



Efeitos do trofismo de cogumelos silvestres comestíveis do Nordeste de Portugal no seu potencial nutricional e nutracêutico

Cátia Sofia Bernardo Grangeia

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau
de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar

Orientado por

**Isabel Cristina Fernandes Rodrigues Ferreira
Anabela Rodrigues Lourenço Martins**

**Bragança
2012**

Para alcançar a felicidade, devemos-nos certificar de que nunca nos falte uma meta que seja importante para nós. Delinear um objetivo que ofereça um grande interesse pessoal; algo que nos permita desfrutar, dedicando-lhe doze ou quinze horas de trabalho diário, e o resto do tempo para refletir sobre ele. Aquilo que plantarmos na nossa mente subconsciente e alimentarmos com repetição e emoção será realidade um dia.

EARL NIGHTINGALE

AGRADECIMENTOS

Para a realização desta dissertação foram vários os intervenientes que colaboraram direta e indiretamente, os quais merecem o meu reconhecimento e gratidão.

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

À **Doutora Lillian Barros**, por todo o apoio, disponibilidade, carinho e dedicação que tanto ajudaram na realização deste trabalho. Obrigada por tudo.

Ao **LQBA** (Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada, Escola Superior Agrária de Bragança), e a todas as pessoas que lá trabalham, por possibilitarem a realização deste trabalho e pela disponibilidade.

À **Cátia Batista** (a minha companheira) pelo apoio, pela amizade e pelos bons momentos que passamos juntas ao longo de todo o percurso académico.

Ao **Bruno**, por tudo o que representa para mim.

Por fim, os últimos são os primeiros, **aos meus Pais**, pelo constante apoio, amor incondicional, pelos valores que me inculcaram e fizeram de mim a pessoa que sou hoje. Se cheguei aqui a vós o devo. **OBRIGADO!**

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	3
ÍNDICE DE TABELAS	6
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ABREVIATURAS	9
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Classificação e Ecologia de Fungos	13
1.2. Valor nutricional dos cogumelos	19
1.3. Potencial antioxidante dos cogumelos	24
1.4. Objetivos	29
2. MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1. Material Biológico	30
2.2. Padrões e reagentes	32
2.3. Determinação de macronutrientes	32
2.4. Determinação de ácidos gordos	32
2.5. Determinação de açúcares livres	33
2.6. Determinação de vitaminas	34
2.7. Determinação de fenóis totais	35
2.8. Avaliação da atividade antioxidante	36
2.8.1. <i>Atividade captadora de radicais DPPH</i>	36
2.8.2. <i>Poder Redutor</i>	36
2.8.3. <i>Inibição da descoloração do β-caroteno</i>	37

2.9. Análise Estatística -----	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	38
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS -----	54
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	55
ANEXOS -----	64

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Informação sobre as espécies de cogumelos comestíveis analisadas..... 31

Tabela 2: Composição nutricional e valor energético das espécies de cogumelos silvestres comestíveis saprotróficos e micorrízicos..... 39

Tabela 3: Composição em ácidos gordos (percentagem relativa) das amostras de cogumelos silvestres comestíveis saprotróficos e micorrízicos. 41

Tabela 4: Composição em açúcares livres das amostras de cogumelos silvestres comestíveis saprotróficos e micorrízicos..... 45

Tabela 5: Composição em vitaminas das amostras de cogumelos silvestres comestíveis saprotróficos e micorrízicos..... 47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura de um cogumelo (Kalač, 2009).	13
Figura 2: <i>Clitopilus prunulus</i> (Web 1) e <i>Lyophyllum decastes</i> (Web 2), espécies saprotróficas e <i>Hygrophorus pustulatus</i> (Web 3) e <i>Russula cyanoxantha</i> (Web 4), espécies micorrízicas, em que se observa o píleo, o estipe e as lâminas e a espécie saprotrófica <i>Macrolepiota excoriata</i> onde se observa o píleo, o estipe, as lâminas e o anel (Web 5).	14
Figura 3: Estrutura química dos aminoácidos mais abundantes em cogumelos silvestres (Ferreira, 2011).	20
Figura 4: Estrutura química de uma fosfatidilcolina (lecitina) (Ferreira, 2011).	21
Figura 5: Estrutura química do ácido palmítico (16:0), ácido oleico (18:1 Δ^9) e ácido linoleico (18:2 $\Delta^{9,12}$) (Ferreira, 2011).	22
Figura 6: Estrutura química do D-Manitol e da Trealose (Ferreira, 2011).	23
Figura 7: Principais causas e consequências da ação dos radicais livres (Ferreira et al., 2009).	24
Figura 8 : Estrutura química de tocoferóis (Ferreira, 2011).	25
Figura 9: Estrutura química e tridimensional do ácido L-ascórbico (Ferreira, 2011)...	26
Figura 10: Estrutura química e tridimensional do β -caroteno (Ferreira, 2011).	27

