma intensidade inferior; o que não se verifica para as amostras EiC1 a EiC3.

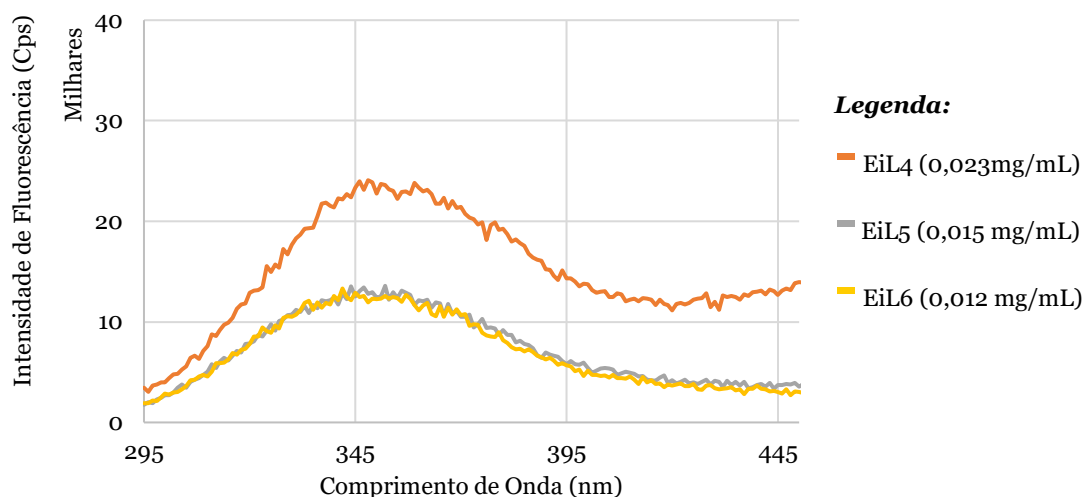
#### b) Interação de extrato de cogumelo com o leite reconstituído.

As amostras utilizadas para a elaboração desta análise foram extratos de cogumelo *Amanita ponderosa* em interação com as soluções de caseinato de sódio, tendo ambas as amostras sido previamente preparadas em 2.2. e 2.3., respetivamente. Posteriormente, foram misturadas de acordo com 3.2.2., e em todas as amostras usadas para espectros de fluorescência, o tampão utilizado foi subtraído.

De forma a obter os espectros de emissão relativos às amostras de extrato com leite reconstituído foi necessário proceder-se como em 3.2.1., estando representados, nas figuras 27 e 28, os espectros obtidos.



**Figura 27** – Espectros de emissão de fluorescência das amostras de extrato (concentração 0,003 mg/mL) com leite reconstituído, aumentando a concentração de proteína (valores relatados na legenda) em comparação com a amostra de extrato e de leite reconstituído (450-295 nm).



**Figura 28** – Espectros de fluorescência das amostras de extrato (concentração 0,003 mg/mL) com leite reconstituído, diminuindo a concentração de proteína (valores relatados na legenda) (450-295 nm).

Analisando o espectro relativo à amostra de leite reconstituído (figura 24) apresenta elevada intensidade de fluorescência e superior à da amostra de caseinato de sódio. Já no que respeita ao comprimento de onda a que atinge o máximo de fluorescência detetada, este situa-se a 347 nm, valor 7 nm superior ao verificado na amostra de caseinato de sódio.

Posteriormente, aquando da análise global dos espectros de emissão da amostra inicial (EiLi) em comparação com as amostras onde ocorreu aumento da concentração de proteína (EiL1 a EiL3), verifica-se que a intensidade de fluorescência vai aumentando à medida que se aumenta a concentração de proteína, tal como se verificou no mesmo tipo de amostras, mas com o caseinato de sódio (figura 25). Já no que se refere ao comprimento de onda onde as amostras atingem o seu nível máximo de intensidade neste espectro mantém-se a 450 nm.

Depois analisaram-se os espectros de emissão das amostras EiL4 a EiL6, amostras nas quais ocorre uma diminuição da concentração de leite reconstituído, detetando-se uma diminuição da intensidade de fluorescência à medida que se diminui a concentração da proteína na amostra, tal como acontece aquando da utilização do caseinato de sódio (figura 26). No que se refere ao comprimento de onda máximo, este é variável entre os 342 nm (EiL6), 348 nm (EiL4), e os 352 nm (EiL5).

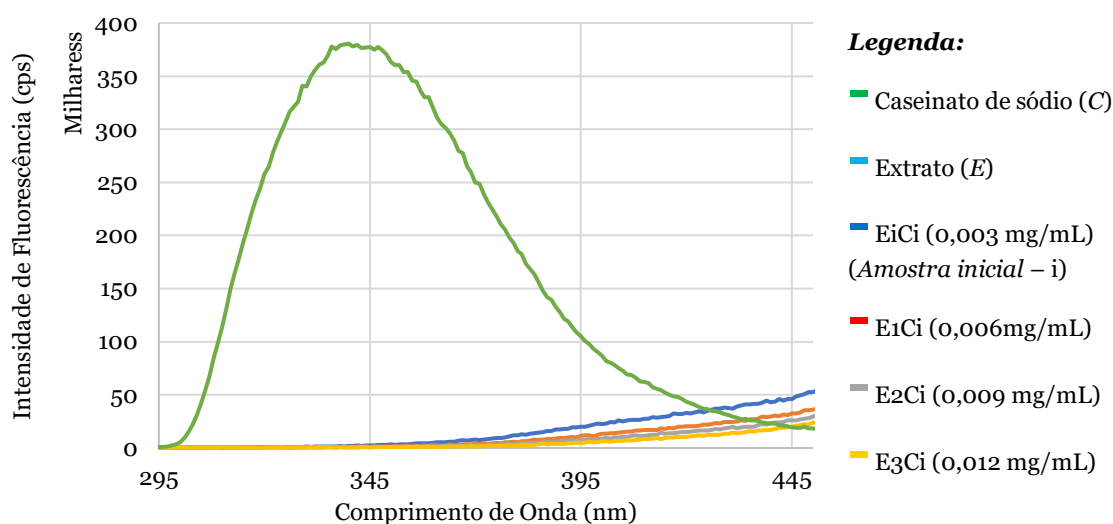
Quando se comparam as amostras com aumento da concentração da proteína (EiL1 a EiL3) com as amostras com diminuição dessa concentração (EiL4 a EiL6) denota-se que estas últimas (EiL4 a EiL6) apresentam fluorescência na zona entre os 295 nm e os 395 nm, tal como ocorre aquando do espectro relativo à emissão de fluorescência do leite reconstituído, mas a uma intensidade muito inferior; o que não se verifica para as amostras EiL1 a EiL3.

### 3.2.2.2. Efeito da variação da concentração do extrato

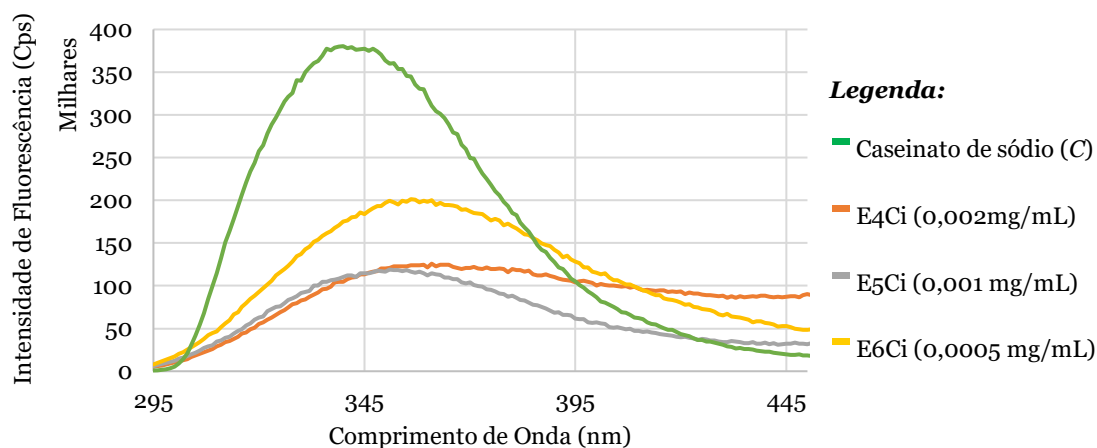
#### a) Interação de extrato de cogumelo com o caseinato de sódio.

As amostras utilizadas para a elaboração desta análise foram extratos de cogumelo *Amanita ponderosa* em interação com as soluções de caseinato de sódio, tendo ambas as amostras sido previamente preparadas em 2.2. e 2.3., respectivamente. Posteriormente, foram misturadas de acordo com 3.2.2., e em todas as amostras usadas para espectros de fluorescência, o tampão utilizado foi subtraído.

De forma a obter os espectros relativos às amostras de extrato com leite reconstituído foi necessário proceder-se como em 3.2.1., estando representados, nas figuras 29 e 30, os espectros obtidos.



**Figura 29** – Espectros de emissão de fluorescência das amostras de extrato com caseinato de sódio (0,036 mg/mL), aumentando a concentração de extrato, em comparação com a amostra de extrato e de caseinato de sódio (450-295 nm).



**Figura 30** – Espectros de emissão de fluorescência das amostras de extrato com caseinato de sódio (0,036 mg/mL), diminuindo a concentração de extrato, em comparação com a amostra de caseinato de sódio (450-295 nm).

Iniciando pela análise global dos espectros de emissão da amostra inicial (EiCi) em comparação com as amostras onde ocorreu aumento da concentração de extrato (E1Ci a E3Ci), verifica-se que a intensidade de fluorescência vai diminuindo à medida que se aumenta a concentração de extrato na amostra, pelo que se pode dizer que o extrato funciona como *quencher*, e desse modo ocorrem interações entre o extrato e a proteína. Das três amostras, a E1Ci é a que apresenta uma intensidade de fluorescência mais elevada, em contraste com a amostra E3Ci, que apresenta uma intensidade de fluorescência mais reduzida. Já no que se refere ao comprimento de onda onde as amostras atingem o seu nível máximo de intensidade neste espectro mantém-se a 450nm.

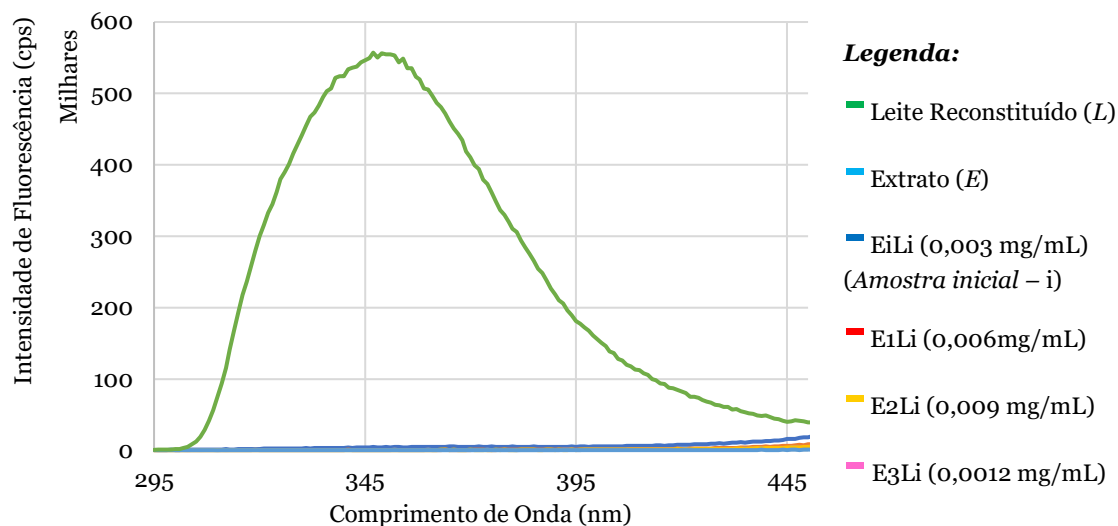
Depois analisaram-se os espectros de emissão das amostras E4Ci a E6Ci, amostras nas quais ocorre uma diminuição da concentração de extrato, e verificou-se um aumento da intensidade de fluorescência à medida que se diminui a concentração da proteína na amostra. Por outro lado, no que respeita ao comprimento de onda máximo, este decresce com a diminuição da concentração de extrato, variando entre os 361 nm (E6Ci) e os 351 nm (E5Ci).

