

Cogumelos silvestres como fonte de moléculas bioactivas

Sandrina Alves Heleno

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

Orientado por

Isabel Cristina Fernandes Rodrigues Ferreira

Anabela Rodrigues Lourenço Martins

Maria João Almeida Coelho de Sousa

**Bragança
2010**

À minha Mãe...

AGRADECIMENTOS

À **Doutora Isabel Cristina Fernandes Rodrigues Ferreira**, à **Doutora Anabela Rodrigues Lourenço Martins**, à **Doutora Maria João de Almeida Coelho de Sousa** (as minhas orientadoras), quero manifestar o meu profundo reconhecimento, pelo nível de exigência pedagógica que sempre me colocaram e pelo estímulo com que sempre me motivaram para a realização do meu trabalho. Não posso esquecer os ensinamentos, a partilha do saber e as valiosas contribuições que me deram para a concretização deste meu objectivo. Terei também forçosamente de destacar a dedicação, tolerância e grande amizade que sempre me dedicaram. Para mim são e serão sempre uma fonte de inspiração. OBRIGADA Chefes.

À **Lillian Barros**, pela amizade e carinho com que sempre me tratou, pela disponibilidade e pelo apoio que sempre teve para me dar. Os amigos são como as estrelas, não se vêem mas estão sempre lá. Sem ti teria sido muito mais difícil. OBRIGADA por tudo Lillian.

À **Rafaela Guimarães** (a minha camarada) pelo apoio, pela amizade e pelos bons momentos ao longo da realização deste trabalho.

Ao **LQBA** (Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada, Escola Superior Agrária de Bragança), por todos os momentos de boa disposição que sempre reinaram lá.

Aos meus **Amigos** pelo carinho, pela amizade, pelo apoio e acima de tudo pela presença.

À minha **Avó** por todo o carinho e apoio que me deu ao longo da minha vida.

À minha **Irmã** e ao meu sobrinho **Miguel** por serem para mim um motivo de alegria.

Aos meus **Pais** recordando todas as referências e valores de vida que me inculcaram, mas sobretudo pelo amor e carinho com que sempre me trataram. Obrigado por me ajudarem a seguir o meu caminho e por terem acreditado em mim. OBRIGADA Pai, OBRIGADA Mãe.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	ii
.....	iv
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
ABREVIATURAS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
I. INTRODUÇÃO	1
1.1. Valor medicinal dos cogumelos.....	5
1.2. Cogumelos como fonte de nutracêuticos.....	6
1.3. Cogumelos como fonte de nutrientes.....	8
II. MATERIAL E MÉTODOS	10
2.1. Material biológico e preparação das amostras.....	10
2.2. Padrões e reagentes.....	13
2.3. Determinação de antioxidantes.....	13
2.3.1. <i>Determinação de fenóis</i>	13
2.3.2. <i>Determinação de tocoferóis</i>	14
2.4. Avaliação da actividade antioxidante.....	15
2.4.1. <i>Actividade bloqueadora de radicais DPPH</i>	15
2.4.2. <i>Poder redutor</i>	15
2.4.3. <i>Inibição da descoloração do β-caroteno</i>	15
2.5. Avaliação do valor nutricional.....	16
2.5.1. <i>Determinação de macronutrientes</i>	16
2.5.2. <i>Determinação de açúcares livres</i>	16
2.5.3. <i>Determinação de ácidos gordos</i>	17
2.6. Análise estatística.....	18
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
3.1. Determinação de antioxidantes.....	19
3.2. Avaliação da actividade antioxidante.....	23
3.3. Avaliação do valor nutricional.....	29

3.3.1. <i>Composição em macronutrientes</i>	29
3.3.2. <i>Composição em açúcares</i>	32
3.3.3. <i>Composição em ácidos gordos</i>	35
IV. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	40
REFERÊNCIAS	43

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES ESTUDADAS	11
TABELA 2. RENDIMENTOS DE EXTRACÇÃO (η) E CONCENTRAÇÕES DE FENÓIS TOTAIS EM AMOSTRAS DE COGUMELOS (MÉDIA \pm SD; N = 3 PARA O RENDIMENTO E N = 9 PARA OS FENÓIS). EM CADA COLUNA, LETRAS DIFERENTES REPRESENTAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE OS RESULTADOS (P< 0,05). 20	
TABELA 3. COMPOSIÇÃO EM TOCOFERÓIS (μ G/G) DAS AMOSTRAS DE COGUMELOS (MÉDIA \pm SD; N=3). EM CADA COLUNA LETRAS DIFERENTES REPRESENTAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS (P<0,05).	22
TABELA 4. ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE (VALORES DE EC50, MG/ML) DAS AMOSTRAS DE COGUMELOS (MÉDIA \pm SD, N=3). EM CADA COLUNA LETRAS DIFERENTES REPRESENTAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS (P<0,05).....	27
TABELA 5. COMPOSIÇÃO EM MACRONUTRIENTES (G/100 G) E VALOR ENERGÉTICO (KCAL/100 G) DAS AMOSTRAS DE COGUMELOS (MÉDIA \pm SD; N=3). EM CADA COLUNA E PARA CADA ESPÉCIE, LETRAS DIFERENTES REPRESENTAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS (P<0,05).....	30
TABELA 6. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DO MÉTODO DE ANÁLISE DE AÇÚCARES.	33
TABELA 7. PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO DO MÉTODO USANDO TRICHOLOMA IMBRICATUM.....	33
TABELA 8. COMPOSIÇÃO EM AÇÚCARES (G/100 G DE MATÉRIA SECA) DAS AMOSTRAS DE COGUMELOS (MÉDIA \pm SD; N=3). EM CADA COLUNA E PARA CADA ESPÉCIE, LETRAS DIFERENTES REPRESENTAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS (P<0,05).	34
TABELA 9. COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GORDOS (PERCENTAGEM) DAS AMOSTRAS DE COGUMELOS (MÉDIA \pm SD; N=3). LETRAS DIFERENTES REPRESENTAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS (P<0,05).....	36

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. <i>LENTINULA EDODES</i> ((BERK.) PEGLER,), OBSERVANDO-SE O PÍLEO E O ESTIPE (WIKIPÉDIA); <i>AGARICUS BISPORUS</i> (J.E.LANGE) IMBACH, OBSERVANDO-SE O PÍLEO, AS LÂMINAS, O ESTIPE E O ANEL (WIKIPÉDIA); <i>VOLVARELLA VOLVACEA</i> (BULLIARD EX FRIES) SINGER, OBSERVANDO-SE O PÍLEO, AS LÂMINAS, O ESTIPE E A VOLVA (JLCHEYPE); <i>AMANITA PHALLOIDES</i> (VENENOSA) (VAILL. EX FR.) LINK, OBSERVANDO-SE O PÍLEO, O ESTIPE, O ANEL E A VOLVA (WIKIPÉDIA).	2
FIGURA 2. ESTRUTURA DE UM COGUMELO (KALAČ, 2009).....	3
FIGURA 3. A- <i>LACCARIA LACCATA</i> (AGRO 689); B- <i>LACCARIA AMETHYSTINA</i> (AGRO 689);C- <i>RUSSULA DELICA</i> (AGRO 689); D- <i>HYDNUM REPANDUM</i> (AGRO 689); E- <i>FISTULINA HEPATICA</i> (AGRO 689); F- <i>MYCENA ROSEA</i> (AGRO 689); G- <i>HYGROPHOROPSIS AURANTIACA</i> (WIKIPÉDIA); H- <i>HYPHOLOMA CAPNOIDES</i> (WIKIPÉDIA); I- <i>LACTARIUS SALMONICOLOR</i> (WIKIPÉDIA); J- <i>LEPISTA INVERSA</i> (WIKIPÉDIA); K- <i>SUILLUS MEDITERRANEENSIS</i> (WIKIPÉDIA); L- <i>TRICHOLOMA IMBRICATUM</i> (ENCYCLOPEDIA OF LIFE); M- <i>CLITOCYBE ALEXANDRI</i> (WIKIPÉDIA); N- <i>LACTARIUS AURANTIACUS</i> (WIKIPÉDIA); O- <i>LEPISTA SORDIDA</i> (WIKIPÉDIA); P- <i>RUSSULA VESCA</i> (WIKIPÉDIA); Q- <i>SUILLUS COLLINITUS</i> (WIKIMEDIA COMMONS); R- <i>TRICHOLOMA SULPHUREUM</i> (WIKIPÉDIA); S- <i>CORTINARIUS GLAUCOPUS</i> (BASE DE DONNÉES MYCOLOGIQUE).....	12
FIGURA 4. CROMATOGRAMA INDIVIDUAL DE TOCOFERÓIS DA ESPÉCIE <i>RUSSULA DELICA</i> . 1) A-TOCOFEROL; 2) B-TOCOFEROL; 3) γ -TOCOFEROL; 4) TOCOL (PI).....	23
FIGURA 5. ACTIVIDADE BLOQUEADORA DE RADICAIS DE DPPH (%) DAS AMOSTRAS DE COGUMELOS (MÉDIAS \pm SE, N=3).....	24
FIGURA 6. PODER REDUTOR DAS AMOSTRAS DE COGUMELOS (MÉDIA \pm SE, N=3).	25
FIGURA 7. CAPACIDADE DE INIBIÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DAS AMOSTRAS DE COGUMELOS, MEDIDA PELA INIBIÇÃO DA DESCOLORAÇÃO DO B-CAROTENO (MÉDIA \pm SE, N=3).....	26
FIGURA 8. CROMATOGRAMA INDIVIDUAL DE AÇÚCARES DA ESPÉCIE <i>TRICHOLOMA IMBRICATUM</i> . 1) FRUTOSE (PI); 2) MANITOL; 3) TREALOSE.	35
FIGURA 9. CROMATOGRAMA INDIVIDUAL DE ÁCIDOS GORDOS DA ESPÉCIE <i>LACCARIA LACCATA</i> . 1) C6:0; 2) C8:0; 3) C10:0; 4) C12:0; 5) C14:0; 6) C15:0; 7) C16:0; 8) C16:1; 9) C17:0; 10) C18:0; 11) C18:1N9; 12) C18:2N6C; 13) C18:3N3; 14) C20:0; 15) C20:1c; 16) C20:2c; 17) C20:3N3+C21:0; 18) C20:5N3 19) C22:0; 20) C22:1; 21) C23:0; 22) C24:0; 23) C24:1.....	39

ABREVIATURAS

A - Absorvância

ArOH - Antioxidante fenólico

ANOVA Análise de variância

ABR Actividade bloqueadora de radicais

ABS Absorvância

BHA 2-*t*-butil-4-metoxifenol

BHT 2,6-di-*t*-butil-4-metilfenol

BRESA Herbário da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança

CV Coeficiente de variação

DI Diâmetro interno

DNA Ácido desoxirribonucleico

DPPH 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo

EAG Equivalentes de ácido gálico

EC₅₀ Concentração de extracto correspondente a 50% de actividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no ensaio do Poder redutor

FAME Mistura de ésteres metílicos de ácidos gordos

FID Detector de ionização de chama

g Grama

g Aceleração gravítica

GC Cromatografia gasosa

HPLC Cromatografia líquida de alta eficiência

L• Radical lipídico

LH Lípidos poliinsaturados

LOO• Radical peroxilo

LOOH Lípidos hidroperóxidos

LOD Limites de detecção

LOQ Limites de quantificação

MUFA Ácidos gordos monoinsaturados

n° Número

nd Não detectado

PI Padrão interno

PUFA Ácidos gordos poliinsaturados

RID - Detector de índice de refração

RNS Espécies reactivas de azoto

ROS Espécies reactivas de oxigénio

rpm Rotações por minuto

SD Desvio padrão

SE Erro padrão

SFA Ácidos gordos saturados

TBHQ *t*-butil-hidroquinona

UFA Ácidos gordos insaturados

UV Ultravioleta

V/V Volume/Volume

RESUMO

No presente trabalho, apresentam-se estudos de avaliação das propriedades bioativas e da composição nutricional de dezanove espécies de cogumelos silvestres provenientes de Portugal (*Clitocybe alexandri*, *Cortinarius glaucopus*, *Fistulina hepatica*, *Hydnum repandum*, *Hygrophoropsis aurantiaca*, *Hypholoma capnoides*, *Laccaria amethystina*, *Laccaria laccata*, *Lactarius aurantiacus*, *Lactarius salmonicolor*, *Lepista inversa*, *Lepista sordida*, *Mycena rosea*, *Russula delica*, *Russula vesca*, *Suillus collinitus*, *Suillus mediterraneensis*, *Tricholoma sulphureum*, *Tricholoma imbricatum*).

A actividade antioxidante foi avaliada através de ensaios de determinação da capacidade bloqueadora de radicais livres, do poder redutor e da inibição da peroxidação lipídica em soluções de lipossomas. A composição das amostras em tocoferóis foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) acoplada a um detector de fluorescência. Os perfis em ácidos gordos e açúcares foram obtidos por cromatografia gasosa acoplada a um detector de ionização de chama (GC/FID) e por HPLC acoplada a um detector de índice de refração (RID), respectivamente.

As espécies analisadas mostraram ser fontes importantes de antioxidantes nomeadamente fenóis (0,51–7,90 mg/g) e tocoferóis (0,02–8,04 µg/g). β-tocoferol foi a forma encontrada em maiores quantidades enquanto que δ-tocoferol não foi detectado na maioria das amostras. Todas as espécies mostraram ter actividade antioxidante, sendo esta mais significativa para a amostra *Hygrophoropsis aurantiaca* (valores de EC₅₀ inferiores a 1,35 mg/ml) devido à contribuição de fenóis (7,90 mg/g) e tocoferóis (1,94 µg/g).

A determinação do perfil em macronutrientes demonstrou que os cogumelos silvestres são fontes ricas em proteínas (24,32-76,63 g/100 g) e glícidos (10,35-55,48 g/100 g), apresentando baixos valores de lípidos (0,36-2,63 g/100 g). A espécie que revelou maior valor energético foi *H. aurantiaca*. A análise da composição em ácidos gordos conduziu à quantificação de 25 moléculas. Predominaram os ácidos gordos insaturados, particularmente os ácidos oleico e linoleico (17-61% e 20-54%, respectivamente). A metodologia de análise de açúcares foi completamente validada no âmbito deste trabalho. Obteve-se um período de separação de 10 minutos e o método utilizado mostrou ser sensível, reprodutível e preciso. Arabinose (1,53-7,66 g/100 g), manitol (0,38-18,41 g/100 g) e trealose (0,21-18,66 g/100 g) foram os açúcares mais abundantes.

Os estudos efectuados descrevem o potencial nutracêutico das espécies analisadas, disponibilizando informação que leve a uma melhor gestão e conservação dos macrofungos e respectivos habitats.

ABSTRACT

The present study describes the bioactive properties and nutritional composition of nineteen wild mushrooms from Portugal (*Clitocybe alexandri*, *Cortinarius glaucopus*, *Fistulina hepatica*, *Hydnum repandum*, *Hygrophoropsis aurantiaca*, *Hypholoma capnoides*, *Laccaria amethystina*, *Laccaria laccata*, *Lactarius aurantiacus*, *Lactarius salmonicolor*, *Lepista inversa*, *Lepista sordida*, *Mycena rosea*, *Russula delica*, *Russula vesca*, *Suillus collinitus*, *Suillus mediterraneensis*, *Tricholoma sulphureum*, *Tricholoma imbricatum*).

The antioxidant activity was evaluated through radical-scavenging capacity, reducing power and inhibition of lipid peroxidation in liposome solutions assays. Furthermore, the tocopherols composition was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to a fluorescence detector. Fatty acid and sugar profiles were obtained by gas chromatography coupled to a flame ionization detector (GC/FID) and HPLC coupled to a refraction index detector (RID), respectively.

The analysed mushrooms contain powerful antioxidants such as phenols (0.51– 7.90 mg/g) and tocopherols (0.02–8.04 µg/g). β-Tocopherol was the vitamer detected in higher amounts, while δ-tocopherol was not detected in the majority of the samples. All the species proved to have antioxidant activity being more significant for *Hygrophoropsis aurantiaca* (EC₅₀ values lower than 1.35 mg/ml) due to the contribution of antioxidants such as phenols (7.90 mg/g) and tocopherols (1.94 µg/g). The macronutrient profile in general revealed that the wild mushrooms were rich sources of protein (24.32–76.63 g/100 g) and carbohydrates (10.35–55.48 g/100 g), and had low amounts of fat (0.36–2.63 g/100 g). The highest energetic contribution was guaranteed by *H. aurantiaca*. The analysis of fatty acid composition allowed the quantification of 25 fatty acids. Unsaturated fatty acids and, in particular, oleic and linoleic acids, were predominant (17–61% and 20–54%, respectively). Sugars methodology analysis was completely validated being all the compounds separated in a period of time of 10 min; the method proved to be sensitive, reproducible and accurate. Arabinose (1.53–7.66 g/100 g), mannitol (0.38–18.41 g/100 g) and trehalose (0.21–18.66 g/100 g) were the most abundant sugars.

The present study states the nutraceutical potential of the analysed species, making the information available for a better management and conservation of mushrooms and related habitats.

I. INTRODUÇÃO

Os fungos incluem cogumelos, bolores, mofo e leveduras, assim como muitos outros organismos menos conhecidos (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Estes organismos eucariotas foram separados do reino das plantas por Whittaker, passando a ter o seu próprio reino em 1969 devido a várias características, entre as quais, o facto de não serem fotossintéticos, de terem de absorver nutrientes produzidos por outros organismos, diferirem das plantas na composição e estrutura da sua parede celular e nos seus processos de reprodução (Whittaker, 1969).

Os fungos podem ser organismos unicelulares (as leveduras) ou pluricelulares filamentosos que são caracterizados por serem organismos não-móveis, compostos por filamentos com crescimento apical designados de hifas (ao conjunto das hifas chama-se micélio), e por terem um ciclo de vida com reprodução sexuada e assexuada, geralmente a partir de um talo comum, talo haplóide resultante da meiose zigótica e ainda por terem nutrição heterotrófica. A parede celular é composta por quitina (beta-1,4-homopolímeros ligados a N-acetilglucosamina em estado microcristalino) e glucanos como alfa-glucanos (ligações α -1,3 e α -1,6) (Griffin, 1994; Alexopoulos *et al.*, 1996).

Actualmente, a maioria dos cientistas divide o reino Fungi em sete filos diferentes: Basidiomycota, Ascomycota, Zygomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Blastocladiomycota, Neocallimatiogomycota embora estes dois últimos sejam menos conhecidos (Seif *et al.*, 2005; James *et al.*, 2006a; James *et al.*, 2006b; Liu *et al.*, 2006; Steenkamp *et al.*, 2006.).