Figura 11: Atividade captadora de radicais de DPPH das amostras de cogumelos silvestres comestíveis.	49
Figura 12: Poder redutor das amostras de cogumelos silvestres comestíveis.....	50
Figura 13: Capacidade de inibição da peroxidação lipídica das amostras de cogumelos silvestres comestíveis, medida pela inibição da descoloração do β -caroteno.	51
Figura 14: Conteúdo fenólico nas amostras de cogumelos silvestres comestíveis saprotróficos e micorrízicos.....	52

ABREVIATURAS

A – Absorvância

AsH - Ião ascorbato

ArOH - Antioxidante fenólico

ACR - Atividade captadora de radicais

ANOVA - Análise de variância

AOAC - Association of Official Analytical Chemist

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

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DPPH - 2,2-Difenil-1-picril-hidrazilo

dw – Massa seca

EAG – Equivalentes de ácido gálico

EC₅₀ . Concentração de extrato correspondente a 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no ensaio do poder redutor

FAME - Ésteres metílicos de ácidos gordos

FID - Detetor de ionização de chama

fw – Massa fresca

GC - Cromatografia gasosa

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

L[•] - Radical alquilo

LH – Radical alquilo reduzido

LOO[•] - Radical peroxilo

LOOH – Hidroperóxido lipídico

MS – Espectrometria de massa

MUFA - Ácidos gordos monoinsaturados

m/v – Relação massa/volume

NADH –Nicotinamida adenina dinucleótido na forma reduzida

n^o - Número

nd - Não detetado

PI - Padrão interno

PUFA - Ácidos gordos polinsaturados

- RI** – Índice de refração
- ROOH** - Radical hidroperóxido reduzido
- ROS** - Espécies reativas de oxigénio
- rpm** - Rotações por minuto
- SD** - Desvio padrão
- SFA** - Ácidos gordos saturados
- TO[•]** - Radical tocoferoxilo
- TOH** - Tocoferol
- UFA** - Ácidos gordos insaturados
- UV** - Ultravioleta
- Vis** – Visível
- v/v** – Relação volume/volume

RESUMO

O consumo de cogumelos silvestres comestíveis é crescente e, em alguns países da Europa Central e de Leste, é preferencial relativamente aos cogumelos cultivados. No entanto, o conhecimento do valor nutricional dos cogumelos silvestres é bastante reduzido comparativamente aos vegetais.

No presente trabalho, foram avaliados os efeitos do trofismo de cogumelos silvestres comestíveis do Nordeste de Portugal no seu potencial nutricional e nutracêutico. Foram estudadas as propriedades antioxidantes *in vitro* de cinco espécies saprotróficas (*Calvatia utriformis*, *Clitopilus prunulus*, *Lycoperdon echinatum*, *Lyophyllum decastes* e *Macrolepiota excoriata*) e cinco espécies micorrízicas (*Boletus erythropus*, *Boletus fragrans*, *Hygrophorus pustulatus*, *Russula cyanoxantha* e *Russula olivacea*), e os resultados foram comparados com compostos individuais identificados por técnicas cromatográficas.

As espécies micorrízicas revelaram uma concentração muito mais elevada em açúcares do que as saprotróficas, bem como a presença de frutose. A espécie saprotrófica *Lyophyllum decastes* e as espécies micorrízicas *Boletus erythropus* e *Boletus fragrans* apresentaram o maior potencial antioxidante, principalmente devido à contribuição de antioxidantes polares, tais como fenóis e açúcares.