Ao comparar as amostras de caseinato de sódio com aumento da concentração da proteína (E1Ci a E3Ci) com as amostras com diminuição dessa concentração (E4Ci a E6Ci) denota-se que estas últimas (E4Ci a E6Ci) apresentam fluorescência na zona entre os 295 nm e os 395 nm, tal como ocorre aquando dos espectros relativos à emissão de fluorescência do caseinato de sódio, mas a uma intensidade muito inferior; o que não se verifica para as amostras E1Ci a E3Ci.

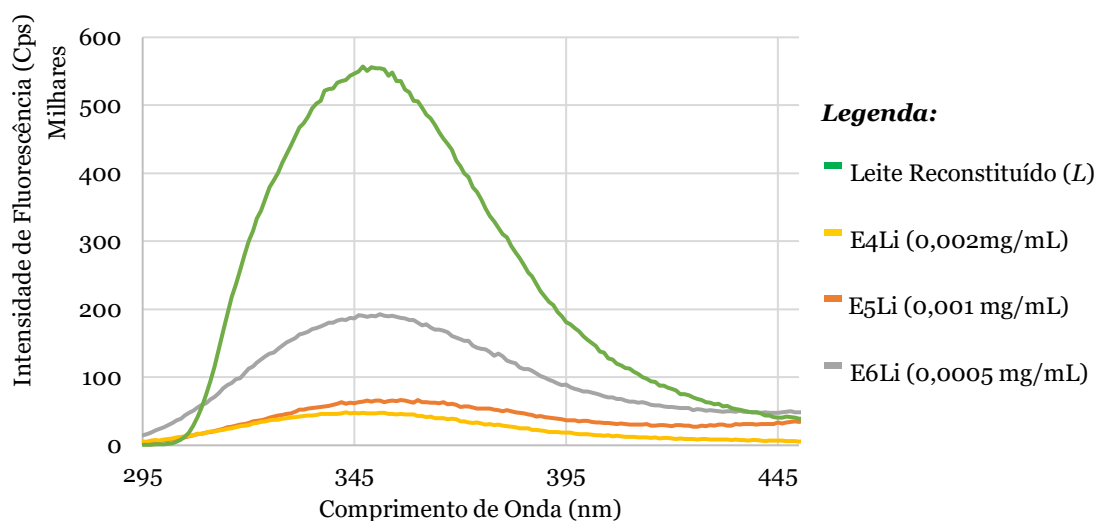
#### *b) Interação de extrato de cogumelo com o leite reconstituído.*

As amostras utilizadas para a elaboração desta análise foram extratos de cogumelo *Amanita ponderosa* em interação com as soluções de caseinato de sódio, tendo ambas as amostras sido previamente preparadas em 2.2. e 2.3., respetivamente. Posteriormente, foram misturadas de acordo com 3.2.2., e em todas as amostras usadas para espectros de fluorescência, o tampão utilizado foi subtraído.

De forma a obter os espectros relativos às amostras de extrato com leite reconstituído foi necessário proceder-se como em 3.2.1., estando representados, nas figuras 31 e 32, os espectros obtidos.



**Figura 31** – Espectros de emissão fluorescência das amostras de extrato com leite reconstituído (0,045 mg/mL), aumentando a concentração de extrato, em comparação com a amostra de extrato e de leite reconstituído (450-295 nm).



**Figura 32** – Espectros de emissão de fluorescência das amostras de extrato com leite reconstituído (0,045 mg/mL), diminuindo a concentração de extrato, em comparação com a amostra de leite reconstituído (450-295 nm).

Começando pela análise global dos espectros de emissão da amostra inicial (EiLi) em comparação com as amostras onde ocorreu aumento da concentração de extrato (E1Li a E3Li), verifica-se que a intensidade de fluorescência vai diminuindo à medida que se aumenta a concentração de extrato na amostra. Nesse âmbito pode dizer-se que o extrato funciona como *quencher*, e desse modo ocorrem interações entre o extrato e a proteína, tal como verificado nas mesmas amostras, mas com a proteína caseinato de sódio (figura 30). Os espectros das amostras E2Li e E3Li apresenta intensidades de fluorescência muito idênticas. Das três amostras, a E1Li é a que apresenta uma intensidade de fluorescência mais elevada, em contraste com a amostra E3Li, que apresenta uma intensidade de

fluorescência mais reduzida. Já no que se refere ao comprimento de onda onde as amostras atingem o seu nível máximo de intensidade neste espectro mantém-se a 450nm.

Depois analisaram-se os espectros de emissão das amostras E4Li a E6Li, amostras nas quais ocorre uma diminuição da concentração de extrato, e verificou-se um aumento da intensidade de fluorescência à medida que se diminui a concentração da proteína na amostra, enquanto, no que respeita ao comprimento de onda máximo, este aumenta com a diminuição da concentração de extrato, variando entre os 343 nm (E4Li) e os 361 nm (E5Li). Ao comparar as amostras de leite reconstituído com aumento da concentração da proteína (E1Li a E3Li) com as amostras com diminuição dessa concentração (E4Li a E6Li) denota-se, tal como verificado nas amostras deste tipo em que a proteína usada foi o caseinato de sódio (figuras 31 e 32), que as amostras nas quais se diminuiu a concentração de extrato (E4Li a E6Li) apresentam fluorescência na zona entre os 295 nm e os 395 nm, tal como ocorre aquando dos espectros relativos à emissão de fluorescência do leite reconstituído, mas a uma intensidade muito inferior; o que não se verifica para as amostras em que ocorre o aumento da concentração de extrato (E1Li a E3Li).

## Capítulo 4

### Conclusões e Perspetivas Futuras

Esta dissertação, teve como base o estudo da possível interação dos componentes dos cogumelos com as proteínas do leite, nos problemas gastrointestinais que se verificaram aquando da ingestão de cogumelos em conjunto com produtos lácteos. Para esse estudo utilizou-se um extrato de cogumelo *Amanita ponderosa*, em interação com dois tipos de proteínas: a solução de caseinato de sódio e a fração de caseínas (obtidas a partir do leite reconstituído), sendo que essas interações foram analisadas através de duas técnicas espectroscópicas: a espectroscopia de infravermelho (FTIR-ATR) e a espectroscopia de fluorescência. O objetivo deste trabalho era estudar se ocorre a interação de extratos aquosos de cogumelo *Amanita ponderosa* com proteínas do leite e, desse modo, a avaliar se as interações originam alterações da estrutura secundária e/ou terciária das proteínas, que possam provocar reações adversas no consumidor.

Para o estudo da interação do extrato de cogumelo com a amostra de proteína, foram preparados alguns tipos de amostras, analisados através de duas técnicas espectroscópicas ao longo desta dissertação: amostras isoladas (extrato no estado aquoso e no sólido; de caseinato de sódio e de leite reconstituído); amostras com variação da concentração de proteína (EiC1 a EiC6; EiL1 a EiL6); e outras amostras com a variação da concentração de extrato (E1Ci a E6Ci; E1Li a E6Li).

Pelo estudo da espectroscopia de infravermelhos, foi possível verificar a inexistência de proteína nas amostras de extrato, quer no estado sólido, quer no estado aquoso, uma vez que não se deteta a banda de amida I em cada uma das amostras, como seria de esperar caso se verificasse a existência de proteína. No que respeita às amostras proteicas, ambas apresentam as bandas de amida I e II, características da presença de proteína e desse modo foram realizadas *Deconvoluções de Fourier* das respetivas amostras. No ensaio relativo à solução de caseinato de sódio (3.1.2. a)), verificou-se uma predominância de estruturas secundárias desordenadas, bem como a menor prevalência da estrutura volta-  $\beta$ , o que indicia uma elevada instabilidade da amostra. Instabilidade essa, também detetada na amostra relativa ao leite reconstituído (3.1.2. b)), devido à elevada percentagem relativa às estruturas desordenadas.

Nos ensaios em que se verificou aumento da concentração de caseinato de sódio (3.1.3.1. a), amostras EiC1 a EiC3), prevê-se um aumento da estabilidade estrutural da proteína devido ao acréscimo de interações proteína-proteína, já que o caseinato é pouco hidrofóbico (ao

invés das caseínas, que são hidrofóbicas); e também se verifica uma diminuição da absorvância detetada, o que evidencia a ocorrência interações que vão afetar as ligações N-H. Por outro lado, aquando da diminuição da concentração de caseinato de sódio na amostra (3.1.3.1. a), amostras EiC4 a EiC6), é possível destacar-se a predominância das estruturas volta- $\beta$  e folha- $\beta$  (mas com percentagens mais reduzidas quando comparado com as amostras onde ocorre um aumento da concentração da proteína); e um incremento da percentagem relativa à estrutura desordenada. Estes dados podem, novamente, indiciar uma maior instabilidade estrutural da proteína por ação do extrato. Noutra âmbito, quando se aumenta a concentração de extrato de cogumelo na amostra com caseinato de sódio (3.1.3.2. a), amostras E1Ci a E3Ci), observa-se um aumento da prevalência das estruturas volta- $\beta$  e a estrutura desordenada; e uma diminuição da importância das estruturas folha- $\beta$  e da hélice- $\alpha$ . Estes dados preveem um aumento da instabilidade estrutural da proteína devido à diminuição das interações proteína-proteína. Aquando da diminuição da concentração de extrato (3.1.3.2. a), amostras E4Ci a E6Ci), no que se refere a estrutura terciária das proteínas presentes nessas amostras, verifica-se uma diminuição da predominância de estruturas volta- $\beta$ , um incremento da estrutura desordenada, bem como uma diminuição da importância das estruturas folha- $\beta$ . Também se destaca, nesta amostra, que a hélice- $\alpha$  apresenta valores muito similares, e nesse sentido, estes dados podem indiciar uma maior instabilidade estrutural da proteína.

No que se refere a ensaios com amostras de extrato em interação com o leite reconstituído, nas quais ocorre um aumento da concentração dessa proteína (3.1.3.1. b), amostras EiL1 a EiL3), os dados sugerem uma maior estabilização da amostra, já que apresenta uma diminuição das estruturas desordenadas, um aumento da volta- $\beta$ , e uma estabilização da percentagem relativa à estrutura folha- $\beta$ . De referir que o extrato de cogumelo, nas amostras de extrato em interação com o leite reconstituído, nas quais se aumentou a concentração de extrato (E1Li a E3Li), funciona como *quencher* de fluorescência e, desse modo, ocorrem interações entre o extrato e as proteínas, o que se verifica também nas mesmas amostras, mas com a proteína caseinato de sódio (amostras E1Ci a E3Ci). Em oposição, quando se diminui a concentração de proteína na amostra (3.1.3.1 b), amostras EiL4 a EiL6), verifica-se uma diminuição substancial da percentagem relativa à estrutura folha- $\beta$ , o aumento ligeiro da estrutura desordenada e volta- $\beta$ , e o aparecimento da estrutura hélice- $\alpha$ . Neste caso específico, estes dados carecem de estudos mais aprofundados, já que neste apenas foi possível realizar a *Deconvolução de Fourier* de uma das amostras (EiL4), dada a elevada amplitude das bandas verificadas, o que impediu a correta realização da referida desconvolução. Como forma a ultrapassar este problema podem ser realizados ensaios com concentrações mais reduzidas.

O mesmo impedimento ocorreu nas amostras de extrato em interação com o leite reconstituído, nas quais ocorre um aumento da concentração de extrato (3.1.3.2 b), amostra E1Li a E3Li), o que impossibilita a caracterização estrutural dessas amostras. Porém, nas amostras em que ocorre diminuição da concentração de extrato (3.1.3.2 b), amostras EiL4 a EiL6), a deconvolução já é possível efetuar, o que revelou uma diminuição da predominância da estrutura desordenada, e sendo assim, uma maior instabilidade estrutural da proteína.

Agora no que se refere à espectroscopia de fluorescência, foi possível denotar a ausência de proteína na amostra de extrato de cogumelo aquoso (3.2.1.1.), visto que não se verificou a emissão de fluorescência num comprimento de onda próximo dos 350 nm, zona característica para a presença de proteína. No que se refere ao estudo de amostras de extrato em interação com a proteína, com variações das concentrações de proteína (3.2.2.1. a), amostras EiC1 a EiC6; 3.2.2.1. b), amostras EiL1 e EiL6), as conclusões são similares, quer para o estudo do caseinato de sódio, quer para o estudo do leite reconstituído. Verifica-se a existência de proporcionalidade nesta ocasião, já que, aquando do aumento da concentração de proteína, a fluorescência detetada aumenta, e quando se diminui a concentração de proteína, a fluorescência detetada também diminui.