Segundo Chang & Miles (1992) um cogumelo é um macrofungo com um corpo de frutificação distintivo que pode ser epígeo (acima do solo) ou hipógeo (abaixo do solo) e suficientemente grande para ser visto a olho nú e ser colhido com a mão (Chang & Miles, 2004).

O tipo mais comum de cogumelo é em forma de cúpula com píleo e estipe, por exemplo, *Lentinula edodes*, algumas espécies têm adicionalmente um anel, por exemplo, *Agaricus bisporus*, ou uma volva, como no caso de *Volvacea volvarella*, ou ambos, como acontece em *Amanita phalloides* (Chang & Miles, 2004).



Figura 1. *Lentinula edodes* ((Berk.) Pegler.), observando-se o píleo e o estipe (Wikipédia); *Agaricus bisporus* (J.E.Lange) Imbach, observando-se o píleo, as lâminas, o estipe e o anel (Wikipédia); *Volvariella volvacea* (Bulliard ex Fries) Singer, observando-se o píleo, as lâminas, o estipe e a volva (jilcheype); *Amanita phalloides* (Vaill. ex Fr.) Link, observando-se o píleo, o estipe, o anel e a volva (Wikipédia).

A estrutura a que chamamos de cogumelo é na verdade apenas o corpo de frutificação do fungo. A parte vegetativa do fungo, chamada de micélio, compreende um sistema de ramificação, fios e filamentos que se ramificam no solo, madeira ou outros materiais lenhocelulósicos em que o fungo se está a desenvolver.

Após um período de crescimento, e em condições favoráveis, o micélio estabelecido produz a estrutura de frutificação, à qual chamamos de cogumelo (Chang & Miles, 2004).

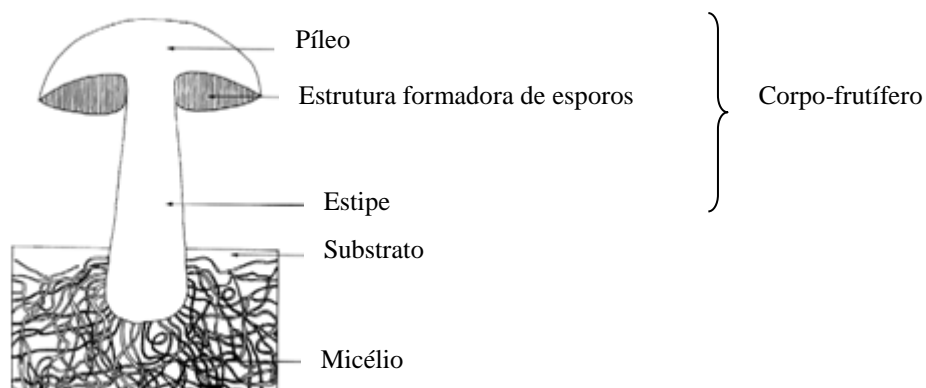


Figura 2. Estrutura de um cogumelo (Kalač, 2009).

As espécies do filo Basidiomycota, englobam a maioria das espécies de cogumelos, a que pertencem os gêneros mais conhecidos como o gênero *Agaricus* (incluindo a variedade mais comercializada), *Amanita* (incluindo espécies mortais e com propriedades alucinogênicas), *Boletus* e *Cantharellus* (Arora, 1986; Margulis & Schwartz, 1988; Alexopoulos *et al.*, 1996).

Frequentemente a identificação das espécies de cogumelos é feita com base nas suas propriedades macroscópicas, microscópicas e organolépticas. Os cogumelos, na maioria dos casos, têm forma de guarda-chuva e são constituídos por um chapéu (píleo) e um pé (estipe). Por baixo do chapéu apresentam uma superfície de consistência mole, o himénio, onde se produzem os esporos. O himénio pode apresentar formas variadas: lâminas ou lamelas, tubos ou poros, pregas mais ou menos definidas, superfícies lisas, etc. (Martins, 2004). Uma espécie de cogumelo pode apresentar diferentes cores conforme o seu estado de maturação (Martins, 2004).

Não existindo um teste que nos permita saber se um cogumelo é comestível ou não, este cogumelo nunca deve ser consumido a menos que tenha sido identificado com precisão e a comestibilidade da espécie seja conhecida. Apesar dos cogumelos venenosos representarem menos de 1% dos cogumelos conhecidos no mundo, não podemos ignorar a existência das espécies perigosas e até fatais embora sejam relativamente escassas. As toxinas contidas em várias espécies são muito diferentes na composição química e, portanto, os efeitos do envenenamento variam consideravelmente de acordo com as espécies envolvidas (Shepherd & Totterdell, 1988).

Não devemos esquecer que os fungos, devido à falta de pigmentos de clorofila foto ou quimiosintéticos, têm que se relacionar com outros seres vivos para sobreviver,

procurando nutrientes orgânicos. Devem obter o carbono para formar os seus tecidos a partir de substâncias orgânicas, vivas ou mortas. Os fungos têm vindo a adaptar-se a todos ou quase todos os meios e possíveis formas de vida aquáticas e terrestres. Podem viver sob a neve, água doce e salgada, em terra, nas areias escaldantes do deserto, em madeira, em húmus, em praias de areia, etc. (Rodríguez *et al.*, 2008).

Desta forma os fungos podem ser saprófitas, parasitas ou ainda, simbióticos (micorrízicos e líquenes). Os fungos saprófitas alimentam-se de matéria orgânica morta ou em decomposição, são os mais frequentes em determinados ecossistemas e intervêm na mineralização de resíduos para que possam tornar-se parte do húmus. Estes fungos contribuem para a degradação da matéria morta. Dependendo da Natureza da substância em que vivem e da qual se alimentam pela sua decomposição, os saprófitas podem dividir-se em: húmicas, fimícolas, lenhícolas, terrícolas, práxicolas, folícolas e pirófilos (Rodríguez *et al.*, 2008).

Os fungos parasitas são aqueles que colonizam animais, vegetais ou outros fungos, aos quais provocam doenças, causando por vezes a sua morte (necrotróficos), vivendo à custa destes (Rodríguez *et al.*, 2008).

Nos fungos micorrízicos, o micélio no solo, alimenta-se pela decomposição de substâncias orgânicas existentes ou pelo estabelecimento de uma relação especial de parceria mútua com as raízes de plantas. A relação entre fungos e raízes de plantas é um tipo específico de simbiose conhecida como micorriza ou simbiose micorrízica (Rodríguez *et al.*, 2008).

A grande maioria dos cogumelos são um alimento de elevado valor nutritivo, outros têm valor medicinal como suplementos dietéticos, e há ainda alguns que têm ambas as propriedades. Os suplementos dietéticos são ingredientes extraídos de ervas, plantas e espécies fúngicas que normalmente não são usados como alimento habitual mas que impulsionam o sistema imunitário ou ajudam a manter a saúde (Zeisel, 1999).

Os cogumelos podem ser considerados um alimento funcional. Cogumelos de crescimento rápido têm tido um interesse notável nas últimas décadas, com a percepção de que são alimentos deliciosos, com elevado valor nutricional, e com interesse medicinal. As fontes de energia são glícidos e lípidos e as fontes estruturais são proteínas. Os factores alimentares acessórios, vitaminas e compostos inorgânicos, juntamente com a água, são indispensáveis para uma boa saúde (Chang & Miles, 2004).

Os cogumelos podem ser consumidos pela sua palatabilidade e/ou valor nutricional. Palatabilidade pode ser caracterizada pela cor, textura, sabor e gosto, mas a

determinação do valor nutricional envolve a análise da composição e o estudo do perfil de aminoácidos, ácidos gordos, vitaminas, minerais e ácidos nucleicos presentes (Chang & Miles, 2004).

1.1. Valor medicinal dos cogumelos

Os produtos naturais representam uma fonte rica em compostos biologicamente activos e são um exemplo de diversidade molecular, com potencial reconhecido para a descoberta e desenvolvimento de fármacos (Grabley & Thiericke, 1999; Newman *et al.*, 2000). Mais de 75% dos fármacos anti-tumorais e anti-infecciosos têm origem em fontes naturais (Butler, 2004).

Os nutracêuticos, propostos por DeFelice em 1979 e citados por Brower em 1988, são alimentos que proporcionam benefícios médicos ou de saúde, incluindo a prevenção e o tratamento da doença (Brower, 1988). Um cogumelo nutracêutico é um extracto refinado obtido a partir, quer do micélio, quer do corpo de frutificação, que pode ser consumido, na forma de cápsulas ou comprimidos, como suplemento alimentar e que tem uma potencial aplicação terapêutica (Chang & Bussel, 1996).

Substâncias bioactivas com efeitos imunomoduladores têm sido isoladas de cogumelos. Estas incluem polissacáridos de alto e baixo peso molecular, glicoproteínas (lectinas), triterpenóides e proteínas imunomoduladoras de fungos (Fips) (Chang & Buswell, 1999; Ikekawa, 2001; Zhou & Gao, 2002).

A grande maioria dos cogumelos contém polissacáridos biologicamente activos com actividade anti-tumoral e imunoestimuladora (Chang & Miles, 2004). Os polissacáridos biologicamente activos são as substâncias mais conhecidas, derivadas de cogumelos, que são particularmente eficazes no retardamento de vários tumores e de outras doenças através da estimulação do sistema imunitário, são também eficazes na redução dos efeitos colaterais dos tratamentos de quimioterapia e tratamentos por radiação por interferirem ao nível dos efeitos regenerativos nas células (Chang & Miles, 2004). Mizuno *et al.* (1995) e Hobbs (1995) sumaram estes estudos.

Os três primeiros compostos biologicamente activos desenvolvidos a partir de cogumelos medicinais foram polissacáridos, todos β -glucanos: Crestina (*Krestin*), a partir de micélio da espécie *Coriolus versicolor* (Tsukagoshi *et al.*, 1984), Lentinano (*Lentinan*) a partir de corpos de frutificação da espécie *Lentinus edodes* (Chihara *et al.*,

1970; Kosaka & Yamashita, 1993) e esquizofilano (*Schizophyllan*) preparado a partir da espécie *Schizophyllum commune* (Kikumoto *et al.*, 1971; Komatsu *et al.*, 1969).

De facto, os fungos da classe Basidiomycetae (Basidiomicetos) constituem fontes inesgotáveis de agentes terapeuticamente úteis e biologicamente activos (Mizuno, 1995; Wasser, 2002). O espectro de detecção da actividade farmacológica dos Basidiomicetos é muito amplo, incluindo efeitos antifúngicos, anti-inflamatórios, anti-tumorais, anti-bacterianos, anti-parasitários, imunomoduladores e hepatoprotectores; igualmente promissor é o seu papel na regulação da pressão sanguínea, bem como no tratamento de doenças cardiovasculares, hipercolesterolemia e diabetes (Wasser & Weis, 1999).

Os conhecimentos sobre o grande potencial de fungos microscópicos na produção de metabolitos bioactivos, a sua utilização em etnomedicina, a necessidade ecológica de fungos para a produção de metabolitos bioactivos secundários e a possibilidade de aperfeiçoamento genético, análise química e farmacológica, leva-nos a considerar que os macrofungos (cogumelos) possuem um grande potencial bioactivo (Lindequist *et al.*, 2005).

1.2. Cogumelos como fonte de nutracêuticos

Espécies reactivas de oxigénio (ROS) e de azoto (RNS) parecem estar relacionadas com a deterioração oxidativa de produtos alimentares e com várias doenças humanas nomeadamente aterosclerose, diabetes mellitus, inflamação crónica, distúrbios neurodegenerativos e alguns tipos de cancro (Halliwell, 1996). Assim, existe um grande interesse em encontrar antioxidantes naturais para utilização em alimentos de forma a retardar a oxidação lipídica ou em aplicações farmacêuticas para doenças crónicas relacionadas com a produção de radicais livres (Prior, 2003).

Os macrofungos (cogumelos) são fontes ricas em compostos antioxidantes tais como compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonóides) e tocoferóis (Ferreira *et al.*, 2009). Nos últimos anos, foram estudadas no laboratório onde decorreu o presente trabalho, as propriedades antioxidantes de dezanove espécies de cogumelos do Nordeste de Portugal, uma das regiões europeias com maior diversidade destes organismos, de forma a valorizá-los como uma fonte de nutracêuticos (Barros *et al.*, 2008a; Barros *et al.*, 2008b; Ferreira *et al.*, 2009). Todavia, assumindo que a proporção de cogumelos de entre os desconhecidos e os que não foram ainda examinados é apenas de 5%, existem

milhares de espécies macrofúngicas potencialmente benéficas para a Humanidade ainda por descobrir. Sabe-se que, mesmo de entre as espécies conhecidas, a proporção de cogumelos bem caracterizados é muito baixa. Com base nesta realidade, surgiu este trabalho no sentido de documentar o potencial nutracêutico destas espécies únicas e disponibilizar a informação para uma melhor gestão e conservação destes recursos naturais e seus habitats.

O presente trabalho é inovador porque descreve a composição em tocoferóis (vitamina E) das espécies *Clitocybe alexandri*, *Cortinarius glaucopus*, *Hydnum repandum*, *Hygrophoropsis aurantiaca*, *Hypholoma capnoides*, *Laccaria amethystina*, *Laccaria laccata*, *Lactarius aurantiacus*, *Lactarius salmonicolor*, *Lepista inversa*, *Lepista sordida*, *Mycena rosea*, *Russula vesca*, *Suillus collinitus*, *Suillus mediterraneensis* e *Tricholoma sulphureum*. Quanto às espécies *Russula delica* e *Hydnum repandum*, existiam apenas estudos de amostras provenientes da Turquia e Espanha, respectivamente, não havendo estudos em amostras de Portugal.

A vitamina E é um termo frequentemente usado para designar uma família de compostos quimicamente relacionados, denominados tocoferóis e tocotrienóis, que compartilham uma estrutura comum tendo na sua molécula uma região com um grupo cromanol e uma cadeia lateral de isopreno. Devido ao seu papel como bloqueador de radicais livres, a vitamina E é, também, considerada como protectora do nosso organismo contra doenças degenerativas, nomeadamente cancro e doenças cardiovasculares (Burton & Traber, 1990; Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996). No passado, o α -tocopherol foi considerada a forma de vitamina E mais activa em humanos por apresentar a maior actividade biológica. No entanto, algumas publicações recentes têm destacado efeitos benéficos para a Saúde das outras isoformas da vitamina E (Traber, 1999; Schwenke, 2002).

Têm sido publicados numerosos estudos sobre a composição em tocoferóis de algumas espécies de cogumelos (Barros *et al.*, 2008a; Barros *et al.*, 2008b; Elmastas *et al.*, 2007; Jayakumar *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2007; Mau *et al.*, 2004; Mau *et al.*, 2001; Mau *et al.*, 2002a; Mau *et al.*, 2002b; Tsai *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2002). Todos os autores citados descreveram a mesma metodologia de análise incluindo um passo de saponificação no processo de extracção e determinação por HPLC-UV. Barros *et al.* (2008a) porém, realizaram um processo de extracção sem saponificação, adicionando um antioxidante para evitar a oxidação dos tocoferóis e protegendo as amostras da luz e do calor, tendo sido também os primeiros a utilizar HPLC com detector de fluorescência

na análise destes compostos. No presente trabalho utilizou-se este último processo, tendo sido possível identificar e quantificar as isoformas α -, β -, δ - e γ -tocoferol. Em nenhum dos estudos citados foram detectados tocotrienóis.

1.3. Cogumelos como fonte de nutrientes

Desde os primórdios da civilização humana que os corpos frutíferos dos macrofungos (cogumelos) são apreciados não apenas pela sua textura e sabor, mas também pelas suas propriedades químicas e nutricionais (Manzi *et al.*, 1999). Existem na natureza mais de 140,000 espécies de cogumelos mas, menos de 25 espécies (*Agaricus bisporus*, *Pleurotus spp.*, *Lentinus edodes*, *Volvariella volvacea*, *Auricularia spp.*, *Lepista nuda* etc.) são amplamente aceites como alimento e apenas alguns atingiram um nível comercial (Lindequist *et al.*, 2005). No entanto, os cogumelos silvestres comestíveis têm vindo a ser utilizados como alimento há séculos, devido ao seu sabor único e delicado. São também tradicionalmente consumidos sazonalmente por grupos específicos de pessoas (população local, vegetarianos, apreciadores e gourmets) fornecendo uma fonte de minerais e vitaminas quando os vegetais frescos não se encontram disponíveis. Os cogumelos silvestres comestíveis são ricos em minerais e possuem elevadas quantidades de água, proteínas, fibras e glúcidos; apresentam baixos valores de lípidos o que os torna excelentes como alimento a incluir em dietas pouco calóricas (Ogundana & Fagade, 1982; Senatore *et al.*, 1988; Aletor, 1995; Fasidi, 1996; Longvah & Deosthale, 1998; Thimmel & Kluthe, 1982; Yildiz *et al.*, 1998; Díez & Alvarez, 2001; Agahar-Murugkar & Subbulakshmi, 2005; Kalač, 2009). As espécies de cogumelos comestíveis são altamente nutritivas e podem ser comparadas favoravelmente com carne, ovos e leite. Alguns investigadores descreveram inclusivamente que a composição em aminoácidos dos cogumelos é comparável à das proteínas de origem animal (Fink & Hoppenhaus, 1958; Gruen & Wong, 1982), o que é particularmente importante considerando o custo e o surto de doenças relacionadas com a carne. O potencial nutricional e as suas implicações na substituição gradual de carne por cogumelos requer, no entanto, uma análise cuidadosa, envolvendo estudos químicos e biológicos detalhados (Aletor, 1995).

Já foram caracterizadas nutricionalmente dezasseis espécies de cogumelos silvestres provenientes do Nordeste de Portugal: *Agaricus arvensis*, *Lactarius deliciosus*, *Leucopaxillus giganteus*, *Sarcodon imbricatus*, *Tricholoma portentosum* (Barros *et al.*,

2007a), *Lactarius deliciosus*, *Macrolepiota mastoidea*, *Macrolepiota procera* (Barros *et al.*, 2007b), *Agaricus bisporus*, *Agaricus silvaticus*, *Agaricus silvicola* (Barros *et al.*, 2008a), *Cantharellus cibarius*, *Lepista nuda*, *Lycoperdon molle*, *Lycoperdon perlatum* e *Ramaria botrytis* (Barros *et al.*, 2008b). A composição nutricional das espécies *Russula delica* e *Fistulina hepatica* provenientes da Grécia já tinha sido estudada (Ouzouni *et al.*, 2009) não existindo, no entanto, estudos acerca da sua composição individual em açúcares e ácidos gordos.