Este é o primeiro trabalho que descreve a composição química das espécies de cogumelos estudadas, constituindo uma evidência científica de usos tradicionais de espécies silvestres comestíveis.

ABSTRACT

Consumption of wild growing mushrooms has been preferred to eating of cultivated fungi in many countries of Central and Eastern Europe. Nevertheless, the knowledge of the nutritional value of wild growing mushrooms has been limited when compared with vegetables.

In the present study, the effects of mushrooms trophism in their nutritional and nutraceutical potential were evaluated. *In vitro* antioxidant properties of five saprotrophic (*Calvatia utriformis*, *Clitopilus prunulus*, *Lycoperdon echinatum*, *Lyophyllum decastes*, *Macrolepiota excoriata*) and five mycorrhizal (*Boletus erythropus*, *Boletus fragrans*, *Hygrophorus pustulatus*, *Russula cyanoxantha*, *Russula olivacea*) wild edible mushrooms were accessed and compared to individual compounds identified by chromatographic techniques.

Mycorrhizal species revealed a much higher concentration in sugars than the saprotrophic mushrooms, and the presence of fructose. The saprotrophic *Lyophyllum decastes*, and the mycorrhizal species *Boletus erythropus* and *Boletus fragrans* gave the highest antioxidant potential, mainly due to the contribution of polar antioxidants such as phenolics and sugars.

This is the first report on chemical composition of the studied mushrooms, and the results contribute to scientific evidence for traditional edible uses of wild species.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Classificação e Ecologia de Fungos

Os fungos incluem cogumelos, bolores, mofo e leveduras, assim como outros organismos menos conhecidos (Alexopoulos et al., 1996). Estes organismos eucariotas constituem um grupo de seres vivos que possuem uma grande variedade de formas e tamanhos. Estes podem ser organismos unicelulares (as leveduras) ou pluricelulares filamentosos que se caracterizam por serem organismos não-móveis, compostos por filamentos com crescimento apical designados de hifas, 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 possuírem nutrição heterotrófica, alimentando-se de compostos orgânicos já decompostos ou vivos. A parede celular é composta por quitina e glucanos, nomeadamente alfa-glucanos (Griffin, 1994; Alexopoulos et al., 1996).

Segundo a estrutura dos fungos, é frequente dividi-los em dois grupos: os unicelulares e os filamentosos, sendo estes últimos os mais predominantes na natureza. Os filamentos são estruturas tubulares designadas hifas, que crescem apenas nas pontas ou regiões especializadas. Em algumas espécies, através de ramificações, por meio de anastomose ou fusão de hifas, é formada uma rede desses filamentos a qual se designa por micélio. Os cogumelos são a parte visível de determinados fungos (Martins, 2004). Segundo Chang & Miles, (2004) um cogumelo ou carpóforo é um macrofungo com um corpo de frutificação distintivo que pode ser epígeo (acima do solo) ou hipógeo (dentro do solo) e suficientemente grande para ser visto a olho nu (**Figura 1**).

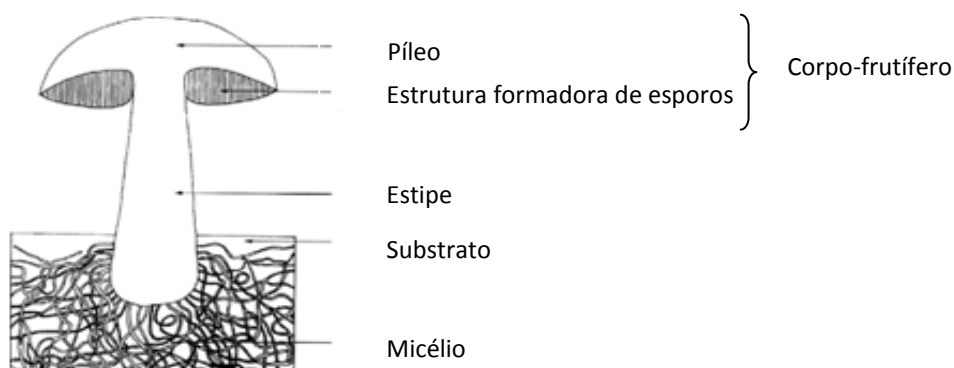


Figura 1: Estrutura de um cogumelo (Kalač, 2009).