No estudo das amostras de extrato em interação com a proteína, mas nas que ocorre variação da concentração de extrato (3.2.2.1. a), amostras E1Ci a E6Ci; 3.2.2.1. b), amostras E1Li e E6Li), já se deteta uma proporcionalidade inversa, uma vez que ao aumentar a concentração, a fluorescência detetada diminui; enquanto se diminuir a concentração de extrato, a fluorescência observada aumenta. Isto indica que o extrato não apresenta proteína, já que se se aumentar a concentração de extrato nas amostras, a emissão de fluorescência detetada vai diminuindo.

Esta investigação poderá ser complementada com um estudo sobre a composição química dos cogumelos, bem como, estudos mais aprofundados sobre a interação de extrato de cogumelos com proteínas do leite, estudos fundamentais para uma melhor análise da composição dos extratos de cogumelos e da interferência das proteínas do leite aquando da ingestão deste fungo. Estes estudos permitiriam uma melhor avaliação acerca da ingestão em simultâneo destes tipos de alimentos, e das suas possíveis consequências adversas para os indivíduos em causa.

Em resumo, e com uma das principais constatações deste estudo, podemos referir que dá-nos bons indicadores para uma avaliação correta da interferência de proteínas do leite na ingestão de cogumelos em conjunto com alimentos com esse tipo de proteína.

## Capítulo 5

### Referências Bibliográficas

As referências bibliográficas foram listadas de acordo com o estilo IEEE (*Institute of Electrical and Electronics Engineers*).

Abrosimova, K. V., Shulenina, O.V., & Paston, S. V., “FTIR study of secondary structure of bovine serum albumin and ovalbumin”, *Atas: 18<sup>th</sup> International Conference Physica – Journal of Physics: Conference Series*, vol.769, 2016

Adams, J. D. W., & Frostick, L. E., “Investigating microbial activities in compost using mushroom (*Agaricus bisporus*) cultivation as an experimental system”, *Bioresource Technology*, vol.99, no.5, pp.1097–1102, 2008

Adochitei, A., & Drochioiu, G., “Rapid Characterization of Peptide Secondary Structure by FT-IR Spectroscopy”, *Revue Roumanie de Chimie*, vol.56, no.8, pp.783-791, 2011

Ahmed-Ouameur, A., Diamantoglou, S., Sedaghat-Herati, M.R., Nafisi, S., Carpentier, R., & Tajmir-Riahi, H.A., “The Effects of Drug Complexation on the Stability and Conformation of Human Serum Albumin: Protein Unfolding”, *Cell Biochemistry and Biophysics*, vol.45, no.2, pp.203-214, 2006

Alves, M. J., Ferreira, I. C. F. R., Froufe, H. J. C., Abreu, R. M. V., Martins, A., & Pintado, M., “Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies”, *Journal of Applied Microbiology*, vol.115, no.2, pp.346–357, 2013

Amin, R., Islam, M. Z., Sen, M., Eva, S. N., Jesmin, S., & Nahar, S., “Anti-Obesity Effect of Mushroom (*Ganoderma Lucidum*) On Experimentally Induced Obese Rats”, *Anwer Khan Modern Medical College Journal*, vol.3, no.2, pp.11-14, 2012

Aniszewski, T., “Alkaloids – Secrets of Life: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role”, Amsterdam, The Netherlands: *Elsevier*, 1<sup>a</sup>Ed., 2007

Baptista-Ferreira, J., “Guia do Coletor de Cogumelos- para os cogumelos silvestres comestíveis com interesse comercial em Portugal”, Portugal: *Direcção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural*, 2013

- Barceloux, D.G., “Medical Toxicology of Natural Substances - Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Plants, and Venomous Animals”, Hoboken, New Jersey, USA: *John Wiley & Sons*, pp.265-280, 2008
- Barros, L., Ferreira, M.-J., Queirós, B., Ferreira, I. C. F. R., & Baptista, P., “Total phenols, ascorbic acid,  $\beta$ -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities”, *Food Chemistry*, vol.103, no.2, pp.413–419, 2007
- Barth, A., “Infrared spectroscopy of proteins”, *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, vol.1767, n.9, pp.1073-1101, 2007
- Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P., “Food Chemistry”, Heidelberg, Germany: *Springer*, 4<sup>a</sup> Ed., pp.8-89, 2009
- Borchers, A. T., Keen, C. L., & Gershwin, M. E., “Mushrooms, Tumors, and Immunity: An Update”, *Experimental Biology and Medicine*, vol.229, no.5, pp.393–406, 2004
- Borchers, A. T., Stern, J. S., Hackman, R. M., Keen, C. L., & Gershwin, M. E., “Mushrooms, Tumors, and Immunity”, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol.221, no.4, pp.281–293, 1999.
- Brasil, R.B., Nicolau, E.S., Cabral, J.F., & Silva, A.P., “Estrutura e Estabilidade das Micelas de Caseína em Leite Bovino”, *Ciência Animal*, vol.25, no.2, pp.71-80, 2015.
- Braslavsky, S.E., “Glossary of Terms Used in Photochemistry, 3<sup>rd</sup> Edition”, *Pure Appl. Chem.*, vol.79, no.3, pp. 293–465, 2007.
- Bunaciu, A.A., Fleschin, S., & Aboul-Enein, H.Y., “Evaluation of the Protein Secondary Structures Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy”, *Gazi University Journal of Science*, vol.27, no.1, pp.637-644, 2014
- Carbonaro, M., & Nucara, A., “Secondary structure of food proteins by Fourier transform spectroscopy in the mid-infrared region”, *Amino Acids – Springer*, no.38, pp.679-690, 2010
- Chandra, P., “Milk-derived Bioactive Peptides”, In: Johri, A. K. & Mishra, G. C., “Innovative Approach in Stem Cell Research, Cancer Biology and Applied Biotechnology”, New Delhi, India: *Krishi Sanskriti*, pp. 86-91, 2015
- Chang, S., “Overview of Mushroom Cultivation and Utilization as Functional Foods”, In: Cheung P.C.K., “Mushrooms as Functional Foods”, Hoboken, New Jersey, USA: *John Wiley & Sons*, pp. 1-34, 2008

Chang, S.T., & Buswell, J.A., “Mushroom nutraceuticals”, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, vol.12, no.5, pp.473–476, 1996

Chang, S., & Miles, P.G., “Mushroom biology – A new discipline”, *Mycologist*, vol.6, pp. 64-65, 1992

Chang, S. & Miles, P.G., “Mushrooms – Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact”, Boca Raton, Florida, USA: *Chemical Rubber Company Press*, 2 ed., pp. 27-36, 2004

Cheung, L. M., Cheung, P. C. K., & Ooi, V. E. C., “Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts”, *Food Chemistry*, vol.81, no.2, pp.249–255, 2003

Cheung, P.C.K., “The nutritional and health benefits of mushrooms”, *Nutrition Bulletin*, vol.35, no.4, pp.292-299, 2010.

Chiocchetti, G. M., Latorre, T., Clemente, M. J., Jadán-Piedra, C., Devesa, V., & Vélez, D., “Toxic trace elements in dried mushrooms: Effects of cooking and gastrointestinal digestion on food safety”, *Food Chemistry*, Vol.306, n.15, 2019

Cör, D., Knez, Z. & Hrnčič M. K., “Antitumour, Antimicrobial, Antioxidant and Antiacetylcholinesterase Effect of *Ganoderma Lucidum* Terpenoids and Polysaccharides: A Review”, *Molecules*, vol.23, n.649, pp.1-21, 2018

Corredig, M., Nair, P. K., Li, Y., Eshpari, H., & Zhao, Z., “Invited review: Understanding the behavior of caseins in milk concentrates”, *Journal of Dairy Science*, vol.102, n.6, pp.4772-4782, 2019

Dabbour, I, & Takruri, H. R., “Protein quality of four types of edible mushrooms found in Jordan”, *Plant Foods for Human Nutrition*, vol.57, pp.1-11, 2002

Diplock, A.T., Charuleux, J., Crozier-Willi, G., Kok, F.J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Stahl, W., & Viña-Ribes, J., “Functional food science and defence against reactive oxidadtive species”, *British Journal of Nutrition*, vol.80, suppl.1, pp. S77-S112, 1998

Elsayed, E. A., El Enshasy, H., Wadaan, M. A. M., & Aziz, R., “Mushrooms: A Potential Natural Source of Anti-Inflammatory Compounds for Medical Applications”, *Mediators of Inflammation*, pp.1-15, 2014

Enjalbert, F., Gallion, C., Jehl, F., Monteil, H., & Faulstich, H., “Simultaneous assay for amatoxins and phallotoxins in *Amanita phalloides* Fr. By high-performance liquid chromatography”, *Journal of Chromatography*, vol.598, no.2, pp.227-236, 1992

- Enjalbert, F., Rapior, S., Nouguier-Soulé, J., Guillon, S., Amouroux, N., & Cabot, C., “Treatment of Amatoxin Poisoning: 20-Year Retrospective Analysis”, *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, vol.40, no.6, pp.715–757, 2002
- Fitzgerald, R. J. & Murray, B.A., “Bioactive peptides and lactic fermentations”, *International Journal of Dairy Technology*, vol.59, no.2, pp.118-125, 2006
- Friedman, M., “Mushroom Polysaccharides: Chemistry and Antiobesity, Antidiabetes, Anticancer, and Antibiotic Properties in Cells, Rodents, and Humans”, *Foods*, vol.5, no.4, p.80, 2016
- Ganesan, K. & Xu, B., “Anti-Obesity Effects of Medicinal and Edible Mushrooms”, *Molecules*, vol.23, n.11, 2880, 2018
- Garcia, J., Costa, V. M., Carvalho, A., Baptista, P., Guedes de Pinho, P., Bastos, M. L., & Carvalho F., “Amanita phalloides poisoning: Mechanisms of toxicity and treatment”, *Food and Chemical Toxicology*, vol.86, pp.41–55, 2015a
- Garcia, J., Oliveira, A., de Pinho, P.G., Freitas, V., Carvalho, A., Baptista, P., Pereira, E., Bastos, M.L., & Carvalho, F., “Determination of amatoxins and phallotoxins in *Amanita phalloides* mushrooms from northeastern Portugal by HPLC-DAD-MS”, *Mycologia*, vol.107, no.4, pp.679-687, 2015b.
- Gil-Ramírez, A., Clavijo, C., Palanisamy, M., Soler-Rivas, C., Ruiz-Rodríguez, A., Marín, F. R., Reglero, G., Pérez, M., “Edible Mushrooms as Potential Sources of New Hypocholesterolemic Compounds”, *Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP7)*, pp.110-119, 2011.
- Gómez-Flores, L.J., Martínez-Ruiz, N. R., Enríquez-Anchondo, I. D., Fortunato Garza-Ocañas, F., Nájera-Medellín, J. A., & Miroslava Quiñónez-Martínez, M., “Análisis proximal y de composición mineral de cuatro especies de hongos ectomicorrízicos silvestres de la Sierra Tarahumara de Chihuahua”, *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, vol.22, pp.1-10, 2019
- Govorushko, S., Rezaee, R., Dumanov, J., & Tsatsakis, A., “Poisoning associated with the use of mushrooms: A review of the global pattern and main characteristics”, *Food and Chemical Toxicology*, vol.128, pp.267-279, 2019
- Guillamón, E., García-Lafuente, A., Lozano, M., D’ Arrigo, M., Rostagno, M. A., Villares, A., & Martínez, J. A., “Edible mushrooms: Role in the prevention of cardiovascular diseases”, *Fitoterapia*, vol.81, no.7, pp.715-723, 2010

Hawksworth, D.L., “The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited”, *Mycological Research*, vol.105, no.12, pp.1422-1432, 2001

Hambraeus L. & Lönnerdal B., “Nutritional Aspects of Milk Proteins”, In: Fox, P.F., & McSweeney, P. L. H., “Advanced Dairy Chemistry— Volume 1: Proteins”, Berlin, Germany: *Springer Science & Business Media*, 3<sup>rd</sup>ed.-part A , pp 605-645, 2003

Kaewnarin, K., Suwannarach, N., Kumla, J., & Lumyong, S., “Phenolic profile of various wild edible mushroom extracts from Thailand and their antioxidant properties, anti-tyrosinase and hyperglycaemic inhibitory activities”, *Journal of Functional Foods*, vol.27, pp.352-364, 2016

Kalac, P. & Svoboda, L., “A review of trace element concentrations in edible mushrooms”, *Food Chemistry*, vol.69, no.3, pp.273-281, 2000

Kaur, A., Dhingra, G.S., & Shri, R., “Antidiabetic Potential of Mushrooms”, *Asian Journal of Pharmaceutical Research*, vol.5, no.2, pp.111-125, 2015

Kim, Y.-W., Kim, K.-H., Choi, H.-J., & Lee, D.-S., “Anti-diabetic activity of  $\beta$ -glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*”, *Biotechnology Letters*, vol.27, no.7, pp.483-487, 2005

Lakowicz, J.R., “Principles of Fluorescence Spectroscopy”, *Springer*, 3<sup>rd</sup>ed., 2006.