No presente trabalho, descreve-se a composição química de dez espécies diferentes de cogumelos silvestres (*Cortinarius glaucopus*, *Fistulina hepatica*, *Hygrophoropsis aurantiaca*, *Hypholoma capnoides*, *Laccaria laccata*, *Lactarius salmonicolor*, *Lepista inversa*, *Russula delica*, *Suillus mediterraneensis*, *Tricholoma imbricatum*), referenciando os valores de humidade, proteínas, lípidos, glícidos e cinzas. Com base na composição das amostras foi também feita uma estimativa do seu valor nutricional. Determinou-se ainda o perfil de ácidos gordos e de açúcares por GC/FID e HPLC/RID, respectivamente, sendo a última metodologia completamente validada no âmbito deste trabalho.

II. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material biológico e preparação das amostras

As espécies de cogumelos silvestres *Clitocybe alexandri* (Gillet) Konrad, *Cortinarius glaucopus* (Schaeff), *Fistulina hepática* (Schaeff.: Fr.), *Hydnum repandum* (L.: Fr.), *Hygrophoropsis aurantiaca* Wulf.: Fr.) Mre., *Hypholoma capnoides* (Fr.) Quel., *Laccaria amothystina* (Bolt. exFr.) R.Maire, *Laccaria laccata* (scop.: Fr.) Berk. & Broome, *Lactarius aurantiacus* (Fr.), *Lactarius salmonicolor* (Heim y Leclair), *Lepista inversa* (Scop.: Fr.) Pat., *Lepista sórdida* (Fr.) Singer, *Mycena rosea* (Schumach.) Gramberg, *Russula delica* (Fr.), *Russula vesca* (Fr.), *Suillus collinitus* (Fr.) Kuntz, *Suillus mediterraneensis* (Jacquetant & Blum) Redeuilh, *Tricholoma sulphureum* (Bull.: Fr.) Kumm, *Tricholoma imbricatum* (Fr.) P. Kumm. foram obtidas no nordeste transmontano em habitats de carvalhal, souto e floresta mista, no Outono de 2008 entre Outubro e Dezembro. *Mycena rosea* e *Tricholoma sulphureum* são espécies não comestíveis e *Cortinarius glaucopus* é uma espécie de comestibilidade desconhecida. Na tabela 1 encontra-se a caracterização das espécies estudadas. A classificação taxonómica dos esporocarpos foi feita de acordo com identificações de vários autores (Courtecuisse & Duhon, 2005; Kirk *et al.*, 2001) e de chaves de identificação *online* (Mushroomexperte.com; Mycokeyweb). Depositou-se um exemplar de cada espécie no herbário da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança (BRESA) Todas as amostras foram liofilizadas (Ly-8-FM-ULE, Snijders) e reduzidas a pó.

Tabela 1. Caracterização das espécies estudadas

Espécie	Reino	Divisão	Classe	Ordem	Família	Género	Referência	Comestibilidade	Ecologia
<i>Clitocybe alexandri</i>	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Tricholomataceae	Clitocybe	(Gillet) Konrad	Comestível	Saprófita húmícol
<i>Cortinarius glaucopus</i>	Fungi	Basidiomycota	Basidiomycetes	Agaricales	Cortinariaceae	Cortinarius	(Schaeff)	Comestível	Micorrízico
<i>Fistulina hepatica</i>	Fungi	Basidiomycota	Basidiomycetes	Agaricales	Fistulinaceae	Fistulina	(Schaeff.:Fr)	Comestível	Parasita
<i>Hydnum repandum</i>	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Cantharellales	Hydnaceae	Hydnum	(L.:Fr)	Comestível	Micorrízico
<i>Hygrophoropsis aurantiaca</i>	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Boletales	Higrophoropsidaceae	Higrophoropsis	(Wulf.:Fr) Mre.	Não comestível	Micorrízico
<i>Hypholoma capnoides</i>	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Cortinariales ou Agaricales	Strophariaceae	Hypholoma	(Fr.) Quel.	Comestível	Saprófitas lenhícolas
<i>Laccaria amethystina</i>	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Hydnangiaceae	Laccaria	(Bolt. ex Fr.) R.Maire	Comestível	Micorrízico
<i>Laccaria laccata</i>	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Hydnangiaceae	Laccaria	(Scop.:Fr) Berk. & Broome	Comestível	Micorrízico
<i>Lactarius aurantiacus</i>	Fungi	Basidiomycota	Basidiomycetes	Russulales	Russulaceae	Lactarius	(Fr.)	Comestível	Micorrízico
<i>Lactarius salmonicolor</i>	Fungi	Basidiomycota	Basidiomycetes	Russulales	Russulaceae	Lactarius	(Heim Y Leclair)	Comestível	Micorrízico
<i>Lepista inversa</i>	Fungi	Basidiomycota	Basidiomycetes	Agaricales	Tricholomataceae	Lepista	(Scop.:Fr.) Pat	Comestível	Saprófita húmícol
<i>Lepista sordida</i>	Fungi	Basidiomycota	Basidiomycetes	Agaricales	Tricholomataceae	Lepista	(Fr.Singer)	Comestível	Saprófita húmícol
<i>Mycena rosea</i>	Fungi	Basidiomycota	Basidiomycetes	Agaricales	Mycenaceae	Mycena	(Schumach.) Gramberg	Venoso	Saprófita húmícol
<i>Russula delicata</i>	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Russulales	Russulaceae	Russula	(Fr.)	Comestível	Micorrízico
<i>Russula vesca</i>	Fungi	Basidiomycota	Homobasidiomycetae	Russulales	Russulaceae	Russula	(Fr.)	Comestível	Micorrízico
<i>Suillus collinitus</i>	Fungi	Basidiomycota	Basidiomycetes	Boletales	Suillaceae	Suillus	(Fr.) Kurtz	Comestível	Micorrízico
<i>Suillus mediterraneensis</i>	Fungi	Basidiomycota	Basidiomycetes	Boletales	Suillaceae	Suillus	(Jacquetant & Blum) Redeuilh	Não comestível	Micorrízico
<i>Tricholoma sulphureum</i>	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Tricholomataceae	Tricholoma	(Bull.:Fr.) Kumm	Venoso	Micorrízico
<i>Tricholoma imbricatum</i>	Fungi	Basidiomycota	Basidiomycetes	Agaricales	Tricholomataceae	Tricholoma	(Fr.) P. Kumm.	Comestível	Saprófita húmícol



Figura 3. A- *Laccaria laccata**; B- *Laccaria amethystina**; C- *Russula delica**; D- *Hydnum repandum**; E- *Fistulina hepatica** ; F- *Mycena rosea**; G- *Hygrophoropsis aurantiaca* (Wikipédia); H- *Hypholoma capnoides* (Wikipédia); I- *Lactarius salmonicolor* (Wikipédia); J- *Lepista inversa* (Wikipédia); K- *Suillus mediterraneensis* (Wikipédia); L- *Tricholoma imbricatum* (Encyclopedia of life); M- *Clitocybe alexandri* (Wikipédia); N- *Lactarius aurantiacus* (Wikipédia); O- *Lepista sordida* (Wikipédia); P- *Russula vesca* (Wikipédia); Q- *Suillus collinitus* (Wikimedia Commons); R- *Tricholoma sulphureum* (Wikipédia); S- *Cortinarius glaucopus* (Base de données mycologique). * Projecto AGRO 689 - Demonstração do papel dos macrofungos na vertente agrónómica, económica e ambiental no Nordeste Transmontano.

2.2. Padrões e reagentes

Os solventes acetonitrilo 99,9%, *n*-hexano 95% e acetato de etilo 99,98%, grau HPLC, foram fornecidos pela Lab-Scan (Lisboa, Portugal). Todos os outros solventes usados eram de grau analítico: metanol e éter dietílico (Lab Scan); tolueno (Riedel-de-Haën); ácido sulfúrico (Fluka, St. Gallen, Suíça). Os padrões de tocoferóis e os padrões usados nos ensaios da actividade antioxidante: BHA (2-*t*-butil-4-metoxifenol), TBHQ (*t*-butil-hidroquinona), *L*-ácido ascórbico, α -tocoferol e ácido gálico eram da marca Sigma (St.Louis, MO, EUA). O tocol racémico, 50mg/ml, foi adquirido na Matreya (PA, EUA). O 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) foi obtido na Alfa Aesar (Ward Hill, MA, EUA). A mistura padrão dos ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME; ácidos gordos C4 a C24) era da Supelco (Bellefonte, PA, EUA) e foi adquirida na Sigma (St.Louis, MO, EUA), assim como outros isómeros de ácidos gordos individuais e os padrões de açúcares. Os restantes reagentes foram comprados à Sigma Chemical Co. (St.Louis; MO, EUA). A água foi tratada com um sistema de purificação Mili-Q (TGI Pure Water Systems, EUA).

2.3. Determinação de antioxidantes

2.3.1. Determinação de fenóis

As amostras (1,5 g de peso seco) foram submetidas a uma extracção líquido-sólido, com 40 ml de metanol durante 12 h (25 °C a 150 rpm) e filtradas com papel Whatman nº 4. O resíduo foi posteriormente extraído com 20 ml de metanol (25 °C a 150 rpm) durante 4h. Os extractos metanólicos combinados foram evaporados a 40 °C; o resíduo foi dissolvido novamente em metanol de modo a atingir-se uma concentração de 50 mg/ml e armazenado a 4 °C até utilização. Subsequentemente, foram preparadas várias concentrações dos extractos metanólicos a partir da solução inicial: 20, 10, 15, 5 mg/ml.

Os fenóis presentes nos extractos metanólicos foram determinados utilizando um método colorimétrico, baseado no protocolo descrito por Singleton & Rossi (1965) com algumas modificações. A amostra (1 ml) foi misturada com o reagente fenólico Follin Ciocalteu (1 ml). Após 3 minutos, adicionou-se solução saturada de carbonato de sódio (1 ml) e fez-se o volume da mistura com água destilada até 10 ml. A reacção foi mantida no escuro durante 90 minutos seguindo Barros *et. al.* (2008b), e a absorvância foi lida a 725 nm num

espectrofotómetro Analytikijena 200. Na construção da curva padrão utilizou-se ácido gálico (0,01-0,4 mM; $Y=2.8557X-0.0021$; $R^2=0.9999$) e os resultados foram apresentados em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de extracto.

2.3.2. Determinação de tocoferóis

A quantidade de tocoferóis presente nas amostras foi determinada seguindo um protocolo previamente otimizado e descrito por Barros *et al.* (2008a).

Uma solução de BHT (2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol) em hexano (10 mg/ml; 100 μ l) e o padrão interno (PI) de tocol em hexano (2,0 μ g/ml; 250 μ l) foram adicionados às amostras antes do procedimento de extracção. As amostras (~500 mg) foram homogeneizadas com metanol (4 ml) num vórtex (1 min). Subsequentemente, adicionou-se hexano (4 ml) e homogeneizou-se novamente no vórtex (1 min). De seguida, adicionou-se uma solução de NaCl (2 ml), homogeneizou-se a mistura (1 min), centrifugou-se (centrífuga refrigerada Centurion K24OR- 2003, 5 min, 6185 rpm) e transferiu-se, cuidadosamente, o sobrenadante para um frasco. A amostra foi extraída mais duas vezes com hexano. Os extractos foram levados à secura utilizando uma corrente de azoto, dissolvidos em 1ml de hexano, desidratados com sulfato de sódio anidro, filtrados através de um filtro (0,22 μ m), transferidos para frascos ambar e analisados no HPLC. O equipamento de HPLC utilizado foi um sistema integrado constituído por uma bomba (Smartline 1000; Knauer, Alemanha), um desgaseificador (Smartline 5000), um amostrador automático (AS-2057, Jasco, Japão) e um detector de fluorescência (FP-2020, Jasco) programado com os comprimentos de onda de 290 nm de excitação e 330 nm de emissão. Os resultados foram analisados através do programa Clarity 2.4 Software (DataApex). A separação cromatográfica foi feita com uma coluna de poliamida II (250 \times 4,6 mm) de fase normal (YMC Waters, Japão) a 30 °C (forno 7971 R Grace). A fase móvel era uma mistura de hexano e acetato de etilo (70:30, v/v) com um fluxo de 1 ml/min, e o volume injectado foi de 20 μ l.

Os compostos foram identificados através de comparação cromatográfica com padrões puros. A quantificação foi baseada na resposta do sinal fluorescente, usando o método do padrão interno. A quantidade de tocoferóis foi expressa em μ g por g de massa seca.

2.4. Avaliação da actividade antioxidante

2.4.1. Actividade bloqueadora de radicais DPPH

O efeito bloqueador de radicais livres de DPPH foi monitorizado de acordo com o método descrito por Hatano *et al.* (1988).

As várias concentrações dos extractos (0,3 ml) foram adicionadas a uma solução metanólica de DPPH (2,7 ml a uma concentração de 6×10^{-5} M). A mistura foi agitada vigorosamente e deixada no escuro durante 60 minutos (até estabilização dos valores de absorvância). A redução do radical DPPH foi avaliada medindo a absorvância a 517 nm. A actividade bloqueadora do radical (ABR) foi calculada pela percentagem de descoloração de DPPH utilizando a equação: $\% \text{ ABR} = [(A_{\text{DPPH}} - A_s) / A_{\text{DPPH}}] \times 100$, onde A_s é a absorvância da solução contendo a amostra de extracto de cada concentração em particular, e A_{DPPH} é a absorvância da solução de DPPH. A concentração de extracto correspondente a 50% de actividade bloqueadora de radicais (EC_{50}) foi calculada por interpolação no gráfico da % ABR em função da concentração de extracto. Os padrões usados foram BHA e α -tocoferol.

2.4.2. Poder redutor

O poder redutor foi determinado de acordo com o método de Oyaizu (1986).

As várias concentrações dos extractos (2,5 ml) foram misturadas com tampão fosfato de sódio (2,5 ml, 200 mM, pH 6,6) e ferricianeto de potássio (1% m/v, 2,5 ml). A mistura foi incubada a 50 °C durante 20 minutos. Após a adição de ácido tricloroacético (10%, 2,5 ml), a mistura foi centrifugada a 1000 rpm durante 8 minutos. Misturou-se o sobrenadante (5 ml) com água desionizada (5 ml) e cloreto de ferro (0,1%, 1 ml) e mediu-se a absorvância a 700 nm; absorvâncias elevadas indicam um maior poder redutor. A concentração de extracto correspondente a 0,5 de absorvância (EC_{50}) foi calculada por interpolação gráfica da absorvância a 700 nm em função da concentração de extracto. Os padrões usados foram BHA e α -tocoferol.

2.4.3. Inibição da descoloração do β -caroteno

A actividade antioxidante dos extractos metanólicos foi avaliada pelo sistema β -caroteno linoleato (Mi-Yae *et al.*, 2003). A solução de β -caroteno foi preparada por dissolução de β -

caroteno (2 mg) em clorofórmio (10 ml). Após remoção do clorofórmio da solução de β -caroteno (2 ml) por vácuo a 40 °C, adicionou-se ácido linoleico (40 mg), emulsificador Tween 80 (400 mg) e água destilada (100 ml), e agitou-se vigorosamente. Transferiram-se alíquotas (4,8 ml) desta emulsão para diferentes tubos de ensaio contendo diferentes concentrações (0,2 ml) dos extractos. Os tubos foram agitados e incubados num banho a 50 °C. Logo após a adição da emulsão a cada tubo, foi determinado o tempo zero de absorvância (470 nm). Foi preparado um branco, idêntico às amostras mas desprovido de β -caroteno. A inibição da peroxidação lipídica foi calculada usando a seguinte equação: $[(A_{470} \text{ após } 2h/A_{470} \text{ inicial}) \times 100]$. A concentração de extracto correspondente a 50% de actividade antioxidante (EC_{50}) foi calculada por interpolação gráfica da percentagem de actividade antioxidante em função da concentração de extracto. O padrão usado foi TBHQ.

2.5 Avaliação do valor nutricional

2.5.1. Determinação de macronutrientes

A composição em proteínas, lípidos, glícidos e cinzas foi analisada de acordo com os procedimentos oficiais de análise (AOAC, 1995) e expressa em g por 100 g de massa seca. A quantidade de proteínas ($N \times 4,38$) presente nas amostras foi estimada pelo método macro-Kjeldahl; a quantidade de lípidos foi determinada após extracção em soxlhet com éter de petróleo de uma massa conhecida de amostra; as cinzas foram determinadas por incineração a 600 ± 15 °C; os glícidos foram calculados por diferença: Glícidos = 100 - (g proteínas + g cinzas + g lípidos). A energia total foi calculada através da seguinte equação: Energia (Kcal) = $4 \times (\text{g proteínas} + \text{g glícidos}) + 9 \times (\text{g lípidos})$.

2.5.2. Determinação de açúcares livres

Adicionou-se o PI (frutose, 5 mg/ml) à amostra liofilizada (1g) e procedeu-se à extracção com 40 ml de etanol 80% a 80 °C durante 30 min. A suspensão resultante foi centrifugada a 15,000 g durante 10 min. O sobrenadante foi concentrado a 60 °C a baixa pressão e lavado 3 vezes sucessivas com 10 ml de éter etílico. Após concentração a 40 °C o resíduo sólido foi dissolvido em água num volume final de 5 ml, filtrado através de um filtro de 0,22 μm , transferido para um frasco ambar e analisado por HPLC.

O equipamento HPLC foi já descrito anteriormente utilizando-se, nesta análise, um detector de índice de refração (RID; Smartline 2300 Knauer, Alemanha). Os dados foram

analisados usando o software Clarity 2.4 (DataApex). A separação cromatográfica foi conseguida com uma coluna Eurospher 100-5 NH₂ (4,6 mm × 250 mm, 5 mm, Knauer) operando a 35 °C. A fase móvel usada foi acetonitrilo/água desionizada, 7:3 (v/v) a um fluxo de 1 ml/min; o volume de injeção foi de 20 µl. Os compostos foram identificados por comparação com padrões puros (mistura padrão de arabinose, manitol e trealose em água com a concentração final de 100 mg/ml). Os resultados foram expressos em g por 100 g de massa seca e calculados por normalização interna da área dos picos cromatográficos. Avaliou-se a linearidade e sensibilidade da análise, e efectuou-se a validação do método através da determinação da sua precisão, repetibilidade e recuperação, utilizando a amostra *Tricholoma imbricatum*.

2.5.3. Determinação de ácidos gordos

Os ácidos gordos foram determinados por cromatografia gasosa com um detector de ionização de chama (GC/FID) de acordo com o procedimento descrito por (Barros *et al.*, 2007b), após um processo de transesterificação: os ácidos gordos foram metilados com 5 ml de metanol:ácido sulfúrico:tolueno 2:1:1 (v:v:v), durante 12 h num banho a 50 °C e a 160 rpm. Adicionaram-se 3 ml de água desionizada para obter uma separação de fases; recuperou-se o FAME adicionando 3 ml de éter dietílico e agitando no vórtex. Fez-se passar o sobrenadante por uma microcoluna com sulfato de sódio anidro, com o objectivo de eliminar a água, e colocou-se a amostra num frasco com Teflon. Antes da injeção, filtrou-se a amostra com um filtro de nylon da Milipore 0,2 µm.