Relativamente ao tipo mais comum de cogumelo, pode-se dizer que é em forma de cúpula com píleo e estipe, como por exemplo *Clitopilus prunulus* e *Lyophyllum decastes* (cogumelos comestíveis silvestres saprotróficos) e também *Hygrophorus pustulatus* e *Russula cyanoxantha* (cogumelos comestíveis silvestres micorrízicos), outras espécies têm adicionalmente um anel, que é o caso da espécie saprotrófica *Macrolepiota excoxiata* (Figura 2).



Clitopilus prunulus



Lyophyllum decastes



Hygrophorus pustulatus



Russula cyanoxantha



Macrolepiota excoxiata

Figura 2: *Clitopilus prunulus* (Web 1) e *Lyophyllum decastes* (Web 2), espécies saprotróficas e *Hygrophorus pustulatus* (Web 3) e *Russula cyanoxantha* (Web 4), espécies micorrízicas, em que se observa o píleo, o estipe e as lâminas e a espécie saprotrófica *Macrolepiota excoxiata* onde se observa o píleo, o estipe, as lâminas e o anel (Web 5).

A estrutura a que se chama de cogumelo é na verdade apenas o corpo de frutificação do fungo. A parte vegetativa do fungo, chamada de micélio, incorpora 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 (Chang & Miles, 2004). A partir do micélio subterrâneo forma-se uma massa esférica a qual se rompe por pressão interior deixando sair o chapéu e parte superior do pé dando assim origem ao carpóforo. Após um período de crescimento, e em condições favoráveis, o micélio estabelecido produz a estrutura de frutificação, a qual se designa de cogumelo (Chang & Miles, 2004). Os cogumelos, na maioria dos casos, têm forma de guarda-chuva, constituído por píleo (chapéu) e estipe (pé), e algumas espécies têm adicionalmente um anel, uma vulva, ou ambos. 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).

Todavia, esta estrutura não é aplicável a todas as espécies pois alguns cogumelos são em formas de taças flexíveis, outros são redondos como bolas de golfe e existem ainda alguns semelhantes a uma orelha humana. Constatamos, então, que existe uma incontável variedade de formas (Chang & Miles, 2004).

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).

O facto de os fungos serem organismos heterotróficos, ou seja, não produzirem o seu próprio alimento, obriga-os a dependerem da absorção de matéria orgânica, viva ou morta, para sobreviver. Como estes não possuem clorofila (como as plantas), não têm a capacidade de realizar fotossíntese, deste modo, libertam exoenzimas, que funcionam como enzimas digestivas, cuja função consiste em digerir moléculas orgânicas do ambiente, permitindo ao fungo absorver o alimento (Pereira, 2011).

Desta forma os fungos podem ser saprófitas, parasitas ou ainda, simbióticos, nomeadamente micorrízicos, (associações entre fungos e raízes de certas plantas), e líquenes (associações entre fungos e algas) (Martins, 2004). Os fungos saprófitas alimentam-se de matéria orgânica morta ou em decomposição, são os mais frequentes

em determinados ecossistemas e além disso, 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: húmícolas (vivem sobre restos de plantas em decomposição, húmus), fimícolas (vivem sobre excrementos e por vezes necessitam de substratos em fermentação e elevadas temperaturas para a sua frutificação), lenhícolas (vivem sobre madeira morta, ramas, troncos), terrícolas (vivem sobre terra sem vegetação e sem húmus, surgindo em taludes e bordaduras de caminhos), práticoas (vivem sobre a erva), folícolas (vivem sobre as folhas) e pirófilos (vivem sobre terrenos que foram queimados), (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).

Relativamente aos 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).

Os fungos eram considerados membros do reino vegetal, isto porque, possuem semelhanças no que diz respeito aos seus modos de vida, ou seja, o facto de ambos serem na sua maioria imóveis, e apresentarem semelhanças na morfologia geral e no habitat em que se desenvolvem (Pereira, 2011). Em 1969 Robert Whittaker propôs a classificação em cinco reinos (reino animal, reino das plantas, reino dos fungos, reino protista e o reino monera) onde pela primeira vez os fungos aparecem como um reino à parte (Carlile et al., 2001). Atualmente, a classificação de Cavalier Smith (1999), retirou do Reino Fungi todos os organismos que possuem celulose na sua parede e, reestruturou a classificação dos seres vivos. O reino Fungi mantém-se mas, com alterações.