Li, J., Li, J., Jiao, Y., & Dong, C., “Spectroscopic analysis and molecular modeling on the interaction of jatrorrhizine with human serum albumin (HSA)”, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol.118, pp.48-54, 2014.

Lindequist, U., Niedermeyer, T. H. J., & Jülich, W.-D., “The Pharmacological Potential of Mushrooms”, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol.2, no.3, pp.285-299, 2005

Liu, G., Song D., Zhao, D., Liu, J., Zhou, Y., Ou, J., & Sun, S., “A study of the mushrooms of boletes by Fourier transform infrared spectroscopy”, In: Bally, G., & Luo, Q., “ICO20: Biomedical Optics”, Bellingham, Washington, USA: *The international society for optics and photonics*, no. 60260H, 2006

Manzi, P., Aguzzi, A., & Pizzoferrato, L., “Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy”, *Food Chemistry*, vol.73, no.3, pp.321-325, 2001

- Meenu, M., & Xu, B., “Application of vibrational spectroscopy for classification, authentication and quality analysis of mushroom: A concise review”, *Food Chemistry*, vol.289, pp. 545–557, 2019
- Moradali, M.-F., Mostafavi, H., Ghods, S., & Hedjaroude, G.-A., “Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi)”, *International Immunopharmacology*, vol.7, no.6, pp.701–724, 2007
- Moreno-Rojas, R., Dáz-Valverde, M.A., Arroyo, B.M., González, T.J., & Capote, C.J.B., “Mineral content of gurgumelo (*Amanita ponderosa*)”. *Food Chemistry*, vol.85, no.3, pp.325-330, 2004
- Mizuno, T., “Bioactive Biomolecules of Mushrooms: Food Function and Medicinal Effect of Mushroom Fungi”, *Food Reviews International*, vol.11, no.1, pp. 5-21, 1995
- Nafisi, S., Panahyab, A., Sadeghi, G. B., “Interactions between  $\beta$ -carboline alkaloids and bovine serum albumin: Investigation by spectroscopic approach”, *Journal of Luminescence*, vol.132, no.9, pp.2361–2366, 2012
- O’Gorman, A., Downey, G., Gowen, A.A., Barry-Ryan, C., & Frias, J.M., “Use of Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Chemometric Data Analysis to Evaluate Damage and Age in Mushrooms (*Agaricus bisporus*) Grown in Ireland”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol.58, no.13, pp.7770-7776, 2010
- Palanisamy, M., Gil-Ramírez, A., Ruiz-Rodríguez, A., Marín, F. R., Reglero, G., & Soler-Rivas, C., “Testing edible mushrooms to inhibit the pancreatic lipase activity by an in vitro digestion model”, *International Journal of Food Science & Technology*, vol.47, no.5, pp.1004–1010, 2012
- Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., & Vyvyan, J. R., “Introdução à Espectroscopia”, Belmont, California, USA: *Cengage Learning*, 2010
- Pelton, J. T. & McLean, L. R., “Spectroscopic Methods for Analysis of Protein Secondary Structure”, *Analytical Biochemistry*, no.277, pp.167-176, 2000
- Pereira, P.C., “Milk nutritional composition and its role in human health”, *Nutrition*, vol.30, no.6, pp. 619-627, 2014
- Phelan, M., Aherne, A., FitzGerald, R. J., O’Brien, N. M., “Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status”, *International Dairy Journal*, vol. 19, no.11, pp. 643–54, 2009

Puttaraju, N. G., Venkateshaiah, S. U., Dharmesh, S. M., Urs, S. M. N., & Somasundaram, R., “Antioxidant Activity of Indigenous Edible Mushrooms” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol.54, no.26, pp. 9764–9772, 2006

Ribeiro, B., Lopes, R., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Gonçalves, R. F., Baptista, P., Valentão, P., “Comparative study of phytochemicals and antioxidant potential of wild edible mushroom caps and stipes”, *Food Chemistry*, vol.110, no.1, pp.47–56, 2008a

Ribeiro, B., Andrade, P.B., Silva, B.M., Baptista, P., Seabra, R.M., & Valentão, P., “Comparative Study on Free Amino Acid Composition of Wild Edible Mushroom Species”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol.56, no. 22, pp.10973-10979, 2008b

Ruysschaert, J., & Raussens, V., “ATR-FTIR Analysis of Amyloid Proteins”, In: Nilsson B., & Doran T., “Peptide Self-Assembly. Methods and Protocols” New York, USA: *Humana Press*, vol.1777, pp.69-81, 2018

Salvador, C., Martins, M.R., & Caldeira, A.T., “Microanalysis Characterization of Bioactive Protein-Bound Polysaccharides Produced by *Amanita ponderosa* Cultures”, *Microscopy and Microanalysis*, vol.21, no.1, pp.84-90, 2015

Salvador, C., Martins, M.R., Arteiro, J.M., & Caldeira, A.T., “Molecular evaluation of some *Amanita ponderosa* and the fungal strains living in association with these mushrooms in the southwestern Iberian Peninsula”, *Annals of Microbiology*, vol.64, pp.1179-1187, 2013

Salvador, C., Martins, M.R., Vicente, H., & Caldeira, A.T, “A Data Mining Approach to Improve Inorganic Characterization of *Amanita ponderosa* Mushrooms”, *International Journal of Analytical Chemistry*, vol.2018, pp.1-18, 2018

Salvador, C., Martins, M.R., Vicente, H., Neves, J., Arteiro, J.M., & Caldeira, A.T., “Modelling molecular and inorganic data of *Amanita ponderosa* mushrooms using artificial neural networks”, *Agroforestry Systems*, vol.87, no.2, pp.295-302, 2012

Santos, D.I.V., & Gil, E.S., “Fluorimetria na Análise Farmacêutica: Uma Revisão”, *Revista Eletrônica de Farmácia- REF*, Vol 7, no. 1, pp. 12-26, 2010.

Sarode, A.R.; Sawale, P.D., Khedkar, C.D., Kalyankar, S.D., & Pawshe, R.D., “Casein and Caseinate: Methods of Manufacture”, *The Encyclopedia of Food and Health*, vol.1, pp.676-682, 2016

Sgambelluri, R.M., Epis, S., Sassera, D., Luo, H., Angelos, E.R., & Walton, J.D., “Profiling of Amatoxins and Phallotoxins in the Genus *Lepiota* by Liquid Chromatography Combined with UV Absorbance and Mass Spectrometry”, *Toxins*, vol.6, no.8, pp.2336-2347, 2014

Shi, Y., Yan, C., Li, D., & Liu, G., “Discrimination of *Amanita* mushrooms using Fourier transform infrared difference spectroscopy and cluster analysis”, Atas: *2011 Symposium on Photonics and Optoelectronics (SOPO)*, 2011

Shittu, O.B., Alofe, F.V., Onawunmi, G.O., Ogundaini, A.O., e Tiwalade, T.A., “Mycelial Growth and Antibacterial Metabolite Production by Wild Mushrooms”, *African Journal of Biomedical Research*, vol.8, pp.157-162, 2005

Silva, N. N., Casanova, F., Pinto, M. S., Carvalho, A. F., & Gaucheron, F., “Casein micelles: from the monomers to the supramolecular structure”, *Brazilian Journal of Food Technology*, vol.22, pp.1-15, 2019

Sindayikengera, S., & Xia, W., “Nutritional evaluation of caseins and whey proteins and their hydrolysates from Protamex”, *Journal of Zhejiang University Science B*, vol.7, no.2, pp.90-98, 2006

Singh, H., Tamehana, M., Hemar, Y., & Munro, P.A., “Interfacial compositions, microstructures and properties of oil-in-water emulsions formed with mixtures of milk proteins and k-carrageenan: 1. Sodium caseinate”, *Food Hydrocolloids*, vol.17, no.4, pp. 539-548, 2003

Siročić, A. P., Krehula, L. K., Katančić, Z., e Hrnjak-Murčić, Z., “Characterization of Casein Fractions – Comparison of Commercial Casein and Casein Extracted from Cow’s Milk”, *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, vol.30, no.4, pp.501–509, 2016

Suay, I., Arenal, F., Asensio, F.J., Basilio, A., Cabello, M.A., Díez, M.T., et al., “Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities”, *Antonie van Leeuwen-hoek*, vol.78, pp.129–139, 2000

Stamets, P., “Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms”, Berkely, California, USA: *Ten Speed Press*, p.64, 1993

Taofiq, O., Calhella, R. C., Heleno, S., Barros, L., Martins, A., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C. F. R., “The contribution of phenolic acids to the anti-inflammatory activity of mushrooms: Screening in phenolic extracts, individual parent molecules and synthesized glucuronated and methylated derivatives”, *Food Research International*, vol.76, part 3, pp.821–827, 2015

Taofiq, O., Martins, A., Barreiro, M. F., & Ferreira, I. C. F. R., “Anti-inflammatory potential of mushroom extracts and isolated metabolites”, *Trends in Food Science & Technology*, vol.50, pp.193–210, 2016

Tatulian, S.A., “FTIR Analysis of Proteins and Protein–Membrane Interactions”, *Methods in molecular biology*, vol.2003, pp.281-325, 2019

Tavassoli, M., Afshari, A., Arsene, A. L., Megarbone, B., Dumanov, J., Paoliello, M. M. B., Tsatsakis, A., Carvalho, F., Hashemzaei, M., Karimi G., & Renzaee, R., “Toxicological profile of *Amanita virosa* – A narrative review”, *Toxicology Reports*, vol.6, pp.143-150, 2019

Valeur, B., & Berberan-Santos, M. N. “A Brief History of Fluorescence and Phosphorescence before the Emergence of Quantum Theory”, *Journal of Chemical Education*, vol.88, no. 6, pp. 731–738, 2011.

Vetter, J., “Mineral composition of basidiomes of *Amanita* species”, *Mycological Research*, vol.109, part 6, pp.746-750, 2005

Wang, Y., Li, J., Liu, H., & Wang, Y., “Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR) Combined with Chemometrics Methods for the Classification of Lingzhi Species”, *Molecules*, vol.24, n.12, pp. 1-13, 2019

Warner, I.M., Callis, J.B., Davidson, E.R., Gouterman, M., & Christian, G.D., “Fluorescence Analysis: A New Approach”, *Analytical Letters*, vol.8, no.9, pp.665-681, 1975.

Yang, H., Yang, S., Kong, J., Dong, A., & Yu, S., “Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy”, *Nature Protocols*, vol.10, no.3, pp.382-396, 2015

Zeisel, S.H., “Health: Regulation of “Nutraceuticals”, *Science*, vol.285, no.5435, pp. 1853-1855, 1999

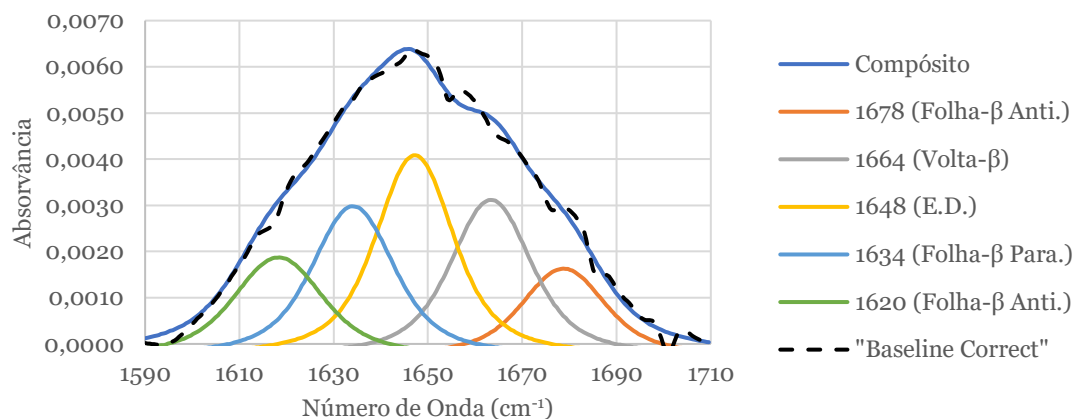
Zhang, Y., Xia, L., Pang, W., Wang, T., Chen, P., Zhu, B., & Zhang, J., “A novel soluble  $\beta$ -1,3-d-glucan Salecan reduces adiposity and improves glucose tolerance in high-fat diet-fed mice”, *British Journal of Nutrition*, vol.109, no.02, pp.254–262, 2012a

Zhang, G., Wang, L., & Pan, J., “Probing the Binding of the Flavonoid Diosmetin to Human Serum Albumin by Multispectroscopic Techniques”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol.60, no.10, pp.2721-2729, 2012b.