O equipamento utilizado foi um GC DANI 1000 com um injector *split/splitless*, um detector FID e uma coluna Macherey-Nagel (30 m × 0,32 mm ID × 0,25 µm *df*). A rampa de temperaturas utilizada foi: a temperatura inicial da coluna era 50 °C, permanecendo assim durante 2 min; seguiu-se um aumento de 10 °C/min até aos 240 °C durante 11 min. O fluxo do gás transportador (hidrogénio) foi de 4,0 ml/min (0,61 bar). Utilizou-se um modo de injeção *split* (1:40) a 250 °C. O volume de amostra injectado foi de 1 µl. A identificação dos ácidos gordos foi feita por comparação dos tempos de retenção relativos das amostras com os picos do FAME (padrões). Os resultados foram processados usando o software CSW 1.7 (DataApex 1.7) e expressos em percentagem relativa de cada ácido gordo.

2.6. Análise estatística

Para cada espécie de cogumelo, analisaram-se três amostras e fizeram-se todos os ensaios em triplicado. Os resultados foram expressos em valores médios \pm desvio padrão (SD) ou erro padrão (SE). As diferenças estatísticas, representadas por letras, foram obtidas pela análise da variância (ANOVA) seguida de um teste de Tukey com $\alpha=0.05$. Este tratamento foi efectuado utilizando o software SPSS v. 16.0.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Determinação de antioxidantes

Os compostos fenólicos são produtos naturais derivados do metabolismo secundário, produzidos nas vias do xiquimato e do acetato. Podem ser moléculas relativamente simples (ácidos fenólicos, fenilpropanóides, flavonóides) ou compostos altamente polimerizados (lenhina, melaninas, taninos). Os flavonóides representam o subgrupo mais comum e mais amplamente distribuído (Bravo, 1998). O método de Folin-Ciocalteu é usado para avaliar a concentração de fenóis totais; no entanto, este ensaio pode sofrer algumas interferências já que o reagente (mistura de ácido fosfotúngstico e ácido fosfomolibdico) também reage com outros compostos redutores não fenólicos (ácido ascórbico e outras substâncias redutoras, tais como alguns açúcares e aminoácidos), levando a uma sobrevalorização do conteúdo de compostos fenólicos (George *et al.*, 2005). Existem vários estudos que descrevem a determinação de fenóis totais em cogumelos através do ensaio Folin-Ciocalteu (Ferreira *et al.*, 2009 e referências citadas). O papel dos antioxidantes fenólicos é interromper a cadeia de reacções de peroxidação de acordo com a seguinte reacção:



Para ser eficaz ArO^\bullet deve ser um radical livre relativamente estável de modo a reagir lentamente com o substrato RH, mas rapidamente com o substrato RO_2^\bullet , daí o termo “antioxidante que interrompe a cadeia” (Wright *et al.*, 2001). Para além deste efeito directo, os compostos fenólicos podem exercer outras actividades não relacionadas com a sua capacidade bloqueadora de radicais livres. Essas actividades envolvem interacções receptor-ligando e incluem anti-proliferação, regulação do ciclo celular e indução de apoptose. A actividade dos compostos fenólicos como agentes preventivos deve ser analisada em diferentes ângulos para se perceber não só a sua actividade antioxidante mas também a influência do ambiente físico-químico na sua eficácia antioxidante e a ocorrência de outras actividades biológicas (Faria *et al.*, 2006).

Apesar das plantas serem consideradas as fontes mais significativas de compostos fenólicos, fornecendo grandes quantidades destes fitoquímicos, os cogumelos também devem ser considerados fontes importantes.

Neste trabalho, foi possível concluir que as espécies *Hygrophoropsis aurantiaca* e *Suillus mediterraneensis* apresentaram os valores mais elevados de fenóis totais (superiores a 7 mg/g), enquanto que as espécies *Lactarius aurantiacus* e *Hydnum repandum* revelaram os valores mais baixos (inferiores a 0,6 mg/g) (Tabela 2).

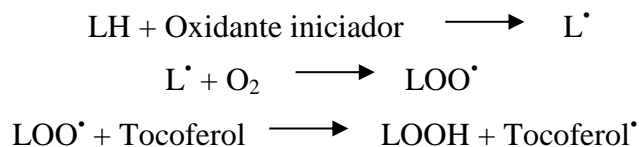
Tabela 2. Rendimentos de extracção (η) e concentrações de fenóis totais em amostras de cogumelos (media \pm SD; n=3 para o rendimento e n=9 para os fenóis). Em cada coluna, letras diferentes representam diferenças significativas entre os resultados ($p < 0,05$).

Espécies de cogumelos	η (%)	Fenóis totais (mg EAG/g)
<i>Clitocybe alexandri</i>	47,74 \pm 5,34 b	1,53 \pm 0,06 j
<i>Cortinarius glaucopus</i>	34,00 \pm 3,24 cd	2,80 \pm 0,36 gh
<i>Fistulina hepática</i>	71,00 \pm 5,76 a	4,44 \pm 0,06 cd
<i>Hydnum repandum</i>	32,57 \pm 2,67 cde	0,51 \pm 0,02 k
<i>Hygrophoropsis aurantiaca</i>	31,90 \pm 2,98 cde	7,90 \pm 0,29 a
<i>Hypholoma capnoides</i>	38,96 \pm 3,08 bc	1,71 \pm 0,01 ij
<i>Laccaria amethystina</i>	23,53 \pm 2,14 ef	2,85 \pm 0,24 gh
<i>Laccaria laccata</i>	21,04 \pm 1,97 f	1,59 \pm 0,02 ij
<i>Lactarius aurantiacus</i>	21,29 \pm 1,67 f	0,58 \pm 0,03 k
<i>Lactarius salmonicolor</i>	26,42 \pm 0,98 def	4,14 \pm 0,26 cde
<i>Lepista inversa</i>	38,98 \pm 1,89 bc	3,60 \pm 0,07 ef
<i>Lepista sórdida</i>	38,34 \pm 2,56 bc	4,10 \pm 0,20 de
<i>Mycena rosea</i>	25,13 \pm 2,40 def	3,56 \pm 0,37 ef
<i>Russula delica</i>	44,87 \pm 3,61 b	2,23 \pm 0,18 hi
<i>Russula vesca</i>	25,71 \pm 1,32 def	6,61 \pm 0,36 b
<i>Suillus collinitus</i>	77,41 \pm 5,78 a	3,16 \pm 0,14 fg
<i>Suillus mediterraneensis</i>	26,96 \pm 2,07 def	7,46 \pm 0,21 a
<i>Tricholoma sulphureum</i>	38,28 \pm 3,05 bc	4,76 \pm 0,19 c

De acordo com os valores do conteúdo em fenóis, a análise ANOVA indicou uma elevada heterogeneidade nas diferentes espécies de cogumelos. De facto, a composição fenólica nos cogumelos pode ser afectada por uma série de factores: espécie, composição do meio de crescimento (para espécies cultivadas *in vitro*), tempo de colheita, técnicas de manipulação e condições de maneo, preparação dos substratos (no caso de espécies cultivadas), composição do solo/substrato e/ou espécies hospedeiras associadas (no caso de espécies silvestres saprotróficas ou micorrízicas). Todos estes factores podem ter uma influência no metabolismo secundário dos fungos, incluindo as vias do acetato e do xiquimato e, portanto, na produção de fenóis. Assim, os maiores valores de fenóis encontrados nas espécies *Hygrophoropsis aurantiaca*, *Suillus mediterraneensis* e *Russula vesca*, podem dever-se a condições de maior stress durante o seu crescimento que estimularam o metabolismo secundário.

Foi já descrito que os principais compostos fenólicos presentes em cogumelos são ácidos fenólicos (Ferreira *et al.*, 2009). Em particular, foi já descrita a presença dos ácidos *p*-cumárico, caféico e elágico em *Fistulina hepatica*, assim como de ácido protocatecuico, gálico, gentísico, vanílico, siríngico, cinâmico e tânico em *Hydnum repandum*.

A vitamina E reage com os radicais peróxido produzidos a partir de ácidos gordos polinsaturados da membrana fosfolipídica ou de lipoproteínas, produzindo um hidroperóxido lipídico estável. Actua como antioxidante doando um átomo de hidrogénio aos radicais peróxido das moléculas lipídicas insaturadas, formando um hidroperóxido e um radical tocoferoxilo, que reage com um outro radical peróxido ou tocoferilo formando complexos mais estáveis (Lampi *et al.*, 1999).



Existem na literatura estudos sobre a composição em tocoferóis de cogumelos da Índia: *Cantharellus cibarius* e *Pleurotus ostreatus* (Jayakumar *et al.*, 2009), Taiwan: *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea*, *Auricularia mesenterica*, *Auricularia fuscusuccinea* (castanha), *Auricularia fuscusuccinea* (branca), *Auricularia polytricha*, *Boletus edulis*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma tsugae*, *Grifola frondosa*, *Hericium erinaceus*,

Hypsizigus marmoreus, *Lentinula edodes*, *Morchella esculenta*, *Pleurotus cystidiosus*, *Pleurotus ostreatus*, *Termitomyces albuminosus*, *Tremella fuciformis* and *Tricholoma giganteum* (Mau *et al.*, 2001; Mau *et al.*, 2002a; Mau *et al.*, 2002b; Yang *et al.*, 2002; Mau *et al.*, 2004; Tsai *et al.*, 2007) e Turquia: *Agaricus bisporus*, *Boletus badius*, *Lepista nuda*, *Pleurotus ostreatus*, *Polyporus squamosus*, *Russula delica* e *Verpa conica* (Elmastas *et al.*, 2007). Os estudos feitos em cogumelos portugueses (*Agaricus arvensis*, *Agaricus bisporus*, *Agaricus romagnesii*, *Agaricus silvaticus*, *Agaricus silvicola*, *Boletus edulis*, *Calocybe gambosa*, *Cantharellus cibarius*, *Craterellus cornucopioides*, *Hypholoma fasciculare*, *Lepista nuda*, *Lycoperdon molle*, *Lycoperdon perlatum*, *Marasmius oreades*, *Ramaria botrytis* e *Tricholoma acerbum*) pertencem ao nosso grupo de trabalho (Ferreira *et al.*, 2009).

A tabela 3 apresenta a composição em tocoferóis de 18 amostras de diferentes espécies de cogumelos silvestres de Portugal.

Tabela 3. Composição em tocoferóis ($\mu\text{g/g}$) das amostras de cogumelos (média \pm SD; n=3). Em cada coluna letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Espécies de cogumelos	α -tocoferol	β -tocoferol	γ -tocoferol	δ - tocoferol	Total
<i>Clitocybe alexandri</i>	0,04 \pm 0,00 gfh	2,17 \pm 0,22 c	1,34 \pm 0,11 a	nd	3,55 \pm 0,33 c
<i>Cortinarius glaucopus</i>	0,11 \pm 0,01 ed	0,29 \pm 0,04 gifh	0,52 \pm 0,04 ed	nd	0,92 \pm 0,09 feg
<i>Fistulina hepatica</i>	0,12 \pm 0,01 d	1,73 \pm 0,09 d	0,41 \pm 0,03 edf	nd	2,26 \pm 0,13 d
<i>Hydnum repandum</i>	nd	nd	0,51 \pm 0,08 ed	nd	0,51 \pm 0,08 h
<i>Hygrophoropsis aurantiaca</i>	0,20 \pm 0,01 cb	0,44 \pm 0,03 gf	1,08 \pm 0,04 b	0,21 \pm 0,02 b	1,94 \pm 0,10 d
<i>Hypholoma capnoides</i>	0,17 \pm 0,00 c	0,19 \pm 0,01 gijh	0,35 \pm 0,02 f	nd	0,71 \pm 0,03 hg
<i>Laccaria amethystina</i>	0,05 \pm 0,00 gf	1,09 \pm 0,11 e	0,83 \pm 0,07 c	nd	1,98 \pm 0,04 d
<i>Laccaria laccata</i>	0,22 \pm 0,01 b	7,06 \pm 0,17 a	0,57 \pm 0,03 d	0,19 \pm 0,01 b	8,04 \pm 0,20 a
<i>Lactarius aurantiacus</i>	0,03 \pm 0,00 gfh	nd	1,21 \pm 0,10 ba	nd	1,24 \pm 0,10 e
<i>Lactarius salmonicolor</i>	0,04 \pm 0,00 gfh	0,11 \pm 0,02 ij	nd	nd	0,15 \pm 0,03 i
<i>Lepista inversa</i>	0,28 \pm 0,06 a	0,25 \pm 0,03 gifh	nd	0,64 \pm 0,03 a	1,18 \pm 0,06 fe
<i>Lepista sordida</i>	0,02 \pm 0,00 gfh	nd	nd	nd	0,02 \pm 0,00 i
<i>Mycena rosea</i>	0,11 \pm 0,01 d	3,86 \pm 0,15 b	0,92 \pm 0,07 c	nd	4,89 \pm 0,21 b
<i>Russula delica</i>	0,01 \pm 0,00 gh	0,16 \pm 0,02 ijh	0,57 \pm 0,07 d	nd	0,74 \pm 0,06 hg
<i>Russula vesca</i>	0,02 \pm 0,00 gfh	0,49 \pm 0,04 f	0,36 \pm 0,04 ef	nd	0,88 \pm 0,05 fg
<i>Suillus collinitus</i>	0,06 \pm 0,00 ef	0,22 \pm 0,01 gijh	0,55 \pm 0,01 d	nd	0,83 \pm 0,03 fhg
<i>Suillus mediterraneensis</i>	0,04 \pm 0,00 gfh	0,07 \pm 0,00 ij	nd	nd	0,11 \pm 0,01 i
<i>Tricholoma sulphureum</i>	0,06 \pm 0,00 gf	0,40 \pm 0,03 gfh	0,07 \pm 0,01 g	nd	0,52 \pm 0,03 h

nd- não detectado

A espécie *Lepista inversa* revelou a maior concentração em α -tocoferol (0,28 $\mu\text{g/g}$). O β -Tocoferol foi a forma de vitamina E mais abundante em todas as espécies analisadas, sendo os maiores valores encontrados na espécie *Laccaria laccata* (7,06 $\mu\text{g/g}$). A espécie *Clitocybe alexandri* apresentou a maior concentração em γ -tocoferol (1,34 $\mu\text{g/g}$). O δ -Tocoferol foi encontrado apenas em 3 espécies (*Lepista inversa*, *Hygrophoropsis aurantiaca* and *Laccaria laccata*). Até à data, esta forma de vitamina E tinha sido encontrada somente em espécies provenientes de Taiwan e não em espécies portuguesas, indianas ou turcas (Ferreira *et al.*, 2009). Globalmente, a espécie *Laccaria laccata* revelou os maiores valores de tocoferóis (8,04 $\mu\text{g/g}$). A presença de α -tocoferol em *Russula delica* proveniente da Turquia tinha já sido descrita (Elmastas *et al.*, 2007) mas, no presente trabalho, detectaram-se e quantificaram-se as quatro formas de vitamina E (tocoferóis α , β , γ e δ), tal como se pode observar na Figura 4.

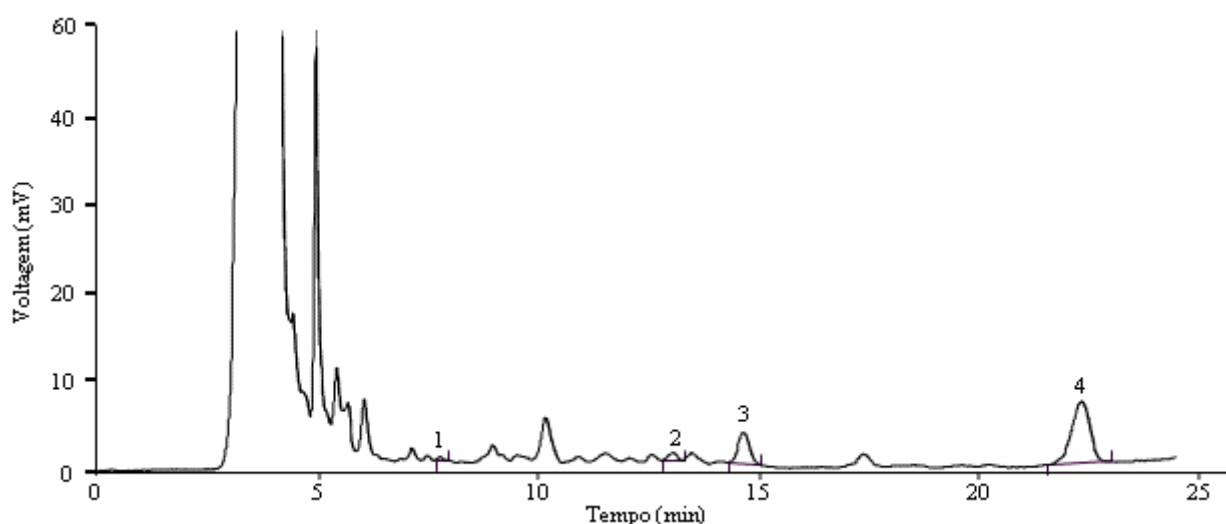


Figura 4. Cromatograma individual de tocoferóis da espécie *Russula delica*. 1) α -tocoferol; 2) β -tocoferol; 3) γ -tocoferol; 4) Tocol (PI).

3.2. Avaliação da actividade antioxidante

Não existindo um método universal capaz de avaliar com precisão a capacidade antioxidante de todas as amostras, avaliaram-se as propriedades antioxidantes das 18 espécies de cogumelos através de diferentes ensaios: actividade bloqueadora de radicais livres DPPH, poder redutor e inibição da peroxidação lipídica no sistema β -caroteno linoleato. O efeito bloqueador de radicais livres foi examinado pela capacidade de diminuição da absorvância a 517 nm da solução de DPPH (Figura 5).