Portanto, o reino dos fungos foi recentemente dividido em sete filos: Chytridiomycota, Zygomycota, Blastocladiomycota, Neocallimastigomycota, Glomeromycota, Ascomycota e Basidiomycota, (Seif et al., 2005; James et al., 2006a; James et al., 2006b).

O filo Zigomycota consiste em duas classes, os Zigomycetes e os Trichomycetes. Os zigomycetos consistem em fungos terrestres formados por hifas de paredes quitinosas, alguns são parasitas mas na sua maioria são saprófitas, vivendo no solo e alimentando-se de matéria orgânica morta. Não possuem esporos flagelados e na reprodução sexuada produzem zigósporos, ou seja, zigotos de parede espessa e resistente, podendo sobreviver em más condições ambientais (Pereira, 2011). Por outro lado, os Trichomycetes são parasitas obrigatórios que vivem no intestino de insetos e outros artrópodes, sendo que, a grande variedade de hospedeiros são marinhos, terrestres e de água doce. A relação que estes mantêm com os seus hospedeiros é geralmente patogénica e, em alguns casos, mutualista, dependendo do desenvolvimento e condições ambientais (Carlile et al., 2001; Alencar et al., 2003).

Quanto ao filo Chytridiomycota compreende cerca de 900 espécies conhecidas, sendo divididas em cinco ordens. A maioria cresce em condições aeróbias no solo, na lama ou na água e reproduzem-se por zoósporos com um único flagelo posterior. Algumas são saprófitas utilizando celulose, quitina e queratina a partir de plantas em decomposição e detritos animais no solo ou lama. (Webster & Weber, 2007).

Relativamente ao filo Blastocladiomycota, este caracteriza-se por serem fungos zoospóricos, que se podem encontrar no solo e água doce e são na maioria detritívoros. Apresentam reprodução assexuada com zoósporo de um único flagelo, e reprodução sexuada através da fusão de planogametas (Pereira, 2011)

Os fungos do filo Neocallimastigomycota são anaeróbicos e podem encontrar-se, principalmente, no sistema digestivo dos grandes mamíferos herbívoros e possivelmente noutros ambientes anaeróbios terrestres e aquáticos (Pereira, 2011).

No filo Glomeromycota todos os fungos se reproduzem assexuadamente formando glomerosporos como estruturas reprodutivas. A maioria dos representantes desse filo forma associação simbiótica obrigatória com vegetais (Pereira, 2011).

O maior grupo do reino dos fungos é o filo Ascomycota, incluído mais de 32.000 espécies de 3400 géneros, no entanto é assumido que a maioria estará ainda por descobrir. A principal característica do grupo é que os esporos produzidos sexualmente (os ascosporos) estão contidos num saco (o ascus). Existe uma grande diversidade de estilos de vida. Alguns são parasitas saprófitos, outros necrotróficos e ainda biotróficos em plantas e animais, incluindo humanos. A variedade de habitats é diversificada, crescendo as espécies deste filo no solo e sendo comuns em partes de plantas acima do

mesmo, no entanto também são encontradas em água doce e no mar (Webster & Weber, 2007).

Por fim, os fungos do filo Basidiomycota são um grande grupo do reino dos fungos com mais de 30.000 espécies. A maioria são terrestres com esporos dispersados pelo vento, outros crescem em habitats marinhos e de água doce. Em relação ao trofismo, a maioria são saprotróficos e estão envolvidos na decomposição da matéria seca e madeira, mas há também agentes patogénicos das árvores, como o fungo mel, *Armillaria*, que ataca numerosas espécies de árvores.