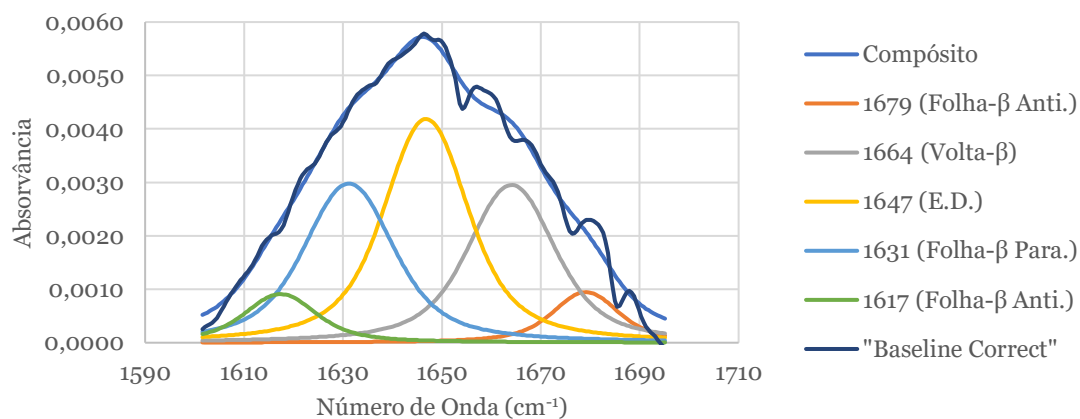
Zhao, D., Liu, G., Song, D., Liu, J., Zhou, Y., Ou, J., & Sun, S., “Identification of *Amanita* mushrooms by Fourier transform infrared spectroscopy”, *Atas: Fourth International Conference on Photonics and imaging in Biology and Medicine*, 2006.

## Apêndices

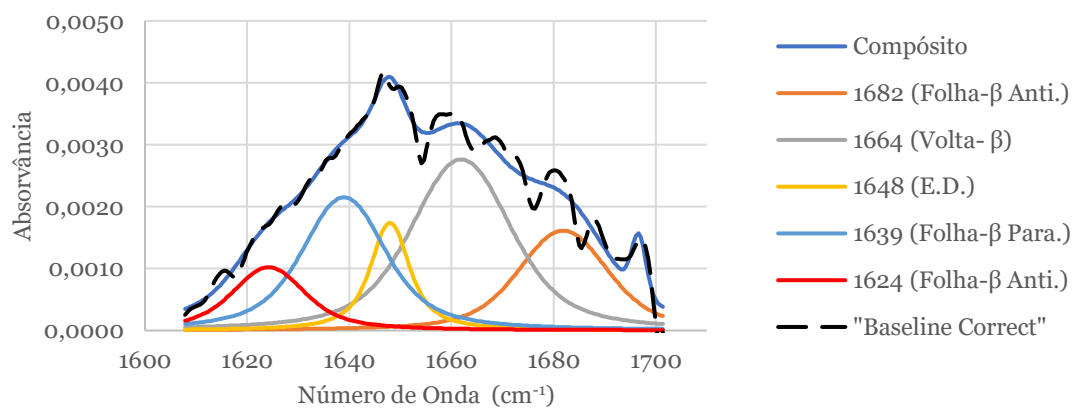
### Apêndice A: Figuras de *Deconvolução de Fourier*



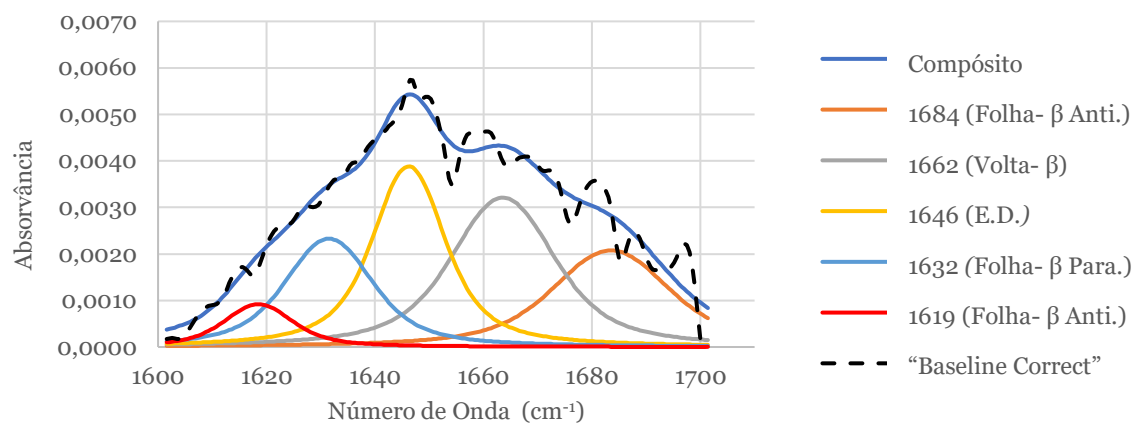
**Figura A1** - *Deconvolução de Fourier* da banda da amida I na amostra caseinato de sódio (figura 12).



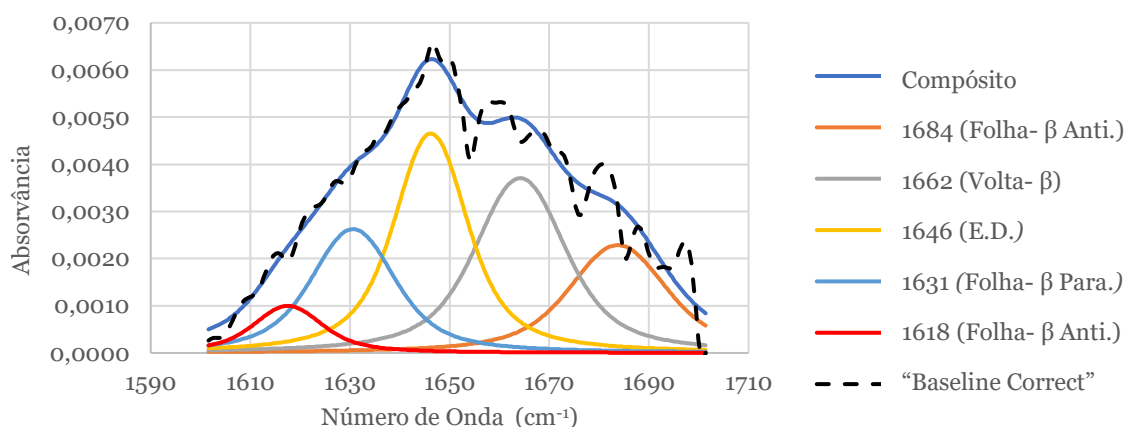
**Figura A2** - *Deconvolução de Fourier* da banda da amida I na amostra de leite reconstituído (figura 13).



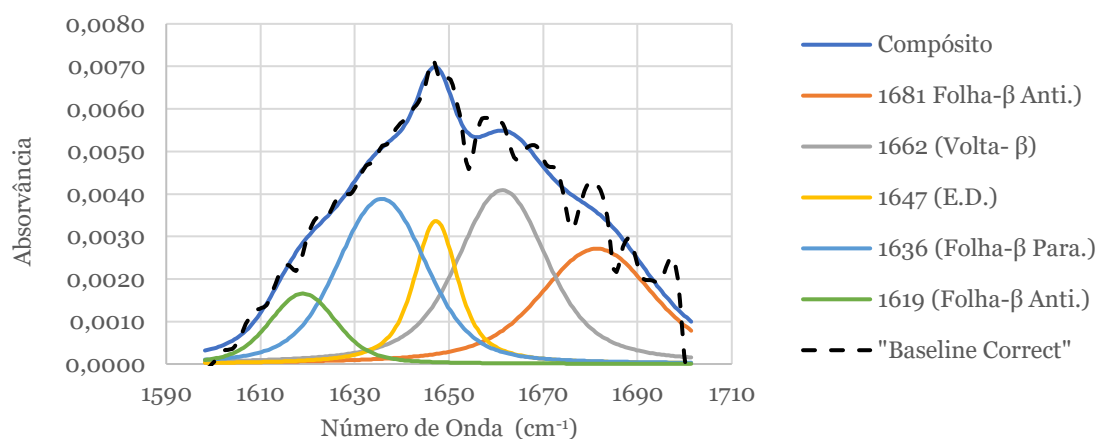
**Figura A3** - *Deconvolução de Fourier* da banda da amida I na amostra EiCi (figuras 15 e 16).