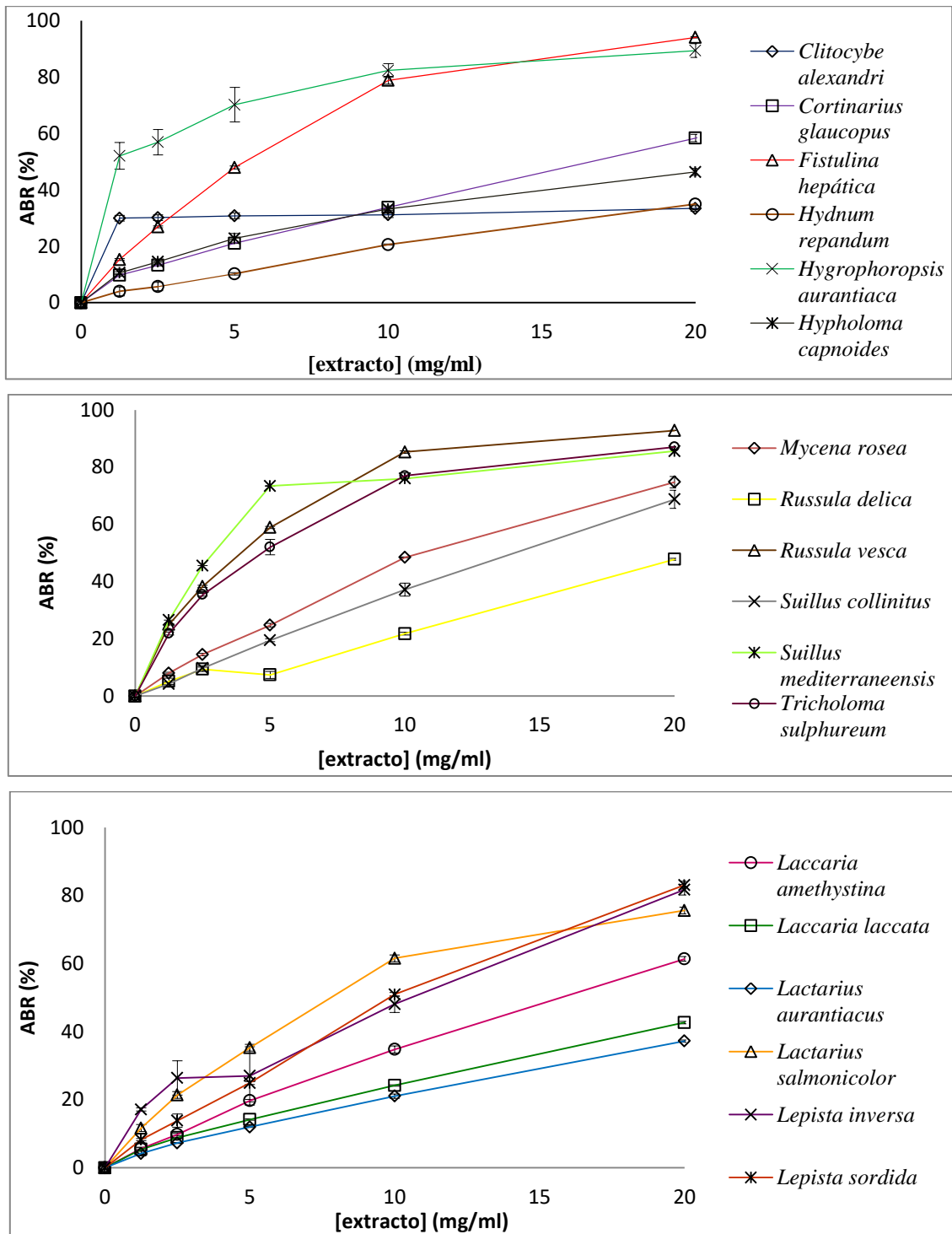


Figura 5. Actividade bloqueadora de radicais de DPPH (%) das amostras de cogumelos (médias \pm SE, n=3).

O poder redutor foi avaliado medindo a conversão do Fe^{3+} /complexo de ferricianeto à sua forma ferrosa pelas amostras (Figura 6).

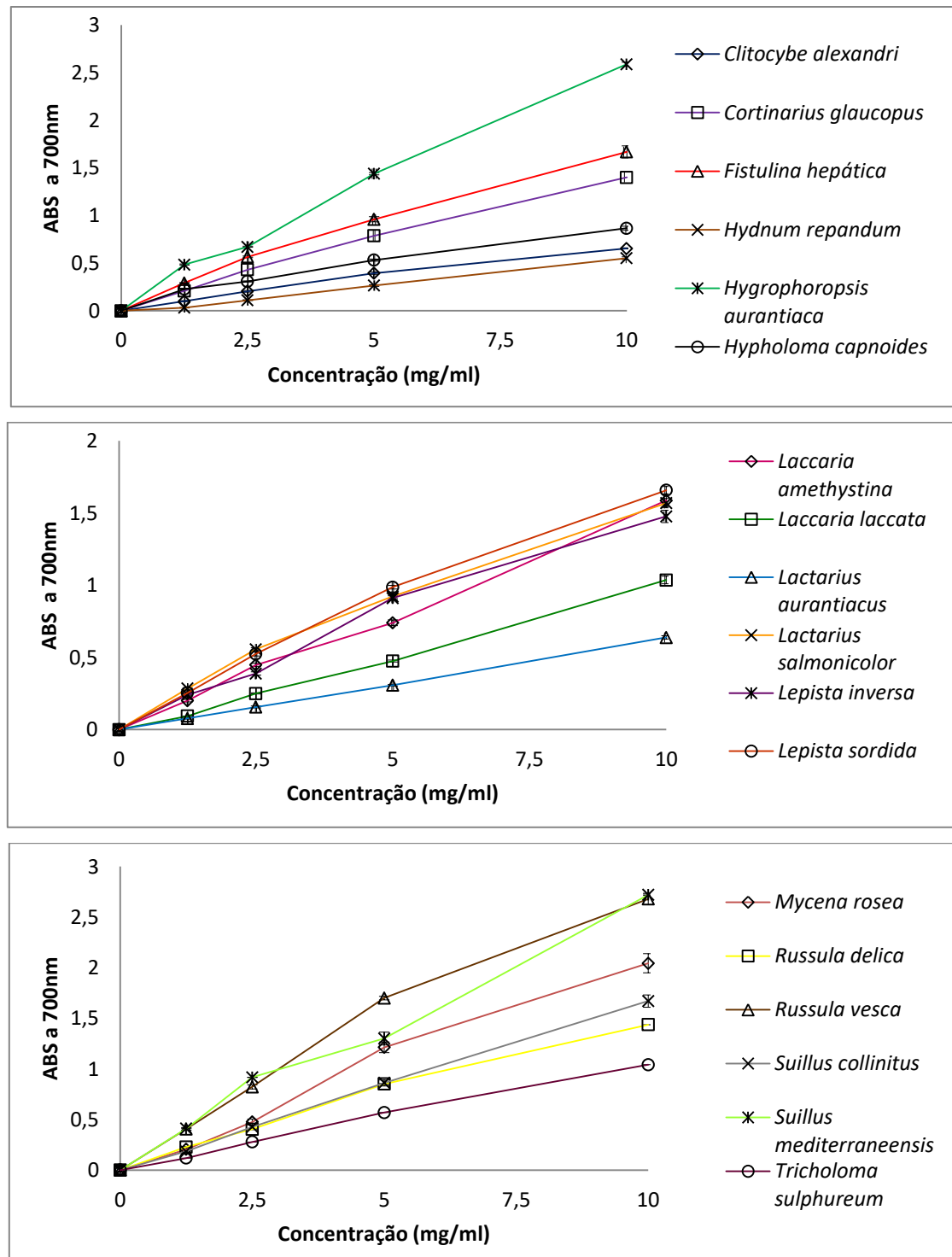


Figura 6. Poder redutor das amostras de cogumelos (média \pm SE, n=3).

A inibição da peroxidação lipídica foi avaliada pela inibição da descoloração do β -caroteno, neutralizando o radical livre linoleato e outros radicais livres formados no sistema que atacam as moléculas insaturadas de β -caroteno (Figura7).

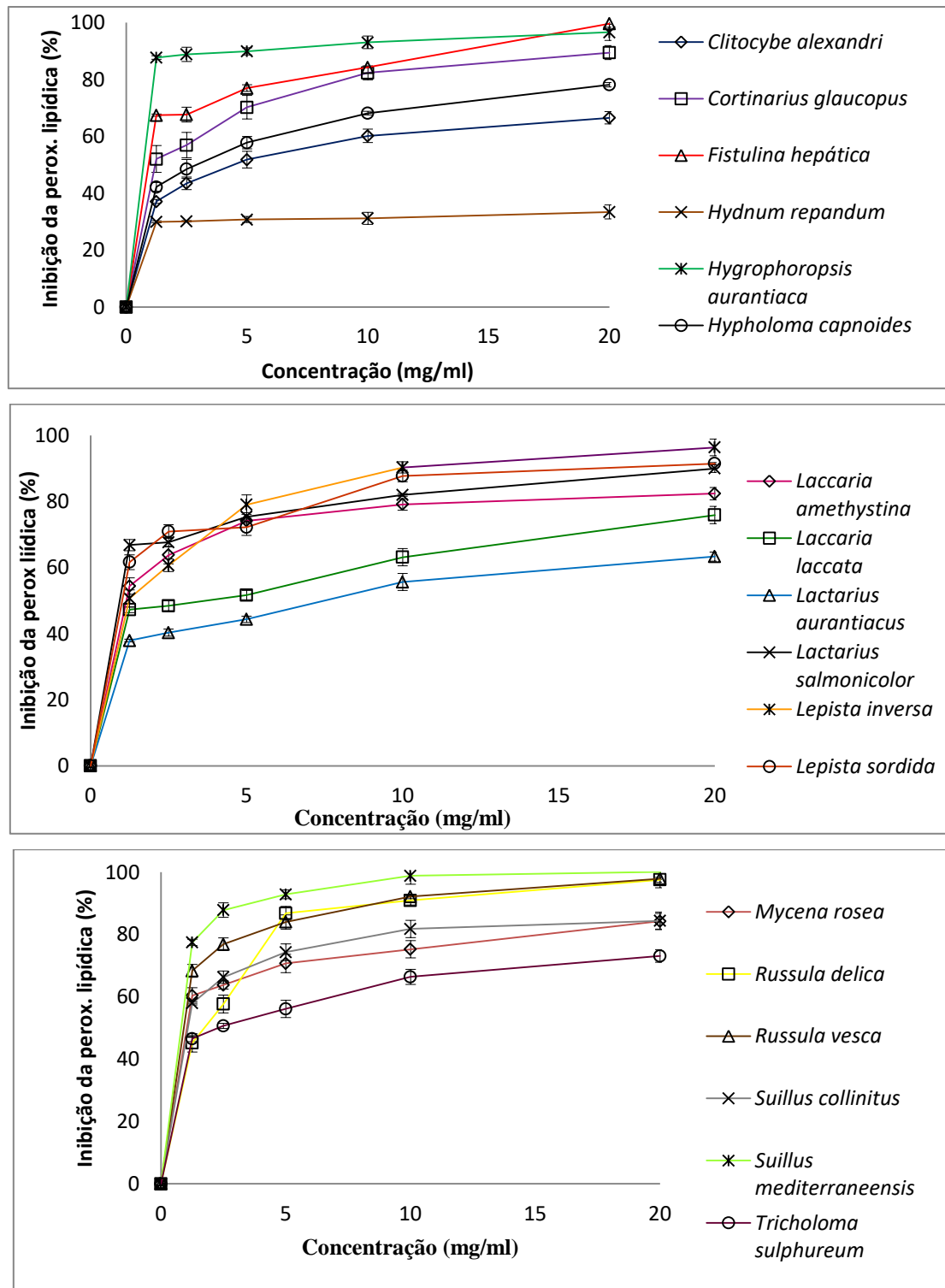


Figura 7. Capacidade de inibição da peroxidação lipídica das amostras de cogumelos, medida pela inibição da descoloração do β -caroteno (média \pm SE, n=3).

A partir da análise das Figuras 5-7 foi possível concluir que o efeito antioxidante aumenta com o aumento da concentração dos extractos, sendo diferente para cada espécie de macrofungo.

Para uma visão global dos resultados, a Tabela 4 apresenta os valores de EC₅₀ (mg/ml) obtidos para os ensaios da actividade bloqueadora de radicais DPPH, poder redutor e inibição da peroxidação lipídica. Os resultados são expressos por mg de extracto, contudo, quando os rendimentos de extracção são considerados (Tabela 2), e os resultados são expressos por mg de cogumelo, os valores da actividade antioxidante são diferentes. No entanto, no presente estudo optamos por comparar os resultados por mg de extracto uma vez que nem todos os cogumelos são comestíveis ou tradicionalmente consumidos.

Tabela 4. Actividade antioxidante (valores de EC₅₀, mg/ml) das amostras de cogumelos (média ± SD, n=3). Em cada coluna letras diferentes representam diferenças significativas (p<0,05).

Espécies de cogumelos	ABR	Poder redutor	Inibição perox. Lipídica
<i>Clitocybe alexandri</i>	28,72 ± 0,32 b	7,01 ± 0,04 c	4,45 ± 0,02 c
<i>Cortinarius glaucopus</i>	16,59 ± 0,28 f	3,04 ± 0,01 g	1,73 ± 0,01 g
<i>Fistulina hepatica</i>	5,32 ± 0,07 m	2,24 ± 0,01 n	0,94 ± 0,00 n
<i>Hydnum repandum</i>	30,00 ± 0,30 a	9,07 ± 0,05 a	28,72 ± 0,20 a
<i>Hygrophoropsis aurantiaca</i>	1,20 ± 0,02 q	1,34 ± 0,01 r	0,71 ± 0,01 r
<i>Hypholoma capnoides</i>	20,85 ± 0,22 d	4,64 ± 0,02 e	2,90 ± 0,02 e
<i>Laccaria amethystina</i>	15,72 ± 0,18 g	3,03 ± 0,01 h	1,23 ± 0,02 h
<i>Laccaria laccata</i>	21,95 ± 0,20 c	5,22 ± 0,03 d	3,69 ± 0,03 d
<i>Lactarius aurantiacus</i>	30,00 ± 0,31 a	7,91 ± 0,06 b	7,48 ± 0,05 b
<i>Lactarius salmonicolor</i>	7,80 ± 0,05 l	2,39 ± 0,01 m	1,01 ± 0,01 m
<i>Lepista inversa</i>	10,57 ± 0,11 j	2,92 ± 0,01 k	1,08 ± 0,01 k
<i>Lepista sordida</i>	9,82 ± 0,08 k	2,58 ± 0,01 l	1,03 ± 0,00 l
<i>Mycena rosea</i>	10,58 ± 0,09 i	2,94 ± 0,02 j	1,15 ± 0,01 j
<i>Russula delica</i>	20,53 ± 0,18 e	4,41 ± 0,03 f	2,28 ± 0,02 f
<i>Russula vesca</i>	3,91 ± 0,03 o	1,53 ± 0,01 p	0,91 ± 0,00 p
<i>Suillus collinitus</i>	14,05 ± 0,12 h	2,97 ± 0,02 i	1,20 ± 0,01 i
<i>Suillus mediterraneensis</i>	2,90 ± 0,01 p	1,47 ± 0,01 q	0,81 ± 0,00 q
<i>Tricholoma sulphureum</i>	4,69 ± 0,03 n	2,19 ± 0,02 o	0,93 ± 0,00 o

ABR- Actividade bloqueadora de radicais DPPH; Inibição da peroxidação lipídica em soluções de lipossomas.

As espécies *Hygrophoropsis aurantiaca*, *Suillus mediterraneensis*, *Russula vesca* e *Tricholoma sulphureum* apresentaram uma actividade bloqueadora de radicais (ABR) DPPH superior a 85% a 20 mg/ml (Figura 5) com valores de EC₅₀ inferiores a 5 mg/ml (Tabela 4). *Russula delica*, *Hypholoma capnoides*, *Laccaria laccata*, *Clitocybe*

alexandri, *Lactarius aurantiacus* e *Hydnum repandum* apresentaram valores elevados de EC₅₀ (superiores a 20 mg/ml) com percentagens de ABR inferiores a 48% a 20 mg/ml. As espécies *Hygrophoropsis aurantiaca*, *Suillus mediterraneensis* e *Russula vesca* foram as que revelaram maior poder redutor (absorvância superior a 2,5 a 10 mg/ml; Figura 6). As espécies *Clitocybe alexandri*, *Lactarius aurantiacus* e *Hydnum repandum* apresentaram o menor poder redutor com absorvâncias inferiores a 0,7 a 10 mg/ml. Considerando os resultados obtidos para a inibição da peroxidação lipídica, *Hygrophoropsis aurantiaca*, *Suillus mediterraneensis*, *Russula vesca*, *Tricholoma sulphureum* e *Fistulina hepatica* foram as espécies com maior capacidade (superior a 73% a 20 mg/ml; Figura 7), com valores de EC₅₀ inferiores a 1 mg/ml (Tabela 4). A espécie *Hydnum repandum* apresentou o maior valor de EC₅₀ (29 mg/ml) com 33% de capacidade de inibição da peroxidação lipídica a 20 mg/ml.

As propriedades antioxidantes demonstradas pelas diferentes espécies de cogumelos estão de acordo com o teor de fenóis encontrados em cada uma dessas espécies (Tabela 2). A espécie *Hygrophoropsis aurantiaca* foi a espécie mais promissora apresentando o valor mais elevado de fenóis bem como a melhor actividade antioxidante (menores valores de EC₅₀). Esta espécie apresentou também todas as isoformas do tocoferol (Figura 4). A espécie *Hydnum repandum* apresentou a menor concentração em fenóis e os maiores valores de EC₅₀ para a actividade antioxidante. Das 18 espécies apenas 2 tinham sido avaliadas anteriormente pelas suas propriedades antioxidantes: *Hydnum repandum* e *Russula delica*. No entanto, estas espécies não eram oriundas de Portugal, mas sim de Espanha (Murcia *et al.*, 2002) e Turquia (Elmastas *et al.*, 2007), respectivamente.

Este estudo contribui para o aumento da proporção de espécies de cogumelos estudadas e demonstra o potencial nutracêutico de cogumelos silvestres, derivado da sua actividade bloqueadora de radicais livres e capacidade de inibição da peroxidação lipídica. As espécies estudadas são fontes de importantes antioxidantes poderosos como fenóis e tocoferóis, que podem ser utilizados no combate a doenças relacionadas com o stress oxidativo, em aplicações dermatológicas, na cosmética, assim como em suplementos na indústria alimentar.

3.3. Avaliação do valor nutricional

3.3.1. Composição em macronutrientes

Foi avaliada a composição em macronutrientes e o valor energético de dez espécies de cogumelos silvestres (Tabela 5). A escolha das espécies a estudar dependeu da quantidade de amostra disponível para as análises referidas.