**Figura A4** - Deconvulção de Fourier da banda da amida I na amostra EiC1 (figura 15)

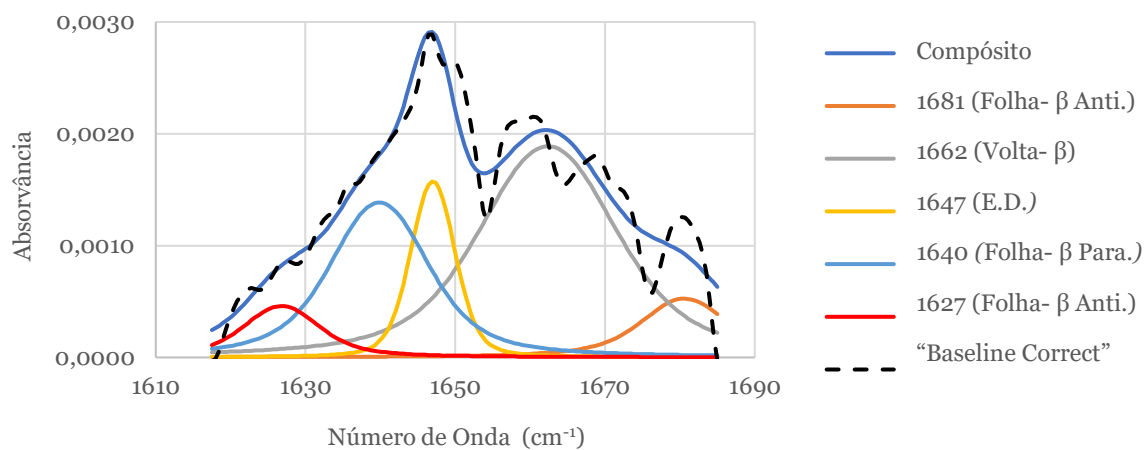


**Figura A5** - Deconvulção de Fourier da banda da amida I na amostra EiC2 (figura 15).

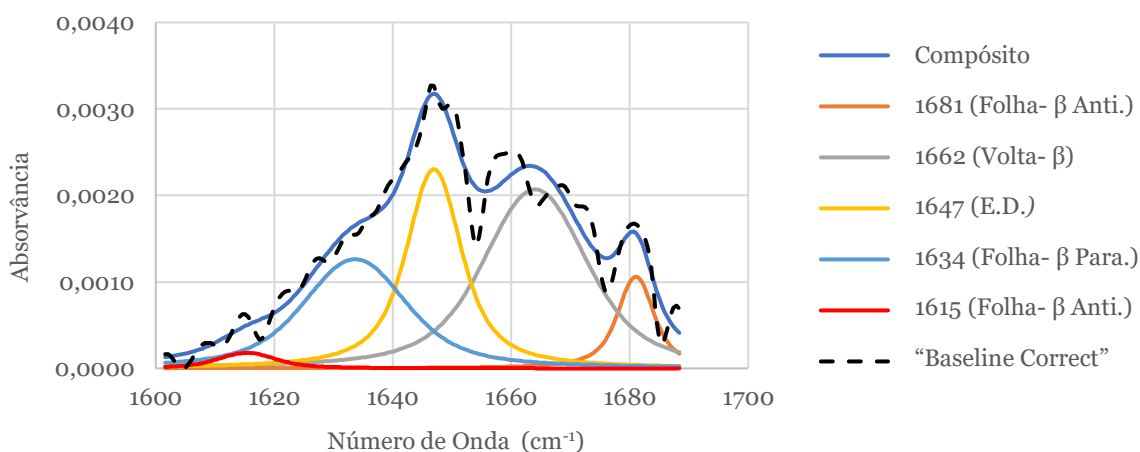


**Figura A6** - Deconvulção de Fourier da banda da amida I na amostra EiC3 (figura 15).

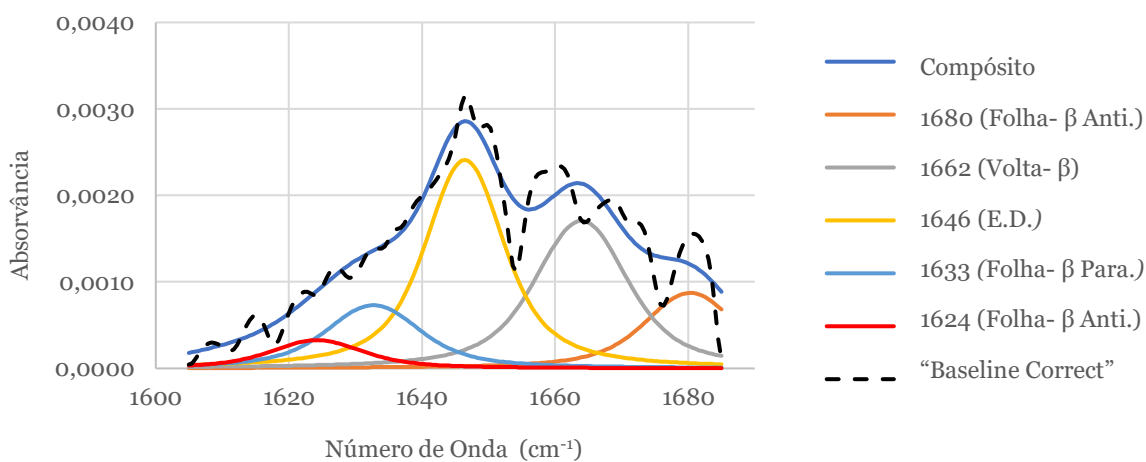
Interação entre proteínas lácteas e extrato de cogumelo *Amanita ponderosa*



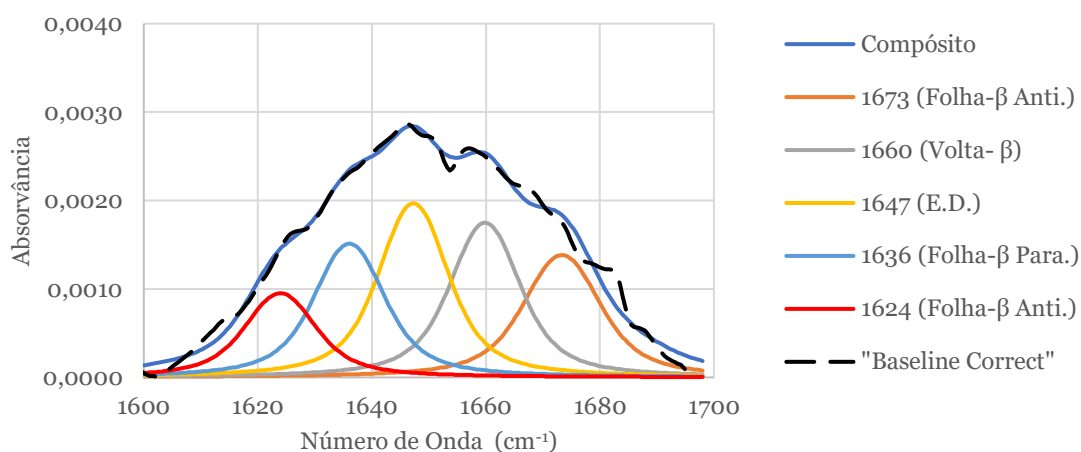
**Figura A7** - Deconvulção de Fourier da banda da amida I na amostra EiC4 (figura 16).



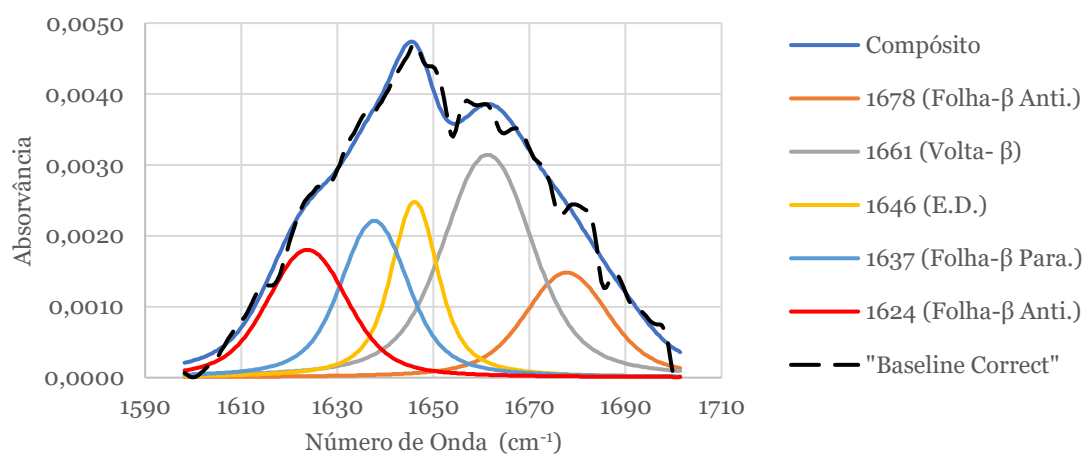
**Figura A8** - Deconvulção de Fourier da banda da amida I na amostra EiC5 (figura 16).



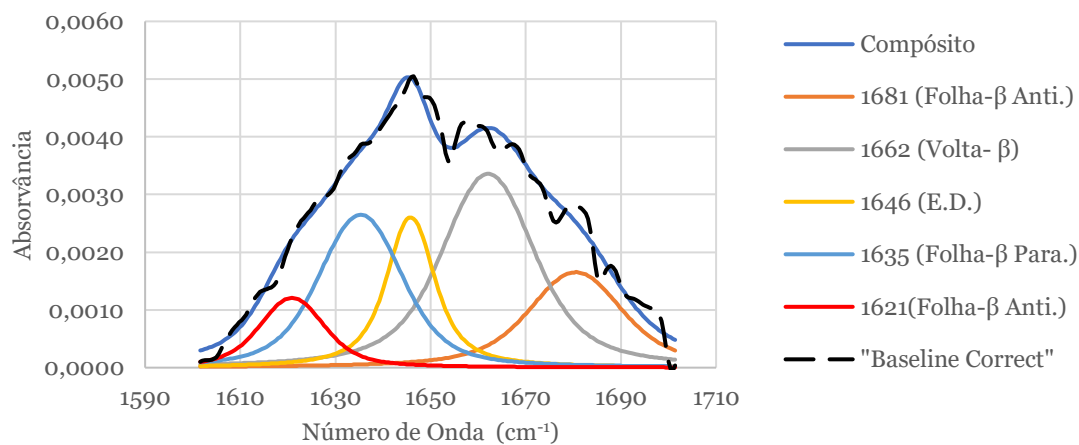
**Figura A9** - Deconvulção de Fourier da banda da amida I na amostra EiC6 (figura 16).



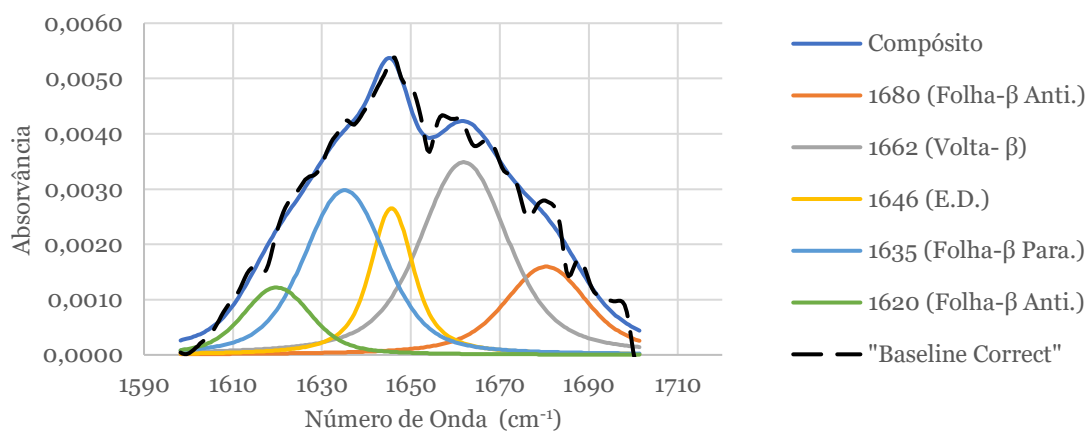
**Figura A10** - Deconvulção de Fourier da banda da amida I na amostra EiLi (figuras 17 e 18)



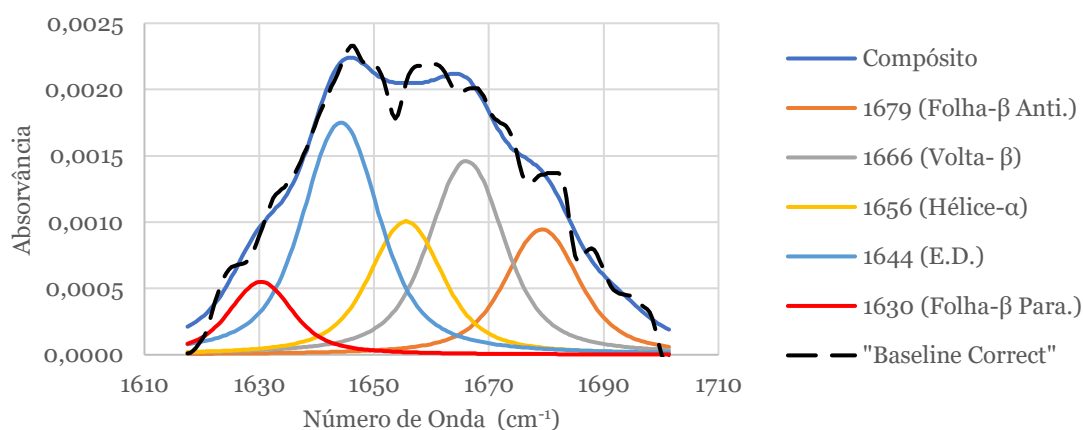
**Figura A11** - Deconvulção de Fourier da banda da amida I na amostra EiL1 (figura 17).



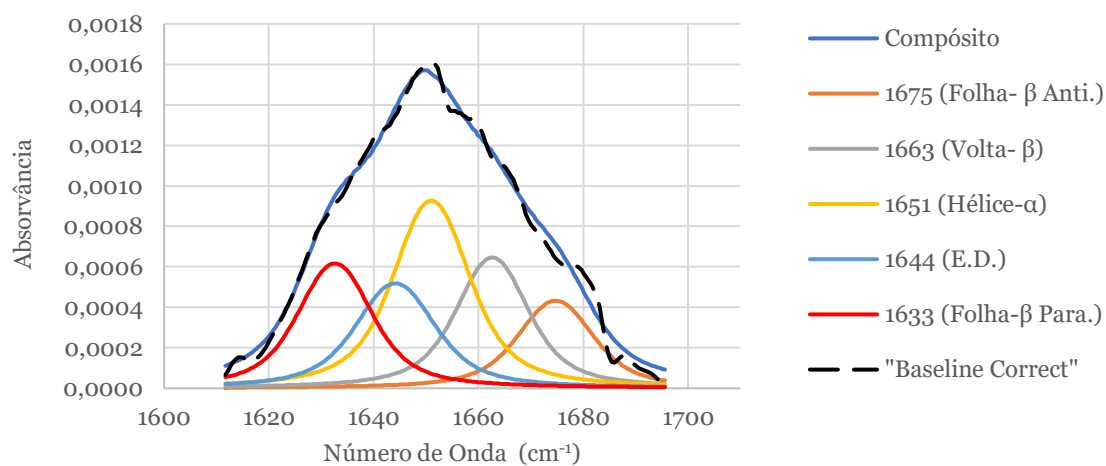
**Figura A12** - Deconvulção de Fourier da banda da amida I na amostra EiL2 (figura 17).



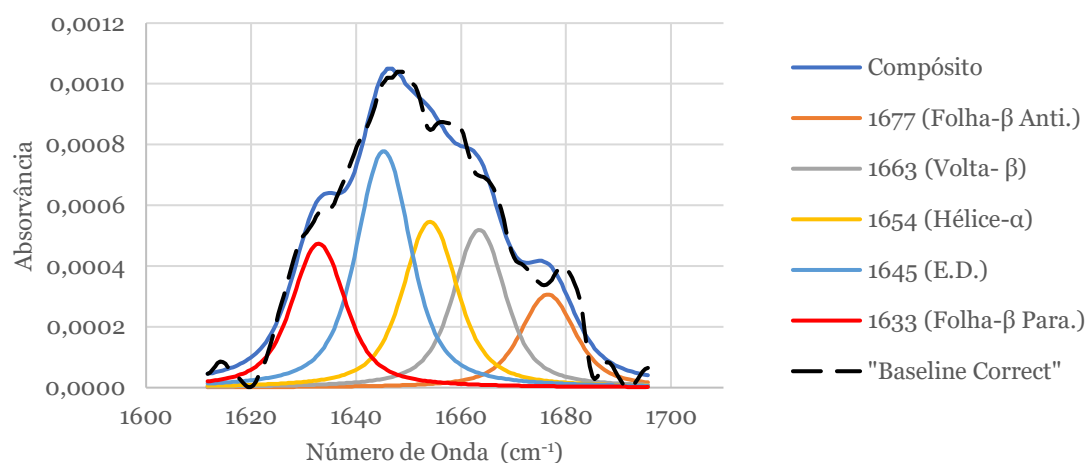
**Figura A13** - Deconvolução de Fourier da banda da amida I na amostra EiL3 (figura 17).



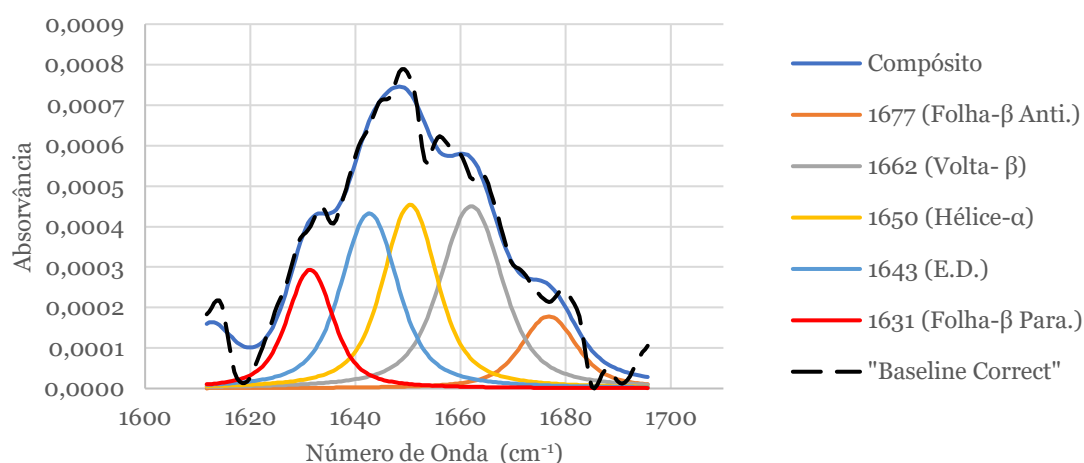
**Figura A14** - Deconvolução de Fourier da banda da amida I na amostra EiL4 (figura 18).



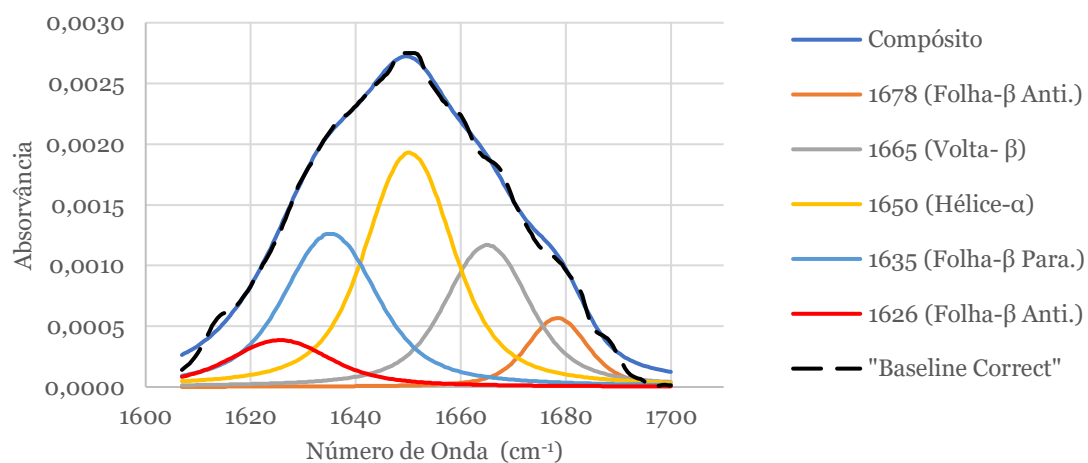
**Figura A15** - Deconvolução de Fourier da banda da amida I na amostra E1Ci (figura 19).



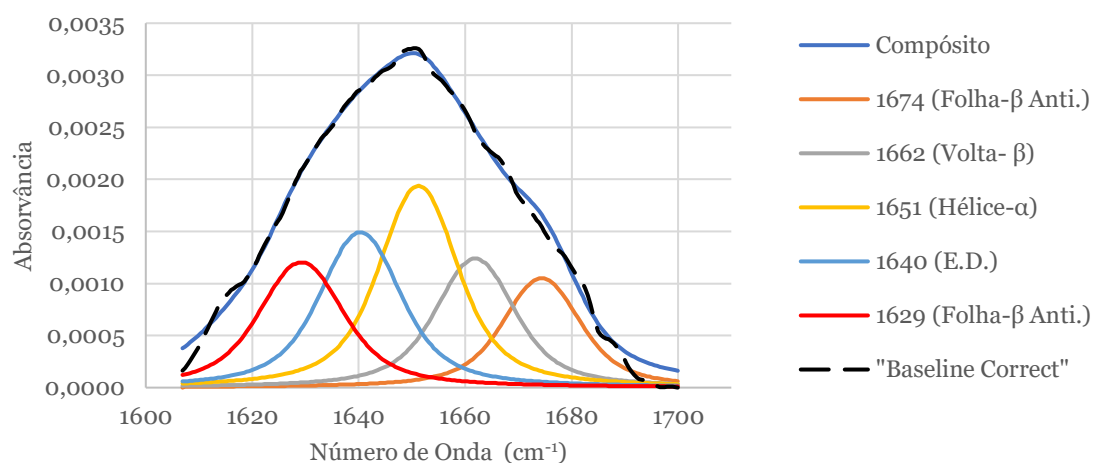
**Figura A16** - Deconvulção de Fourier da banda da amida I na amostra E2Ci (figura 19).



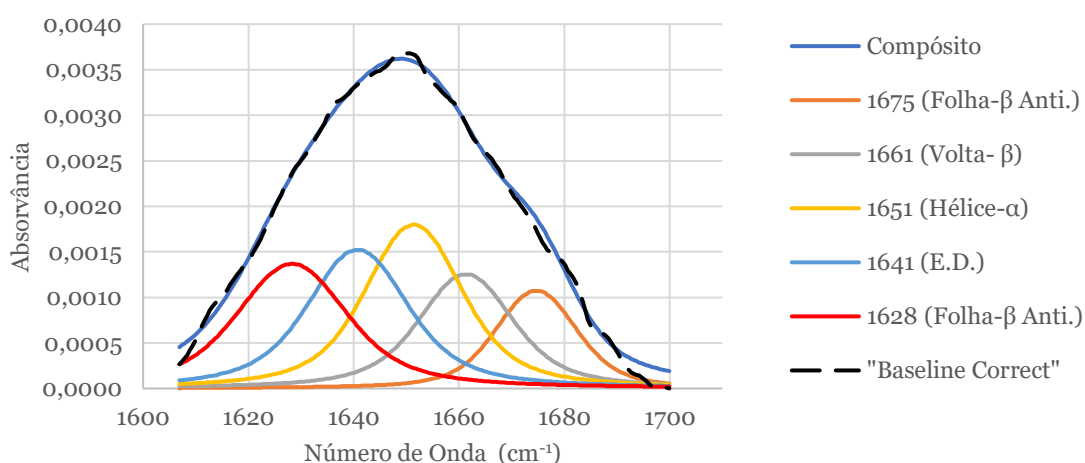
**Figura A17** - Deconvulção de Fourier da banda da amida I na amostra E3Ci (figura 19).



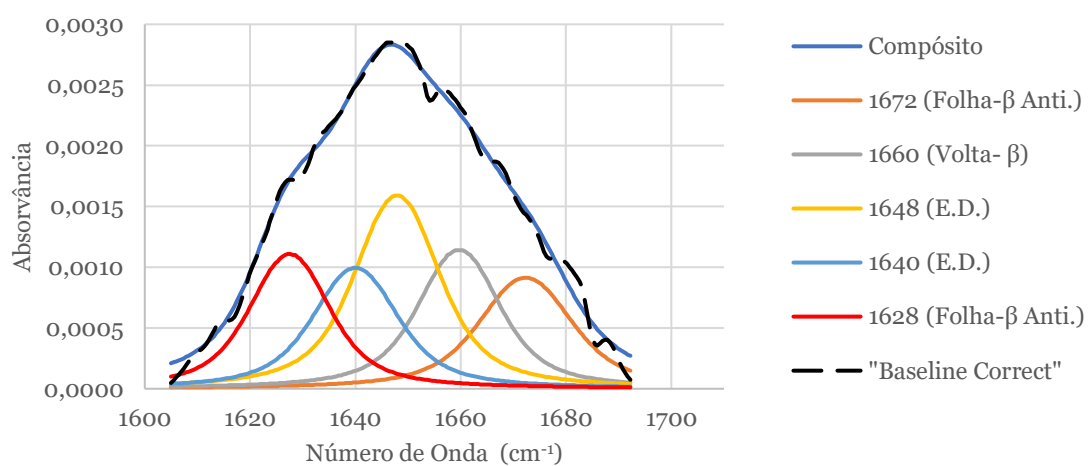
**Figura A18** - Deconvulção de Fourier da banda da amida I na amostra E4Ci (figura 20).



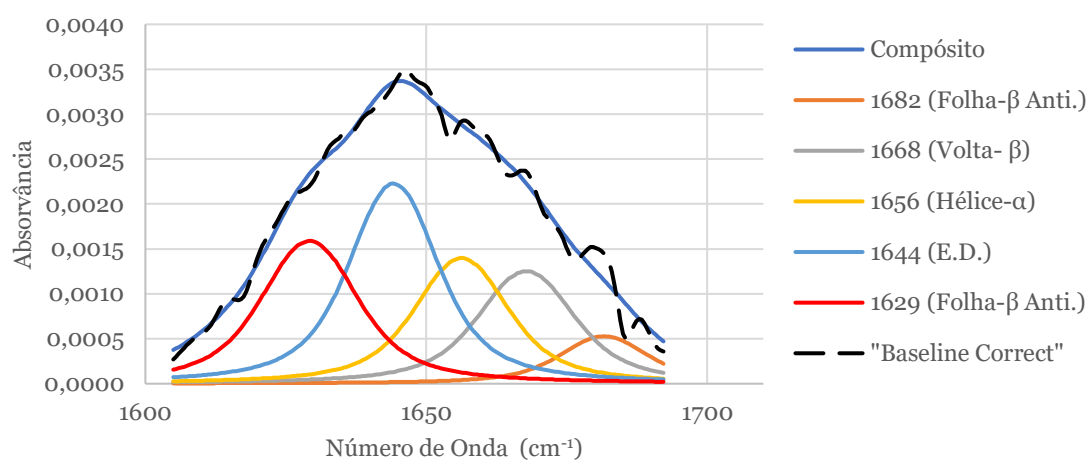
**Figura A19** - Deconvulção de Fourier da banda da amida I na amostra E5Ci (figura 20).