Tabela 5. Composição em macronutrientes (g/100 g) e valor energético (Kcal/100 g) das amostras de cogumelos (média \pm SD; n=3). Em cada coluna e para cada espécie, letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Amostras	Humidade	Lípidos	Proteínas	Cinzas	Glícidos	Açúcares redutores	Energia
<i>Cortinarius glaucopus</i>	91,67 \pm 0,31 a	1,89 \pm 0,15 c	50,09 \pm 0,65 c	16,40 \pm 0,12 c	31,62 \pm 0,73 e	2,22 \pm 0,17 de	343,84 \pm 0,05 d
<i>Fistulina hepatica</i>	87,51 \pm 0,98 f	2,63 \pm 0,49 cb	63,69 \pm 1,16 b	11,30 \pm 0,53 d	22,98 \pm 0,43 f	2,77 \pm 0,06 c	364,98 \pm 2,16 c
<i>Hygrophoropsis aurantiaca</i>	84,59 \pm 1,27 h	2,20 \pm 0,11 cb	36,40 \pm 0,60 d	5,92 \pm 0,06 e	55,48 \pm 0,52 a	1,77 \pm 0,30 e	387,32 \pm 0,25 a
<i>Hypholoma capnoides</i>	83,57 \pm 2,08 i	0,36 \pm 0,05 d	36,36 \pm 0,21 d	28,29 \pm 2,51 a	34,99 \pm 2,42 ed	2,06 \pm 0,13 e	288,64 \pm 10,05 f
<i>Laccaria laccata</i>	88,25 \pm 1,86 c	3,76 \pm 0,58 a	62,78 \pm 1,07 b	20,69 \pm 1,50 b	12,77 \pm 0,78 g	2,75 \pm 0,36 c	336,08 \pm 6,88 d
<i>Lactarius salmonicolor</i>	87,72 \pm 0,94 e	2,03 \pm 0,36 cb	37,28 \pm 0,11 d	23,28 \pm 1,41 b	37,41 \pm 1,42 d	2,72 \pm 0,34 c	317,05 \pm 5,85 e
<i>Lepista inversa</i>	87,73 \pm 1,01 d	2,48 \pm 0,21 cb	76,63 \pm 0,46 a	10,54 \pm 0,07 d	10,35 \pm 0,45 g	3,39 \pm 0,11 b	370,24 \pm 0,77 bc
<i>Russula delica</i>	86,69 \pm 0,73 g	0,91 \pm 0,16 d	50,59 \pm 1,02 c	22,93 \pm 2,16 b	25,57 \pm 1,32 f	4,44 \pm 0,48 a	312,81 \pm 9,15 e
<i>Suillus mediterraneensis</i>	91,20 \pm 1,85 b	2,61 \pm 0,49 b	24,32 \pm 0,35 e	27,64 \pm 0,80 a	45,42 \pm 1,34 b	3,27 \pm 0,43 b	302,48 \pm 1,49 fe
<i>Tricholoma imbricatum</i>	82,42 \pm 1,15 j	1,88 \pm 0,11 c	50,45 \pm 0,83 c	6,45 \pm 0,27 e	41,21 \pm 0,56 c	2,64 \pm 0,20 dc	383,61 \pm 1,44 ba

A humidade variou entre 82,42 g/100 g de massa fresca (*Tricholoma Imbricatum*) e 91,67 g /100 g (*Cortinarius glaucopus*). A quantidade de proteínas encontrada foi elevada e variou entre 24,32 g/100 g (*Suillus mediterraneensis*) e 76,63 g/100 g (*Lepista inversa*). As principais proteínas presentes em cogumelos são albuminas (24,8%), globulinas (11,5%), análogos de glutelina (7,4%), glutelinas (11,5%), prolaminas (5,7%) e análogos de prolaminas (5,3%) (Kalač, 2009). Diversos autores referem os cogumelos como boas fontes de aminoácidos essenciais tais como leucina, valina, treonina, lisina, metionina e triptofano. Leucina e valina são os aminoácidos essenciais mais abundantes em cogumelos correspondendo a 25-40% dos aminoácidos totais (Mdachi *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2007). As proteínas presentes em cogumelos silvestres contêm também quantidades consideráveis de aminoácidos não-essenciais, tais como alanina, arginina, glicina, ácido glutâmico, ácido aspártico, prolina e serina. Estes aminoácidos têm uma função estrutural nas células, tecidos e órgãos sendo, portanto, essenciais para o crescimento e reparação (Léon-Guzmán *et al.*, 1997). A quantidade de lípidos variou entre 0,36 g/100 g em *Hypholoma capnoides* e 3,76 g/100 g em *Laccaria laccata*.

Os cogumelos são reconhecidos como uma excelente escolha para dietas pouco energéticas/calóricas devido ao seu elevado teor em água e baixo teor em gordura (~2-8% da matéria seca). Exemplos de lípidos encontrados em cogumelos incluem ácidos gordos livres, mono-, di- e triglicerídeos, esteróis, ésteres de esteróis e fosfolípidos (Manzi *et al.*, 1999).

Os glúcidos, calculados por diferença, foram também encontrados em elevadas concentrações e variaram entre 10,35 g/100 g (*Lepista inversa*) e 55,48 g /100 g (*Hygrophoropsis aurantiaca*). Estes resultados estão de acordo com outros autores que descreveram concentrações de glúcidos entre 3 e 65% de matéria seca (Manzi *et al.*, 1999). Os açúcares redutores são apenas uma pequena parte do conteúdo total de glúcidos uma vez que os cogumelos silvestres são ricos em polissacarídeos (fibra ~3-32% da matéria seca), como glicogénio (polissacarídeo de reserva em animais e fungos), β -glucano e quitina (polímeros estruturais) (Kalač, 2009).

A grande variedade e abundância de minerais são as características mais importantes dos fungos, superando as plantas agrícolas, legumes e frutas (Manzi *et al.*, 2001). O teor em cinzas variou entre 5,92 g/100 g em *Hygrophoropsis aurantiaca* e 28,29 g/100 g em *Hypholoma capnoides*. De entre todas as espécies estudadas, apenas a composição química das espécies *Fistulina hepatica* e *Russula delica* tinha sido já descrita (Ouzouni

et al., 2009) sendo, no entanto, provenientes de países diferentes de Portugal. Apesar de ser a mesma espécie, as nossas amostras apresentaram maiores níveis de proteínas e menor concentração de glícidos e lípidos. Sabe-se que a composição química dos cogumelos é afectada por uma série de factores, nomeadamente espécie, composição do meio de crescimento (para espécies cultivadas *in vitro*), tempo de colheita, técnicas de manutenção, condições de armazenamento e preparação de substratos (no caso de espécies cultivadas) (Manzi *et al.*, 2001), e composição do solo/substrato ou espécies hospedeiras associadas no caso de espécies silvestres saprófitas ou micorrízicas. Foi ainda calculada a contribuição energética das diferentes espécies e, os valores mais elevados, foram obtidos para *Hygrophoropsis aurantiaca*, enquanto que *Hypholoma capnoides* apresentou a menor contribuição energética (Tabela 5).

3.3.2. Composição em açúcares

A validação do método de análise de açúcares incluiu avaliação da linearidade e determinação de limites de detecção e quantificação (Tabela 6). Para cada composto, foi construída uma curva de calibração com 7 níveis representada pela razão entre as áreas dos picos dos padrões de açúcares e do padrão interno em função da razão das concentrações dos padrões e do padrão interno. Foi utilizada a média das determinações em triplicado para cada nível. Utilizou-se frutose como padrão interno porque não foi detectada em nenhuma das espécies de cogumelos analisadas. Um padrão interno deve ser similar à substância a ser quantificada, ter um tempo de retenção próximo, mas diferente, não reagir nenhum dos componentes presentes na matriz, e não estar presente na amostra (Snyder *et al.*, 1997); a frutose apresentou todas estas características. A validação do método foi realizada utilizando manitol e trealose porque estes açúcares foram detectados em todas as amostras analisadas; a sua presença foi também descrita para outras espécies (Kalač, 2009; Barros *et al.*, 2007a; Barros *et al.*, 2008b; Barros *et al.*, 2008c).

Tabela 6. Características analíticas do método de análise de açúcares.

	R_t (tempo de retenção)		Coeficiente de correlação (r^2)	Intervalo de linearidade (mg/ml)	Limite	
	min	CV, % (n=10)			LOD (mg/ml)	LOQ (mg/ml)
Frutose (PI)	6,041	0,13	-	-	-	-
Manitol	6,470	0,31	0,9997	0,3 – 80,0	0,07	0,22
Trealose	8,672	0,58	0,9997	0,3 – 80,0	0,07	0,24

Os coeficientes de correlação foram sempre superiores a 0,999 para todos os compostos (Tabela 6). Os limites de detecção (LOD), calculados como a concentração correspondente a três vezes o erro de calibração dividido pelo declive, foram 0,07 mg/ml. Os limites de quantificação (LOQ) foram calculados utilizando a concentração correspondente a 10 vezes o erro de calibração dividido pelo declive, variaram entre 0,22 mg/ml a 0,24 mg/ml.

Com o objectivo de avaliar a precisão instrumental, injectou-se seis vezes o extracto de *Tricholoma imbricatum*. O método cromatográfico provou ser preciso (CV% entre 0,82% e 1,47%, Tabela 7).

Tabela 7. Parâmetros de validação do método usando *Tricholoma imbricatum*.

	Precisão CV, % (n=6)	Repetibilidade CV, % (n=6)	Recuperação, %
Manitol	0,82	1,02	92,11 ± 4,86
Trealose	1,47	2,09	91,04 ± 2,24

A repetibilidade foi avaliada aplicando todo o processo de extracção 6 vezes à mesma amostra. Os valores de CV obtidos foram baixos (1,02% e 2,09%, Tabela 7). A recuperação do método foi avaliada pelo processo de adição de padrão, com três níveis de adição (1 mg/ml, 10 mg/ml e 20 mg/ml, cada um em duplicado). Esta mistura padrão foi adicionada à amostra, e repetiu-se todo o procedimento de extracção. Os resultados mostram uma boa recuperabilidade para os compostos em estudo (91,04 e 92,11%).

Relativamente à composição em açúcares, apresentam-se os resultados na Tabela 8.

Tabela 8. Composição em açúcares (g/100 g de matéria seca) das amostras de cogumelos (média \pm SD; n=3). Em cada coluna e para cada espécie, letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Amostras	Arabinose	Manitol	Trealose	Açúcares totais
<i>Cortinarius glaucopus</i>	nd	1,06 \pm 0,16 ef	18,66 \pm 0,37 a	19,72 \pm 0,35 a
<i>Fistulina hepática</i>	7,76 \pm 0,63 a	2,12 \pm 0,22 ef	2,95 \pm 0,22 e	12,82 \pm 0,93 c
<i>Hygrophoropsis aurantiaca</i>	1,53 \pm 0,38 c	4,31 \pm 0,68 d	7,56 \pm 1,01 b	13,40 \pm 0,96 c
<i>Hypholoma capnoides</i>	nd	0,38 \pm 0,04 f	1,58 \pm 0,40 f	1,96 \pm 0,44 e
<i>Laccaria laccata</i>	nd	0,64 \pm 0,05 f	5,81 \pm 0,33 c	6,45 \pm 0,34 d
<i>Lactarius salmonicolor</i>	nd	13,48 \pm 1,95 b	0,35 \pm 0,05 g	13,83 \pm 1,98 c
<i>Lepista inversa</i>	nd	1,86 \pm 0,08 ef	4,32 \pm 0,27 d	6,18 \pm 0,35 d
<i>Russula delica</i>	nd	18,41 \pm 0,38 a	0,21 \pm 0,03 g	18,62 \pm 0,35 ab
<i>Suillus mediterraneensis</i>	4,03 \pm 0,85 b	2,89 \pm 0,31 ed	1,18 \pm 0,19 gf	8,10 \pm 1,11 d
<i>Tricholoma imbricatum</i>	nd	10,53 \pm 0,28 c	6,56 \pm 0,22 cb	17,09 \pm 0,48 b

nd- não detectado

Manitol e trealose foram detectados em todas as amostras. Para as espécies *Russula delica* (18,41 g/100 g), *Lactarius salmonicolor* (13,48 g/100 g) e *Tricholoma imbricatus* (10,53 g/100 g), o manitol foi o açúcar mais abundante (Figura 8). A trealose predominou nas espécies *Cortinarius glaucopus*, *Hygrophoropsis aurantiaca*, *Laccaria laccata*, *Lepista inversa* e *Hypholoma capnoides*, variando entre 1,58 g/100 g e 18,66 g/100 g. A acumulação do dissacarídeo, trealose, e do álcool derivado de açúcar, manitol, nos corpos frutificantes de outras espécies, tinha já sido descrita (Kalač, 2009; Barros *et al.*, 2007a; Barros *et al.*, 2008b; Barros *et al.*, 2008c). A arabinose foi o principal açúcar encontrado nas espécies *Fistulina hepatica* (7,76 g/100 g) e *Suillus mediterraneensis* (4,03 g/100 g), e foi descrita pela primeira vez em amostras de cogumelos. A espécie *Cortinarius glaucopus* revelou a maior concentração de açúcar (19,72 g / 100 g), ao contrário da espécie *Hypholoma capnoides* que revelou a menor concentração (1,96 g/100 g).

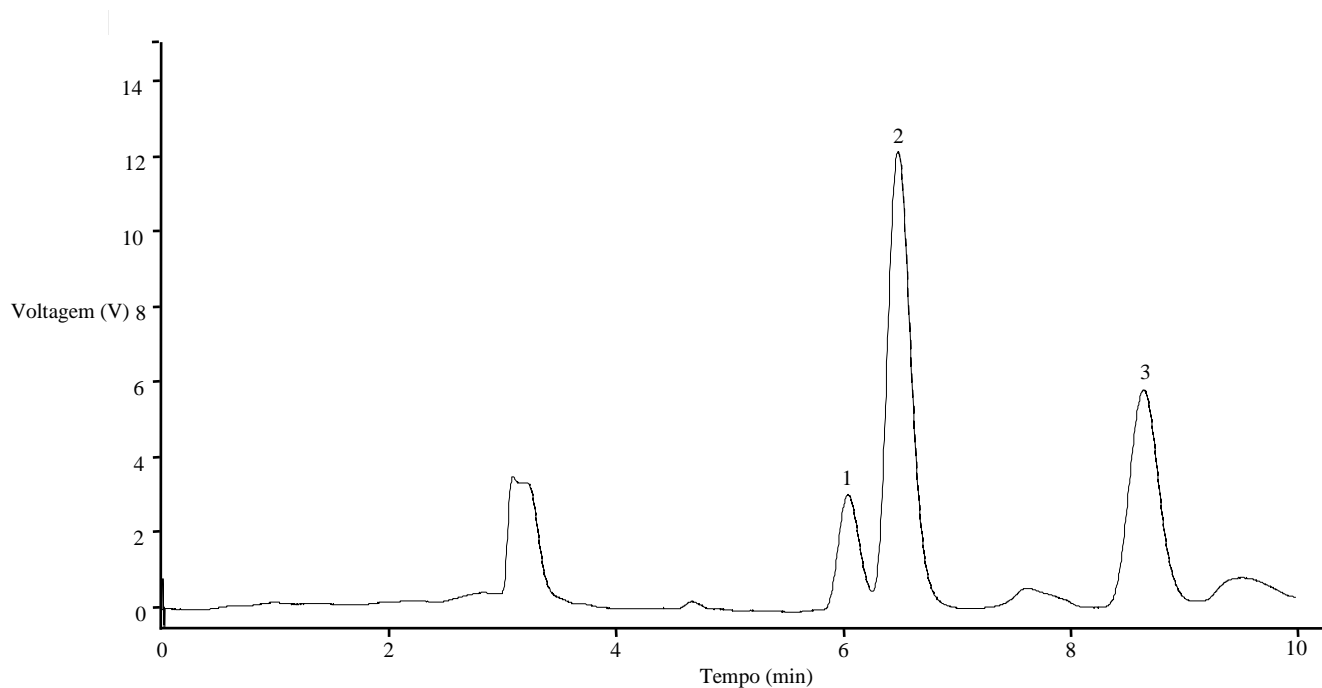


Figura 8. Cromatograma individual de açúcares da espécie *Tricholoma imbricatum*. 1) frutose (PI); 2) manitol; 3) trealose.

3.3.3. Composição em ácidos gordos

Na tabela 9, apresentam-se os resultados da composição em ácidos gordos, ácidos gordos saturados (SFA), ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) e ácidos gordos polinsaturados (PUFA) das espécies estudadas.