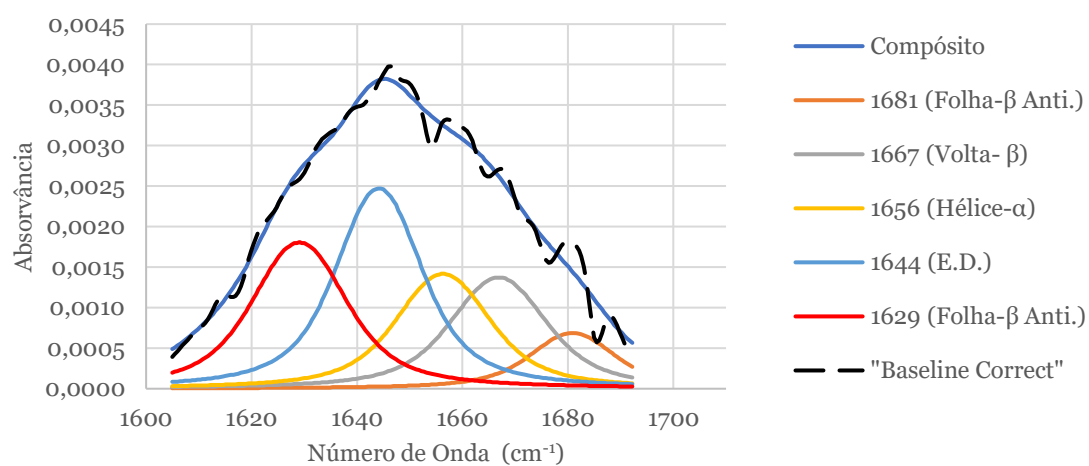
**Figura A20**- Deconvulção de Fourier da banda da amida I na amostra E6Ci (figura 20).



**Figura A21**- Deconvulção de Fourier da banda da amida I na amostra E4Li (figura 22).



**Figura A22**- Deconvolução de Fourier da banda da amida I na amostra E5Li (figura 22).



**Figura A23** - Deconvolução de Fourier da banda da amida I na amostra E6Li (figura 22).

## Apêndice B: Tabelas *Deconvolução de Fourier*

**Tabela B1**- Dados obtidos da *Deconvolução de Fourier* da amostra de EiCi.

	Banda Amida I				
<i>Sinais (cm<sup>-1</sup>)</i>	1682	1664	1648	1639	1624
<i>Estrutura Secundária</i>	Folha- $\beta$ Antiparalela	Volta- $\beta$	E.D.	Folha- $\beta$ Paralela	Folha- $\beta$ Antiparalela
<i>Estrutura Secundária (%)</i>	18,35	37,24	10,12	24,66	9,63

**Tabela B2** - Dados obtidos da *Deconvolução de Fourier* da amostra de EiC1.

	Banda Amida I				
<i>Sinais (cm<sup>-1</sup>)</i>	1684	1662	1646	1632	1619
<i>Estrutura Secundária</i>	Folha- $\beta$ Antiparalela	Volta- $\beta$	E.D.	Folha- $\beta$ Paralela	Folha- $\beta$ Antiparalela
<i>Estrutura Secundária (%)</i>	19,63	29,95	26,87	23,55	5,35

**Tabela B3** - Dados obtidos da *Deconvolução de Fourier* da amostra de EiC2.

	Banda Amida I				
<i>Sinais (cm<sup>-1</sup>)</i>	1684	1662	1646	1631	1618
<i>Estrutura Secundária</i>	Folha- $\beta$ Antiparalela	Volta- $\beta$	E.D.	Folha- $\beta$ Paralela	Folha- $\beta$ Antiparalela
<i>Estrutura Secundária (%)</i>	17,28	28,71	30,09	18,45	5,47

**Tabela B4** - Dados obtidos da *Deconvolução de Fourier* da amostra de EiC3.

	Banda Amida I				
<i>Sinais (cm<sup>-1</sup>)</i>	1681	1662	1647	1636	1619
<i>Estrutura Secundária</i>	Folha- $\beta$ Antiparalela	Volta- $\beta$	E.D.	Folha- $\beta$ Paralela	Folha- $\beta$ Antiparalela
<i>Estrutura Secundária (%)</i>	22,41	29,77	12,96	26,58	8,28

**Tabela B5-** Dados obtidos da *Deconvolução de Fourier* da amostra de EiC4.

	<b>Banda Amida I</b>				
<i>Sinais (cm<sup>-1</sup>)</i>	1681	1662	1647	1640	1627
<i>Estrutura Secundária</i>	Folha- $\beta$ Antiparalela	Volta- $\beta$	E.D.	Folha- $\beta$ Paralela	Folha- $\beta$ Antiparalela
<i>Estrutura Secundária (%)</i>	6,48	48,60	12,60	26,22	6,10

**Tabela B6 -** Dados obtidos da *Deconvolução de Fourier* da amostra de EC5.

	<b>Banda Amida I</b>				
<i>Sinais (cm<sup>-1</sup>)</i>	1681	1662	1647	1634	1615
<i>Estrutura Secundária</i>	Folha- $\beta$ Antiparalela	Volta- $\beta$	E.D.	Folha- $\beta$ Paralela	Folha- $\beta$ Antiparalela
<i>Estrutura Secundária (%)</i>	7,28	39,71	26,35	24,83	1,83

**Tabela B7-** Dados obtidos da *Deconvolução de Fourier* da amostra de EC6.

	<b>Banda Amida I</b>				
<i>Sinais (cm<sup>-1</sup>)</i>	1680	1662	1646	1633	1624
<i>Estrutura Secundária</i>	Folha- $\beta$ Antiparalela	Volta- $\beta$	E.D.	Folha- $\beta$ Paralela	Folha- $\beta$ Antiparalela
<i>Estrutura Secundária (%)</i>	11,31	30,41	39,61	13,20	5,47

**Tabela B8-** Dados obtidos da *Deconvolução de Fourier* da amostra de EiLi.

	<b>Banda Amida I</b>				
<i>Sinais (cm<sup>-1</sup>)</i>	1673	1660	1647	1636	1624
<i>Estrutura Secundária</i>	Folha- $\beta$ Antiparalela	Volta- $\beta$	E.D.	Folha- $\beta$ Paralela	Folha- $\beta$ Antiparalela
<i>Estrutura Secundária (%)</i>	19,14	22,80	25,79	20,01	12,26

**Tabela B9-** Dados obtidos da *Deconvolução de Fourier* da amostra de EiL1.

	<b>Banda Amida I</b>				
<i>Sinais (cm<sup>-1</sup>)</i>	1678	1661	1646	1637	1624
<i>Estrutura Secundária</i>	Folha- $\beta$ Antiparalela	Volta- $\beta$	E.D.	Folha- $\beta$ Paralela	Folha- $\beta$ Antiparalela
<i>Estrutura Secundária (%)</i>	14,52	34,34	15,43	18,75	16,96

**Tabela B10-** Dados obtidos da *Deconvolução de Fourier* da amostra de EiL2.

	<b>Banda Amida I</b>				
<i>Sinais (cm<sup>-1</sup>)</i>	1681	1662	1646	1635	1621
<i>Estrutura Secundária</i>	Folha- $\beta$ Antiparalela	Volta- $\beta$	E.D.	Folha- $\beta$ Paralela	Folha- $\beta$ Antiparalela
<i>Estrutura Secundária (%)</i>	16,59	35,34	15,49	24,22	8,35

**Tabela B11-** Dados obtidos da *Deconvolução de Fourier* da amostra de EiL3.

	<b>Banda Amida I</b>				
<i>Sinais (cm<sup>-1</sup>)</i>	1680	1662	1646	1635	1620
<i>Estrutura Secundária</i>	Folha- $\beta$ Antiparalela	Volta- $\beta$	E.D.	Folha- $\beta$ Paralela	Folha- $\beta$ Antiparalela
<i>Estrutura Secundária (%)</i>	14,54	35,54	14,25	26,83	8,84

**Tabela B12-** Dados obtidos da *Deconvolução de Fourier* da amostra de EiL4.

	<b>Banda Amida I</b>				
<i>Sinais (cm<sup>-1</sup>)</i>	1679	1666	1656	1644	1630
<i>Estrutura Secundária</i>	Folha- $\beta$ Antiparalela	Volta- $\beta$	Hélice- $\alpha$	E.D.	Folha- $\beta$ Paralela
<i>Estrutura Secundária (%)</i>	16,20	26,74	17,61	31,97	7,48

**Tabela B13-** Dados obtidos da *Deconvolução de Fourier* da amostra de E1Ci.

	<b>Banda Amida I</b>				
<i>Sinais (cm<sup>-1</sup>)</i>	1675	1663	1651	1644	1633
<i>Estrutura Secundária</i>	Folha- $\beta$ Antiparalela	Volta- $\beta$	Hélice- $\alpha$	E.D.	Folha- $\beta$ Paralela
<i>Estrutura Secundária (%)</i>	13,22	19,76	30,72	17,15	19,16

**Tabela B14 -** Dados obtidos da *Deconvolução de Fourier* da amostra de E2Ci.

	<b>Banda Amida I</b>				
<i>Sinais (cm<sup>-1</sup>)</i>	1677	1663	1654	1645	1633
<i>Estrutura Secundária</i>	Folha- $\beta$ Antiparalela	Volta- $\beta$	Hélice- $\alpha$	E.D.	Folha- $\beta$ Paralela
<i>Estrutura Secundária (%)</i>	11,47	19,02	20,86	30,76	17,90

**Tabela B15 -** Dados obtidos da *Deconvolução de Fourier* da amostra de E3Ci.

	<b>Banda Amida I</b>				
<i>Sinais (cm<sup>-1</sup>)</i>	1677	1662	1650	1643	1631
<i>Estrutura Secundária</i>	Folha- $\beta$ Antiparalela	Volta- $\beta$	Hélice- $\alpha$	E.D.	Folha- $\beta$ Paralela
<i>Estrutura Secundária (%)</i>	9,72	27,73	24,93	24,42	13,20

**Tabela B16 -** Dados obtidos da *Deconvolução de Fourier* da amostra de E4Ci.

	<b>Banda Amida I</b>				
<i>Sinais (cm<sup>-1</sup>)</i>	1678	1665	1650	1635	1626
<i>Estrutura Secundária</i>	Folha- $\beta$ Antiparalela	Volta- $\beta$	Hélice- $\alpha$	Folha- $\beta$ Paralela	Folha- $\beta$ Antiparalela
<i>Estrutura Secundária (%)</i>	7,13	21,65	37,91	25,54	7,76

**Tabela B17** - Dados obtidos da *Deconvolução de Fourier* da amostra de E5Ci.

	<b>Banda Amida I</b>				
<i>Sinais (cm<sup>-1</sup>)</i>	1674	1662	1651	1640	1629
<i>Estrutura Secundária</i>	Folha- $\beta$ Antiparalela	Volta- $\beta$	Hélice- $\alpha$	E.D.	Folha- $\beta$ Antiparalela
<i>Estrutura Secundária (%)</i>	14,34	17,69	28,28	22,07	17,63

**Tabela B18** - Dados obtidos da *Deconvolução de Fourier* da amostra de E6Ci.

	<b>Banda Amida I</b>				
<i>Sinais (cm<sup>-1</sup>)</i>	1675	1661	1651	1641	1628
<i>Estrutura Secundária</i>	Folha- $\beta$ Antiparalela	Volta- $\beta$	Hélice- $\alpha$	E.D.	Folha- $\beta$ Antiparalela
<i>Estrutura Secundária (%)</i>	12,36	17,64	26,32	22,66	21,02

**Tabela B19** - Dados obtidos da *Deconvolução de Fourier* da amostra de E4Li.

	<b>Banda Amida I</b>				
<i>Sinais (cm<sup>-1</sup>)</i>	1672	1660	1648	1640	1628
<i>Estrutura Secundária</i>	Folha- $\beta$ Antiparalela	Volta- $\beta$	E.D.	E.D.	Folha- $\beta$ Antiparalela
<i>Estrutura Secundária (%)</i>	16,44	19,63	28,60	17,50	17,82

**Tabela B20** - Dados obtidos da *Deconvolução de Fourier* da amostra de E5Li.

	<b>Banda Amida I</b>				
<i>Sinais (cm<sup>-1</sup>)</i>	1682	1668	1656	1644	1629
<i>Estrutura Secundária</i>	Folha- $\beta$ Antiparalela	Volta- $\beta$	Hélice- $\alpha$	E.D.	Folha- $\beta$ Antiparalela
<i>Estrutura Secundária (%)</i>	4,15	18,11	18,87	33,58	25,28

**Tabela B21** - Dados obtidos da *Deconvolução de Fourier* da amostra de E6Li.

	<b>Banda Amida I</b>				
<i>Sinais (cm<sup>-1</sup>)</i>	1681	1667	1656	1644	1629
<i>Estrutura Secundária</i>	Folha- $\beta$ Antiparalela	Volta- $\beta$	Hélice- $\alpha$	E.D.	Folha- $\beta$ Antiparalela
<i>Estrutura Secundária (%)</i>	7,15	18,40	19,19	31,39	23,87