Tabela 9. Composição em ácidos gordos (percentagem) das amostras de cogumelos (média \pm SD; n=3). Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

	<i>C. glaucopus</i>	<i>F. hepatica</i>	<i>H. aurantiaca</i>	<i>H. capnoides</i>	<i>L. laccata</i>	<i>L. salmonicolor</i>	<i>L. inversa</i>	<i>R. delica</i>	<i>S. mediterraneensis</i>	<i>T. imbricatum</i>
C6:0	0,44 \pm 0,04	0,05 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	0,30 \pm 0,02	0,10 \pm 0,01	0,26 \pm 0,02	0,09 \pm 0,01	0,12 \pm 0,02	0,04 \pm 0,00	0,28 \pm 0,00
C8:0	0,04 \pm 0,01	0,08 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	6,38 \pm 0,39	0,03 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	0,08 \pm 0,00	0,05 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00	0,17 \pm 0,00
C10:0	0,03 \pm 0,00	0,72 \pm 0,10	0,07 \pm 0,00	0,17 \pm 0,03	0,01 \pm 0,00	3,74 \pm 0,20	0,04 \pm 0,01	0,19 \pm 0,01	0,04 \pm 0,00	0,24 \pm 0,02
C12:0	0,11 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,22 \pm 0,01	0,44 \pm 0,03	0,03 \pm 0,00	0,38 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	0,16 \pm 0,01	0,05 \pm 0,00	0,08 \pm 0,00
C13:0	nd	0,01 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00	0,11 \pm 0,03	nd	nd	nd	0,03 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00
C14:0	0,41 \pm 0,02	0,16 \pm 0,01	0,27 \pm 0,01	1,10 \pm 0,02	0,12 \pm 0,00	0,23 \pm 0,04	0,28 \pm 0,02	1,44 \pm 0,05	0,20 \pm 0,01	0,20 \pm 0,02
C15:0	0,98 \pm 0,02	0,27 \pm 0,03	0,60 \pm 0,01	0,87 \pm 0,00	0,05 \pm 0,00	0,43 \pm 0,04	0,68 \pm 0,03	0,31 \pm 0,00	0,63 \pm 0,01	1,09 \pm 0,06
C16:0	12,05 \pm 0,02	10,42 \pm 0,64	9,97 \pm 0,05	16,43 \pm 0,16	11,64 \pm 0,07	7,35 \pm 0,51	16,36 \pm 0,23	12,02 \pm 0,01	11,93 \pm 0,08	7,44 \pm 0,15
C16:1	0,42 \pm 0,01	0,61 \pm 0,11	2,18 \pm 0,01	1,24 \pm 0,04	0,24 \pm 0,00	0,27 \pm 0,01	0,30 \pm 0,01	3,59 \pm 0,06	0,66 \pm 0,02	0,19 \pm 0,01
C17:0	0,19 \pm 0,00	0,13 \pm 0,02	0,10 \pm 0,00	0,44 \pm 0,02	0,06 \pm 0,00	0,22 \pm 0,03	0,11 \pm 0,00	0,17 \pm 0,00	0,18 \pm 0,00	0,23 \pm 0,01
C18:0	2,98 \pm 0,00	2,54 \pm 0,12	0,92 \pm 0,00	4,10 \pm 0,07	2,02 \pm 0,00	40,13 \pm 0,47	1,71 \pm 0,03	10,34 \pm 0,10	3,56 \pm 0,01	4,10 \pm 0,01
C18:1n9c	24,01 \pm 0,85	31,51 \pm 0,07	17,82 \pm 0,00	16,98 \pm 0,53	60,68 \pm 0,01	18,45 \pm 0,04	28,78 \pm 0,08	41,20 \pm 0,06	36,42 \pm 0,03	51,53 \pm 0,42
C18:2n6c	54,99 \pm 1,00	52,37 \pm 1,23	55,45 \pm 0,26	35,67 \pm 0,17	20,45 \pm 0,14	26,44 \pm 0,20	44,58 \pm 0,08	27,15 \pm 0,05	43,72 \pm 0,17	33,03 \pm 0,14
C18:3n3	nd	0,16 \pm 0,01	8,16 \pm 0,03	0,55 \pm 0,03	0,39 \pm 0,03	0,47 \pm 0,04	4,64 \pm 0,22	0,39 \pm 0,01	0,02 \pm 0,00	0,19 \pm 0,00
C20:0	0,30 \pm 0,04	0,09 \pm 0,01	0,31 \pm 0,04	0,62 \pm 0,26	0,25 \pm 0,00	0,16 \pm 0,01	0,33 \pm 0,07	0,58 \pm 0,01	0,38 \pm 0,00	0,13 \pm 0,02
C20:1c	nd	nd	nd	nd	0,25 \pm 0,04	0,12 \pm 0,00	nd	nd	0,15 \pm 0,00	nd
C20:2c	0,10 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	0,15 \pm 0,00	nd	0,05 \pm 0,01	0,04 \pm 0,00	0,06 \pm 0,01	0,09 \pm 0,00	0,14 \pm 0,00	0,04 \pm 0,00
C20:3n3+C21:0	nd	0,02 \pm 0,00	0,05 \pm 0,00	0,31 \pm 0,03	0,01 \pm 0,00	nd	0,06 \pm 0,01	0,03 \pm 0,00	0,07 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00
C20:5n3	0,19 \pm 0,02	0,09 \pm 0,01	0,36 \pm 0,07	nd	0,12 \pm 0,01	0,11 \pm 0,00	0,21 \pm 0,05	0,25 \pm 0,00	0,09 \pm 0,00	nd
C22:0	0,73 \pm 0,04	0,16 \pm 0,03	0,93 \pm 0,02	2,64 \pm 0,17	0,61 \pm 0,01	0,24 \pm 0,02	0,54 \pm 0,09	0,65 \pm 0,5	0,40 \pm 0,02	0,25 \pm 0,00
C22:1n9	nd	Nd	nd	nd	0,18 \pm 0,00	nd	nd	nd	0,33 \pm 0,00	nd
C23:0	0,26 \pm 0,01	0,09 \pm 0,00	0,25 \pm 0,01	2,53 \pm 0,64	0,12 \pm 0,00	0,25 \pm 0,02	nd	0,32 \pm 0,00	0,20 \pm 0,00	0,23 \pm 0,01
C22:6n3	nd	nd	0,32 \pm 0,01	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C24:0	1,06 \pm 0,01	0,33 \pm 0,01	1,00 \pm 0,09	8,23 \pm 0,77	0,41 \pm 0,00	0,54 \pm 0,06	1,03 \pm 0,04	0,82 \pm 0,01	0,39 \pm 0,01	0,46 \pm 0,01
C24:1	0,69 \pm 0,06	0,07 \pm 0,02	0,64 \pm 0,01	0,89 \pm 0,13	2,19 \pm 0,02	0,09 \pm 0,02	0,06 \pm 0,00	0,10 \pm 0,00	0,36 \pm 0,02	0,09 \pm 0,00

SFA	19,60 ± 0,21 e	15,11 ± 0,96 g	14,75 ± 0,25 g	44,37 ± 0,58 b	15,44 ± 0,10 g	54,00 ± 0,29 a	21,30 ± 0,01 d	27,20 ± 0,06 c	18,04 ± 0,11 f	14,91 ± 0,27 g
MUFA	25,12 ± 0,80 g	32,19 ± 0,2 e	20,76 ± 0,03 h	19,11 ± 0,70 i	63,64 ± 0,06 a	18,93 ± 0,04 i	29,14 ± 0,10 f	44,89 ± 0,00 c	37,92 ± 0,06 d	51,80 ± 0,41 b
PUFA	55,28 ± 1,01 b	52,70 ± 1,18 c	64,49 ± 0,22 a	36,53 ± 0,11 f	21,03 ± 0,18 i	27,07 ± 0,25 h	49,56 ± 0,10 d	27,91 ± 0,06 h	44,03 ± 0,17 e	33,29 ± 0,14 g

nd- não detectado. Ácido capróico (C6:0); ácido caprílico (C8:0); ácido cáprico (C10:0); ácido láurico (C12:0); ácido tridecanóico (C13:0); ácido mirístico (C14:0); ácido pentadecanóico (C15:0); ácido palmítico (C16:0); ácido palmitoleico (C16:1); ácido heptadecanóico (C17:0); ácido esteárico (C18:0); ácido oleico (C18:1n9c); ácido linoleico (C18:2n6c); ácido α -linolénico (C18:3n3); ácido araquidónico (C20:0); ácido eicosenóico (C20:1c); ácido *cis*-11,14 eicosadienóico (C20:2c); ácido *cis*-11,14,17 eicosatrienóico e ácido heneicosanóico (C20:3n3 + C21:0); ácido *cis*-5,8,11,14,17 eicosapentaenóico (C20:5n3); ácido beénico (C22:0); ácido tricosanóico (C23:0); ácido docosahexaenóico (C22:6n3); ácido lignocérico (C24:0); ácido nervónico (C24:1).

O ácido linoleico (C18:2) foi o principal ácido gordo encontrado nas amostras estudadas, seguindo-se o ácido oleico (C18:1) e o ácido palmítico (C16:0). O ácido linoleico é o precursor do 1-octen-3-ol, conhecido como o álcool dos fungos, sendo o principal componente aromático na maioria dos fungos e contribuindo para o sabor dos cogumelos (Maga, 1981). Para a espécie *Lactarius salmonicolor* o ácido gordo mais abundante foi o ácido esteárico (C18:0). Trabalhos já publicados descrevem este ácido gordo como característico da espécie *Lactarius sp.*, sendo abundante em *Lactarius deliciosus* e *Lactarius piperatus* (Barros *et al.*, 2007c). Para além dos quatro já referidos, foram identificados e quantificados mais 21 ácidos gordos. Os PUFA foram o principal grupo de ácidos gordos encontrado nas espécies *Cortinarius glaucopus*, *Fistulina hepatica*, *Hygrophoropsis aurantiaca*, *Lepista inversa* e *Suillus mediterraneensis*, enquanto que os MUFA foram o principal grupo de ácidos gordos encontrados em *Laccaria lacata*, *Russula delica* e *Tricholoma imbricatum*. Para as espécies *Hypholoma capnoides* e *Lactarius salmonicolor* os SFA foram o grupo principal (Tabela 9). Os UFA predominaram sobre os SFA em todas as espécies estudadas, com excepção de *Lactarius salmonicolor* (devido à presença de quantidades elevadas de ácido esteárico), e variaram entre 56% e 85%. Estes resultados estão de acordo com outras observações em cogumelos que também indicaram um predomínio de ácidos gordos insaturados sobre ácidos gordos saturados (Longvah & Deosthale, 1998; Díez & Alvarez, 2001; Barros *et al.*, 2008b). Considerando o teor total em ácidos gordos polinsaturados, *Hygrophoropsis aurantiaca* apresentou o valor mais elevado devido à contribuição do ácido linoleico. A abundância deste ácido gordo essencial noutras espécies comestíveis tem já sido descrita (Kavishree *et al.*, 2008). Considerando o conteúdo total de MUFA, *Laccaria lacata* apresentou o maior valor devido à contribuição do ácido oleico. Os ácidos linoleico e oleico têm sido relacionados com a diminuição do risco de doença cardiovascular, contribuindo para a recomendação de cogumelos nas dietas de pessoas com o colesterol elevado na corrente sanguínea (Kavishree *et al.*, 2008). Não foram detectados isómeros *trans* de ácidos gordos insaturados nos cogumelos estudados, tal como se pode visualizar no cromatograma apresentado na figura 9.

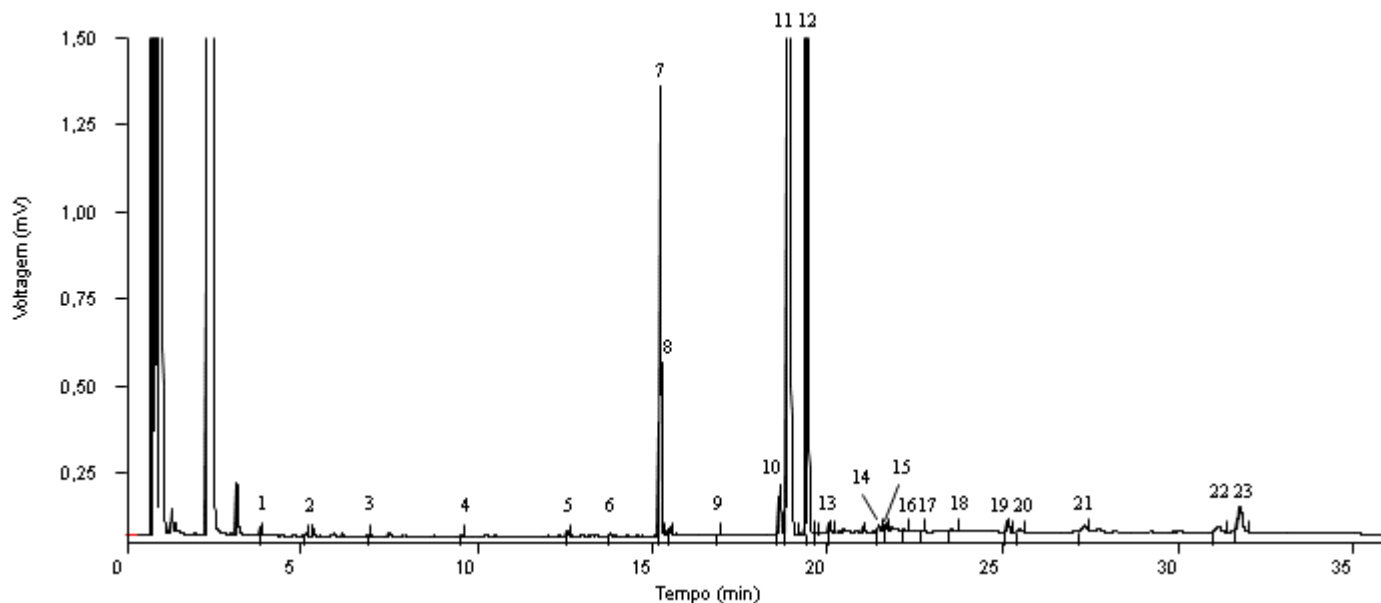


Figura 9. Cromatograma individual de ácidos gordos da espécie *Laccaria laccata*. 1) C6:0; 2) C8:0; 3) C10:0; 4) C12:0; 5) C14:0; 6) C15:0; 7) C16:0; 8) C16:1; 9) C17:0; 10) C18:0; 11) C18:1n9; 12) C18:2n6c; 13) C18:3n3; 14) C20:0; 15) C20:1c; 16) C20:2c; 17) C20:3n3+C21:0; 18) C20:5n3 19) C22:0; 20) C22:1; 21) C23:0; 22) C24:0; 23) C24:1.

Em geral, a rica composição nutricional (teor elevado em proteínas e glícidos, baixos teor em lípidos, com o contributo precioso de ácidos gordos insaturados, e ausência de ácidos gordos *trans*), torna os cogumelos silvestres muito especiais. O método otimizado para a análise de açúcares livres mostrou ser sensível, reprodutível e preciso, sendo todos os compostos separados num curto período de 10 minutos. Este estudo contribui para a documentação da composição nutricional de cogumelos silvestres, que são altamente consumidos e apreciados mas, que carecem de uma base científica de apoio para atestar do seu valor nutricional além do organoléptico.

IV. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

No presente trabalho estudaram-se as propriedades antioxidantes e a composição em fenóis e tocoferóis de 19 espécies de cogumelos silvestres de Portugal (*Clitocybe alexandri*, *Cortinarius glaucopus*, *Fistulina hepatica*, *Hydnum repandum*, *Hygrophoropsis aurantiaca*, *Hypholoma capnoides*, *Laccaria amethystina*, *Laccaria laccata*, *Lactarius aurantiacus*, *Lactarius salmonicolor*, *Lepista inversa*, *Lepista sordida*, *Mycena rosea*, *Russula delica*, *Russula vesca*, *Suillus collinitus*, *Suillus mediterraneensis*, *Tricholoma sulphureum*, *Tricholoma imbricatum*). As espécies *Hygrophoropsis aurantiaca* e *Suillus mediterraneensis* apresentaram os valores mais elevados de fenóis totais (superiores a 7 mg/g), ao contrário das espécies *Lactarius aurantiacus* e *Hydnum repandum* que revelaram os valores mais baixos (inferiores a 0,6 mg/g).

Foram detectadas as quatro formas de vitamina E (tocoferóis α , β , γ e δ) e a amostra de *Laccaria Laccata* revelou o maior valor de tocoferóis (8,04 $\mu\text{g/g}$). A espécie *Lepista inversa* mostrou ter a maior concentração de α -tocoferol (0,28 $\mu\text{g/g}$). β -Tocoferol foi a forma de vitamina E mais abundante em todas as espécies analisadas, sendo os maiores valores encontrados na espécie *Laccaria laccata* (7,06 $\mu\text{g/g}$). A amostra de *Clitocybe alexandri* apresentou a maior concentração de γ -tocoferol (1,34 $\mu\text{g/g}$). δ -Tocoferol foi encontrado apenas em 3 espécies (*Lepista inversa*, *Hygrophoropsis aurantiaca* e *Laccaria laccata*).

Hygrophoropsis aurantiaca, *Suillus mediterraneensis*, *Russula vesca* e *Tricholoma sulphureum* apresentaram uma actividade bloqueadora de radicais DPPH (ABR) superior a 85% a 20 mg/ml com valores de EC_{50} inferiores a 5 mg/ml. *Russula delica*, *Hypholoma capnoides*, *Laccaria laccata*, *Clitocybe alexandri*, *Lactarius aurantiacus* e *Hydnum repandum* apresentaram valores elevados de EC_{50} (superiores a 20 mg/ml) com percentagens de ABR inferiores a 48% a 20 mg/ml. As espécies *Hygrophoropsis aurantiaca*, *Suillus mediterraneensis* e *Russula vesca* foram as que revelaram maior poder redutor (absorvância superior a 2,5 a 10 mg/ml). Pelo contrário, as espécies *Clitocybe alexandri*, *Lactarius aurantiacus* e *Hydnum repandum* apresentaram o menor poder redutor com absorvâncias inferiores a 0,7 a 10 mg/ml. Considerando os resultados obtidos para a inibição da peroxidação lipídica, *Hygrophoropsis aurantiaca*, *Suillus mediterraneensis*, *Russula vesca*, *Tricholoma sulphureum* e *Fistulina hepatica* foram as espécies com maior capacidade (superior a 73% a 20 mg/ml), com valores de EC_{50}

inferiores a 1 mg/ml. A espécie *Hydnum repandum* apresentou o maior valor de EC₅₀ (29 mg/ml) com 33% de capacidade de inibição da peroxidação lipídica a 20 mg/ml. Em suma, a amostra de *Hygrophoropsis aurantiaca* foi a espécie mais promissora apresentando o valor mais elevado de fenóis bem como a maior actividade antioxidante (menores valores de EC₅₀). Esta espécie apresentou também todas as isoformas do tocoferol.

No estudo da composição nutricional, a humidade variou entre 82,42 g/100 g (*Tricholoma Imbricatum*) e 91,67 g/100 g (*Cortinarius glaucopus*). A quantidade de proteínas encontrada foi elevada e variou entre 24,32 g/100 g de massa seca (*Suillus mediterraneensis*) e 76,63 g/100 g (*Lepista inversa*). A quantidade de lípidos variou entre 0,36 g/100 g em *Hypholoma capnoides* e 3,76 g/100 g em *Laccaria laccata*. Os glícidos, calculados por diferença, foram também encontrados em elevadas concentrações e variaram entre 10,35 g/100 g (*Lepista inversa*) e 55,48 g /100 g (*Hygrophoropsis aurantiaca*). O teor em cinzas variou entre 5,92 g/100 g em *Hygrophoropsis aurantiaca* e 28,29 g/100 g em *Hypholoma capnoides*. Foi ainda calculada a contribuição energética das diferentes espécies e, os valores mais elevados, foram obtidos para *Hygrophoropsis aurantiaca*, enquanto que *Hypholoma capnoides* apresentou a menor contribuição energética.

Relativamente à composição em açúcares, manitol e trealose foram detectados em todas as amostras. Para as espécies *Russula delica* (18,41 g/100 g), *Lactarius salmonicolor* (13,48 g/100 g) e *Tricholoma imbricatus* (10,53 g/100 g), o manitol foi o açúcar mais abundante. A trealose predominou nas espécies *Cortinarius glaucopus*, *Hygrophoropsis aurantiaca*, *Laccaria laccata*, *Lepista inversa* e *Hypholoma capnoides*, variando entre 1,58 g/100 g e 18,66 g/100 g. A arabinose foi o principal açúcar encontrado nas espécies *Fistulina hepatica* (7,76 g/100 g) e *Suillus mediterraneensis* (4,03 g/100 g), e foi descrita pela primeira vez em amostras de cogumelos. A amostra de *Cortinarius glaucopus* revelou a maior concentração de açúcares (19,72 g / 100 g), ao contrário da espécie *Hypholoma capnoides* que revelou a menor concentração (1,96 g/100 g).

Quanto à composição em ácidos gordos, o ácido linoleico (C18:2) foi o maioritário nas amostras estudadas, seguindo-se o ácido oleico (C18:1) e o ácido palmítico (C16:0). Para a espécie *Lactarius salmonicolor* o ácido gordo mais abundante foi o ácido esteárico (C18:0). Para além dos quatro já referidos, foram identificados e quantificados mais 21 ácidos gordos. Os PUFA foram o principal grupo de ácidos gordos encontrado nas espécies *Cortinarius glaucopus*, *Fistulina hepatica*, *Hygrophoropsis aurantiaca*,

Lepista inversa e *Suillus mediterraneensis*, enquanto que os MUFA foram o principal grupo em *Laccaria lacata*, *Russula delica* e *Tricholoma imbricatum*. Para as espécies *Hypholoma capnoides* e *Lactarius salmonicolor* os SFA foram o grupo principal (Tabela 8). Os UFA predominaram sobre os SFA em todas as espécies estudadas, com excepção de *Lactarius salmonicolor* (devido à presença de quantidades elevadas de ácido esteárico), e variaram entre 56% e 85%. *Hygrophoropsis aurantiaca* apresentou o valor mais elevado de PUFA devido à contribuição do ácido linoleico. *Laccaria lacata* apresentou o maior valor de MUFA devido à contribuição do ácido oleico.

Em suma, a valiosa composição nutricional (teor elevado em proteínas e glícidos, baixos teor em lípidos, com o contributo precioso de ácidos gordos insaturados, e ausência de ácidos gordos *trans*), torna os cogumelos silvestres muito especiais.

Este estudo contribui para o aumento da proporção de cogumelos estudados e demonstra o potencial nutracêutico de espécies silvestres, devido à sua actividade bloqueadora de radicais livres e capacidade de inibição da peroxidação lipídica. As espécies estudadas são fontes importantes de antioxidantes tais como fenóis e tocoferóis, que podem ser utilizados no combate a doenças relacionadas com o *stress* oxidativo, em aplicações dermatológicas, na cosmética, assim como em suplementos na indústria alimentar. Muitas indústrias, nomeadamente aquelas relacionadas com a produção de aditivos alimentares, cosméticos e produtos farmacêuticos têm aumentado os seus esforços no sentido de obterem compostos bioactivos após extracção e purificação de produtos naturais. Este estudo contribui ainda para a documentação da composição nutricional de cogumelos silvestres, que são altamente consumidos e apreciados.

Futuramente deveriam testar-se as espécies de cogumelos com maior potencial antioxidante em linhas celulares tumorais. Com os melhores extractos, poderiam estudar-se alterações a nível do ciclo celular, proliferação e apoptose celular, assim como analisar possíveis danos no DNA ou capacidade antioxidante protectora do DNA. Seria também relevante identificar e quantificar compostos responsáveis pelas propriedades bioactivas, em particular antioxidantes, tais como compostos fenólicos, tocoferóis, ácido ascórbico, carotenóides, ácidos gordos e açúcares uma vez que os cogumelos são uma fonte promissora de compostos capazes de melhorar a qualidade de vida da humanidade.

REFERÊNCIAS

- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. 16th Ed. Association of Official Analytical Chemists. Arlington VA, USA.
- Agahar-Murugkar, D., Subbulakshmi, G. 2005. Nutritional value of edible wild mushrooms collected from the Khasi hills of Meghalaya. *Food Chemistry*, 89, 599–603.
- Aletor, V.A. 1995. Compositional studies on edible tropical species of mushrooms. *Food Chemistry*, 54, 265–268.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwell, M. 1996. Introductory Mycology. John Wiley and Sons editors, 4th ed., New York, USA, 868.
- Arora, D. 1986. Mushrooms demystified: A comprehensive guide to the fleshy fungi. Ten Speed Press, Berkeley, 2nd ed., 959.
- Barros, L., Baptista, P., Correia, D.M., Casal, S., Oliveira, B., Ferreira, I.C.F.R. 2007a. Fatty acid and sugar compositions, and nutritional value of five wild edible mushrooms from Northeast Portugal. *Food Chemistry*, 105, 140–145.
- Barros, L., Baptista, P., Correia, D.M., Morais, J.S., Ferreira, I.C.F.R. 2007b. Effects of conservation treatment and cooking on the chemical composition and antioxidant activity of Portuguese wild edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4781–4788.
- Barros, L., Baptista, P., Estevinho, L.M., Ferreira, I.C.F.R. 2007c. Effect of fruiting body maturity stage on chemical composition and antimicrobial activity of *Lactarius* sp. mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8766–8771.
- Barros, L., Correia, D.M., Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P., Santos-Buelga, C. 2008a. Optimization of the determination of tocopherols in *Agaricus* sp. Edible mushrooms by a normal phase liquid chromatographic method. *Food Chemistry*, 110, 1046–1050.
- Barros, L., Cruz, T., Baptista, P., Estevinho, L.M., Ferreira, I.C.F.R. 2008c. Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food Chemistry Toxicology*, 46, 2742–2747.
- Barros, L., Venturini, B.A., Baptista, P., Estevinho, L.M., Ferreira, I.C.F.R. 2008b. Chemical composition and biological properties of portuguese wild mushrooms: A comprehensive study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3856–3862.

- Bravo, L. 1998. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56, 317–333.
- Brower, V. 1988. Nutraceuticals: poised for a healthy slice of the health market? *Nature Biotechnology*, 16, 728-731.
- Burton, G.W., Traber, M.G. 1990. Vitamin E: Antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annual Review of Nutrition*, 10, 357–382.
- Butler, M.S. 2004. The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products*, 67, 2141-2153.
- Chang, S.T., Buswel, J.A. 1996. Mushrooms nutraceuticals. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12, 473-476.
- Chang, S.T., Buswell, J.A. 1999. *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllophoromycetideae) – a mushrooming medicinal mushroom. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1, 139-146.
- Chang, S.T., Miles, P.G. 1992. Mushrooms biology – a new discipline. *Mycologist*, 6, 64-65.
- Chang, S.T., Miles P.G. 2004. Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact –2nd ed., 2.
- Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y., Arai, Y., Fukuoka, F. 1970. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity especially Lentinan, from *Lentinus edodes*. *Cancer Research*, 30, 2776-2781.
- Courtcuise, R., Duhem, B. 2005. Guía de los hongos de la Península Ibérica, Europa y norte de África. Omega, Barcelona, Espanha.
- Díez, V.A., Alvarez, A. 2001. Compositional and nutritional studies on two wild edible mushrooms from northwest Spain. *Food Chemistry*, 75, 417–422.
- Elmastas, M., Isildak, O., Turkekul, I., Temur, N. 2007. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 337–345.
- Faria, A., Calhau, C., Freitas, V., Mateus, N. 2006. Procyanidins as antioxidants and tumor cell growth modulators. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2392–2397.
- Fasidi, I.O. 1996. Studies on *Volvariella esculenta* (Mass) Singer: cultivation on agricultural wastes and proximate composition of stored mushrooms. *Food Chemistry*, 55, 161–163.

- Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Abreu, R.M.V. 2009. Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, 16, 1543–1560.
- Fink, H., Hoppenhaus, K.W. 1958. Peculiar observations in the estimation of biological quality of the proteins of edible boletus (*Boletus edulis*) and mushroom (*Psalliota biospora*) with reference to dietetics and therapeutics. *Nutricional Abstracts and Reviews*, 28, Abs. 4886.
- George, S., Brat, P., Alter, P., Amiot, M. J. 2005. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1370–1373.
- Grabey, S., Thiericke, R. 1999. Bioactive agents from natural sources: trends in discovery and application. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 64, 101-54.
- Griffin, D.H. 1994. *Fungal Physiology*. Wiley-Liss, 2nd ed., New York, 485.
- Gruen, E.H., Wong, M.W. 1982. Distribution of cellular amino acids, protein and total inorganic nitrogen during fruit body development in *Flammulina velutipes*. *Canadian Journal of Botany*, 60, 1330–1341.
- Guo, L.Q., Lin, J.Y., Lin, J.F. 2007. Non-volatile components of several novel species of edible fungi in China. *Food Chemistry*, 100, 643–649.
- Halliwell, B. 1996. Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*, 16, 33–50.
- Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T., Okuda, T. 1988. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 36, 2090-2097.
- Hobbs, C. 1995. *Medicinal Mushrooms*. Interweave Press, Loveland, CO.
- Ikekawa, T. 2001. Beneficial effects of edible and medicinal mushrooms on health care. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 3, 291-298.
- James, T.Y., Kauff, F., Schoch, C. et al. 2006a. Reconstructing the early evolution of the fungi using a six gene phylogeny. *Nat*, 443, 818-822.
- James, T.Y., Letcher, P.M., Longcore, J.E., Mozley-Standridge, S.E., Porter, D., Powell, M.J., Griffith, G.W., Vilgalys, R. 2006b. A molecular phylogeny of the flagellated Fungi (Chytridiomycota) and a proposal for a new phylum (Blastocladiomycota). *Mycologia*, 98, 860-871.

- Jayakumar, T., Thomas, P.A., Geraldine, P. 2009. In-vitro antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 228–234.
- Kalač, P. 2009. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry*, 113, 9–16.
- Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L.A. 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31, 671–701.
- Kavishree, S., Hemavathy, J., Lokesh, B.R., Shashirekha, M.N., Rajarathnam, S. 2008. Fat and fatty acids of Indian edible mushrooms. *Food Chemistry*, 106, 597–602.
- Kikumoto, S., Miyajima, T., Kimura, K., Okubo, S., Komatsu, N. 1971. Polysaccharide produced by *Schizophyllum commune*. Part. II: Chemical structure of an extracellular polysaccharide. *Nogei Kagaku*, 45, 162-168.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C., Stalpers, J.A. 2001. *Dictionary of the fungi*, 9th ed. CABI Bioscience, Wallingford, UK.
- Komatsu, N., Okubo, S., Kikumoto, S., Kimura, K., Saito, G., Sakai, S. 1969. Host-mediated antitumor action of Schizophyllan a glucan produced by *Schizophyllum commune*. *Gann*, 60, 137-144.
- Kosaka, A., Yamashita, A. 1993. Lentinan as an effective immunomodulator against breast cancer, with special reference to clinical applications. *International Journal of Immunotherapy*, 9, 111-116.
- Lampi, A.M., Kataja, L., Kamal-Eldin, A., Vieno, P. 1999. Antioxidant activities of alpha- and gamma-tocopherols in the oxidation of rapeseed oil triacylglycerols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76, 749–755.
- Lee, I.K., Kim, Y.S., Jang, Y.W., Jung, J.Y., Yun, B.S. 2007. Antioxidant properties of various extracts from *Hypsizigus marmoreus*. *Food Chemistry*, 104, 1–9.
- Lee, Y.L., Jian, S.Y., Lian, P.Y., Mau, J.L. 2008. Antioxidant properties of extracts from a white mutant of the mushroom *Hypsizigus marmoreus*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 116–124.
- Léon-Guzmán, M.F., Silva, I., López, M.G. 1997. Proximate chemical composition, free amino acid contents, and free fatty acids contents of some wild edible mushrooms from Queretaro, México. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 89, 533–539.
- Lindequist, U., Niedermeyer, T.H.J, Julich, W.D. 2005. The pharmacological potential of mushrooms. *eCAM*, 2, 285-299.

- Liu, Y., Hodson, M.C., Hall, B.D. 2006. Loss of the flagellum happened only once in the fungal lineage: phylogenetic structure of Kingdom Fungi inferred from RNA polymerase II subunit genes. *BMC Evolutionary Biology*, 6, 74.
- Longvah, T., Deosthale, Y.G. 1998. Compositional and nutritional studies on edible wild mushroom from northeast India. *Food Chemistry*, 63, 331–334.
- Margulis, L., Schwartz, K.V. 1988. *Five Kingdoms: An illustrated guide to the phyla of life on Earth*. WH. Freeman and company, 2nd ed., New York.
- Martins, X.F. 2004. *Cogumelos – Património Natural Transmontano*. João Azevedo Editor, Portugal, Vol 1, 19-101.
- Manzi, P., Aguzzi, A., Pizzoferrato, L. 2001. Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chemistry*, 73, 321–325.
- Manzi, P., Gambelli, L., Marconi, S., Vivanti, V., Pizzoferrato, L. 1999. Nutrients in edible mushrooms: an interspecies comparative study. *Food Chemistry*, 65, 477–482.
- Maga, J.A. 1981. Mushroom flavor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29, 1–4.
- Mau, J.L., Chang, C.N., Huang, S.J., Chen, C.C. 2004. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta* and *Termitomyces albuminosus* mycelia. *Food Chemistry*, 87, 111–118.
- Mau, J.L., Chao, G.R., Wu, K.T. 2001. Antioxidant properties of methanolic extracts from several ear mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5461–5467.
- Mau, J.L., Lin, H.C., Chen, C.C. 2002a. Antioxidant properties of several medicinal mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6072–6077.
- Mau, J.L., Lin, H.C., Song, S.F. 2002b. Antioxidant properties of several specialty mushrooms. *Food Research International*, 35, 519–526.
- Mi-Yae, S., Tae-Hun, K., Nak-ju, S. 2003. Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (Phellinus of Hymenochaetaceae) extracts. *Food Chemistry*, 82, 593-597.
- Mdachi, S.J.M., Nkunya, M.H.H., Vitus, V.A., Nyigo, A., Urasa, I.T. 2004. Amino acid composition of some Tanzanian wild mushrooms. *Food Chemistry*, 86, 179–182.
- Mizuno, T. 1995. Bioactive biomolecules and mushrooms: food function and medicinal effects of mushroom fungi. *Food Reviews International*, 11, 7-21.
- Mizuno, T., Saito, H., Nishitoba, T., Kawagishi, H. 1995. Antitumour-active substances from mushrooms, *Food Reviews International*, 11, 23-61.

- Murcia, M.A., Martinez-Tome, M., Jimenez, A.M., Vera, A.M., Honrubia, M., Parras, P. 2002. Antioxidant activity of edible fungi (truffles and mushrooms): Losses during industrial processing. *Food Protection*, 65, 1614–1622.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M. 2000. The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Reports*, 17, 215-234.
- Ogundana, S.K., Fagade, O.E. 1982. Nutritive value of some Nigerian edible mushrooms. *Food Chemistry*, 8, 263–268.
- Ouzouni, P.K., Petridis, D., Koller, W.D., Riganakos, K.A. 2009. Nutritional value and metal content of wild edible mushrooms collected from West Macedonia and Epirus, Greece. *Food Chemistry*, 115, 1575–1580.
- Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44: 307-315.
- Prior, R.L. 2003. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 570S–578S.
- Rodríguez, J.A.S., Domínguez, E.R., Fernández, D.R. 2008. Habitats de las setas: protección y conservación. IRMA, S.L., 11-29, León, España.
- Schwenke, D.C. 2002. Does lack of tocopherols and tocotrienols put women at increased risk of breast cancer? *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 2–20.
- Seif, E., Leigh, J., Liu, Y., Roewer, I., Forget, L., Lang, B.F. 2005. Comparative mitochondrial genomics in zygomycetes: bacteria-like RNase P RNAs, mobile elements and a close source of the group I intron invasion in angiosperms. *Nucleic Acids Research*, 33, 734-744.
- Senatore, F., Dini, A., Marino, A. 1988. Chemical constituents of some Basidiomycetes. *Journal of the science of food and agriculture*, 45, 337–345.
- Shepherd, C.J., Totterdell, C.J. 1988. *Mushrooms and Toadstools of Australia*. Inkata Press, Sydney, Australia, 19-21.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. 1965. Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Snyder, Kirkland, Glajch. 1997. *Practical HPLC Method Development*, 2nd edition.
- Steenkamp, E.T, Wrigth, J., Baldauf, S.L. 2006. The prokaryotic origins of animals and fungi. *Molecular Biology and Evolution*, 23, 93-106.

- Thimmel, R., Kluthe, R. 1982. The nutritional database for edible mushrooms. *Ernahrung*, 22, 63–65.
- Traber, M.G. 1999. Vitamin E. In: *Modern nutrition in health and disease* (10th ed). M.E. Shils, J.A. Olson, M. Shike, A.C. Ross (Eds.), Baltimore: Williams and Wilkins, 347–362.
- Tsai, S.Y., Tsai, H.L., Mau, J.L. 2007. Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea*, and *Boletus edulis*. *Lwt-Food Science and Technology*, 40, 1392–1402.
- Tsukagoshi, S., Hashimoto, Y., Fujii, G., Kobayashi, H., Nomoto, K., Orita, K. 1984. Krestin (PSK). *Cancer Treatment Reviews*, 11, 131-155.
- Wasser, S.P. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulatory polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 258-274.
- Wasser, S.P., Weis, A.L. 1999. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Critical Reviews in Immunology*, 19, 65-96.
- Whittaker, R.H. 1969. New concepts of Kingdoms or organisms. Evolutionary relations are better better represented by new classifications than by the traditional two Kingdoms. *Science*, 163, 150-160.
- Wright, J.S., Johnson, E.R., DiLabio, G.A. 2001. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 123, 1173–1183.
- Yang, J.H., Lin, H.C., Mau, J.L. 2002. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry*, 77, 229–235.
- Yildiz, A., Karakaplan, M., Aydin, F. 1998. Studies on *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex Fr.) Kum. Var. *Salignus* (Pers. Ex Fr.) Konr. et. Maubl.: cultivation, proximate composition, organaic and mineral composition of carpophores. *Food Chemistry*, 61, 127–130.
- Zeisel, S.H. (1999. Regulation of “nutraceuticals”. *Science*, 285, 1853-1855.
- Zhou, S., Gao, Y. 2002. The immunomodulating effects of *Ganoderma Lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. (Ling Zhi, Reishi mushroom) (Aphyllphoromycetideae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 4, 1-11.

WEBSITES

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:LepistaSordida_03.jpg

<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Russ.ves.jpg>

http://it.wikipedia.org/wiki/File:Lepista_inversa01.jpg

<http://www.eol.org/pages/188278>

http://en.wikipedia.org/wiki/File:Amanita_phalloides_1.JPG

http://en.wikipedia.org/wiki/File:Champignons_Agaricus.jpg

http://en.wikipedia.org/wiki/File:Hygrophoropsis_aurantiaca.jpg

http://en.wikipedia.org/wiki/File:Hypholoma_capnoides.jpg

http://en.wikipedia.org/wiki/File:Lactarius_aurantiacus_060924b.jpg

http://en.wikipedia.org/wiki/File:Lactarius_salmonicolor.jpg

http://en.wikipedia.org/wiki/File:Tricholoma_sulphureum_031123w.jpg

http://it.wikipedia.org/wiki/File:Suillus_mediterraneensis.jpg

http://jlcheype.free.fr/images/Agaricomycetes/Volvariella_volvacea2.jpg

http://pms.wikipedia.org/wiki/Figura:Clitocybe_alexandrii.jpg

http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Lentinula_edodes.jpg

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b7/Suillus_collinitus_20080828w.JPG

<http://www.mushroomexpert.com/>

<http://www.mycodb.fr/fiche.php?genre=Cortinarius&espece=glaucopus&source=search>

<http://www.mycology.com/>