Os nutrientes dos fungos saprotróficos derivam de matéria orgânica morta, como por exemplo, resíduos de culturas agrícolas, madeira de árvores mortas, esterco animal, entre outros (Chang & Miles, 2004). Os fungos comestíveis silvestres saprotróficos embora menos importantes em termos de volumes cultivados e, conseqüentemente, reduzido lucro nas vendas locais, são importantes na reciclagem de nutrientes. A nível mundial, as espécies saprotróficas são a base do negócio extremamente valioso dos cogumelos de cultura (Boa, 2004).

Por outro lado, os fungos que vivem no solo em associação simbiótica com raízes de plantas vasculares em florestas e nos ecossistemas florestais, são muito importantes ecologicamente e economicamente. Estas associações são denominadas micorrízicas (fungos associados a raiz). Existem alguns cogumelos micorrízicos, no entanto é difícil cultivá-los pois eles são produtos de um fungo associado a uma raiz. Estes cogumelos têm uma relação simbiótica mutualista com árvores. Nestas parcerias, os fungos obtêm os seus glúcidos a partir das raízes da planta. Estas, por sua vez, obtêm nutrientes minerais inorgânicos absorvidos do solo por micélios de fungos. Os fungos micorrízicos nas raízes das plantas têm, de facto, demonstrado estimular fortemente o crescimento dos seus hospedeiros (Chang & Miles, 2004; Martins, 2008).

Os fungos comestíveis silvestres desempenham um papel ecológico importante. Muitas das espécies vivem simbioticamente com árvores e essa associação micorrízica sustenta o crescimento das florestas nativas e plantações comerciais em zonas temperadas e tropicais (Boa, 2004).

1.2. Valor nutricional dos cogumelos

Os cogumelos são apreciados em todo o mundo, não só pela sua textura e sabor, mas também pelas suas propriedades químicas e nutricionais (Kalač, 2009). Os cogumelos silvestres são ricos em minerais e apresentam níveis elevados de água, proteínas, fibras e glúcidos. Além disso, também possuem baixos níveis de lípidos, tornando-os assim excelentes para serem incluídos em dietas de reduzido índice calórico (Díez & Alvarez, 2001; Agahar-Murugkar & Subbulakshmi, 2005; Heleno et al., 2009). Portanto, as espécies de cogumelos comestíveis são altamente nutritivas e daí serem comparadas com a carne, ovos e leite uma vez que revelam uma composição em aminoácidos semelhante à das proteínas animais (Longvah & Deosthale, 1998). Efetivamente, o valor nutricional dos cogumelos comestíveis silvestres não deve ser subestimado pois estes são também equiparados com muitos vegetais e, em muitos casos, apresentam melhores propriedades nutricionais (Boa, 2004).

O consumo de cogumelos silvestres comestíveis é crescente e, em alguns países da Europa Central e de Leste, é preferencial relativamente aos cogumelos cultivados (Kalač, 2009). Em mais de 80 países, estes fungos comestíveis silvestres são cultivados para alimentação ou então são vendidos como forma de ganhar dinheiro. O cultivo e o consumo varia de país para país, desde a intensiva e extensiva utilização na China, até a utilização mais restrita na América do Sul. Os cogumelos são consumidos como uma iguaria, principalmente por apresentarem aroma e textura específicos. Os corpos de frutificação frescos ou preservados de dezenas de espécies podem ser confeccionados, na culinária, de inúmeras formas. No entanto, o conhecimento do valor nutricional de cogumelos silvestres é limitado comparativamente ao dos vegetais (Kalač, 2009).

Diversos autores descrevem os cogumelos como fontes de aminoácidos (Léon-Guzmán et al., 1997; Longvah & Deosthale, 1998; Díez et al., 2001; Mdachi et al., 2004; Ribeiro et al., 2008; Kalač, 2009; Ouzouni et al., 2009), sendo os mais abundantes apresentados na **Figura 3** (Ferreira, 2011). A análise destas moléculas foi efetuada por diferentes técnicas incluindo cromatografia de troca iónica acoplada a um analisador automático (Longvah & Deosthale, 1998), reação com ninidrina em analisador automático (Ouzouni et al., 2009), cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) (Léon-Guzmán et al., 1997), cromatografia líquida

de alta eficiência (HPLC) com detecção UV-vis (Ribeiro et al., 2008) e HPLC-fluorescência (Mdachi et al., 2004).

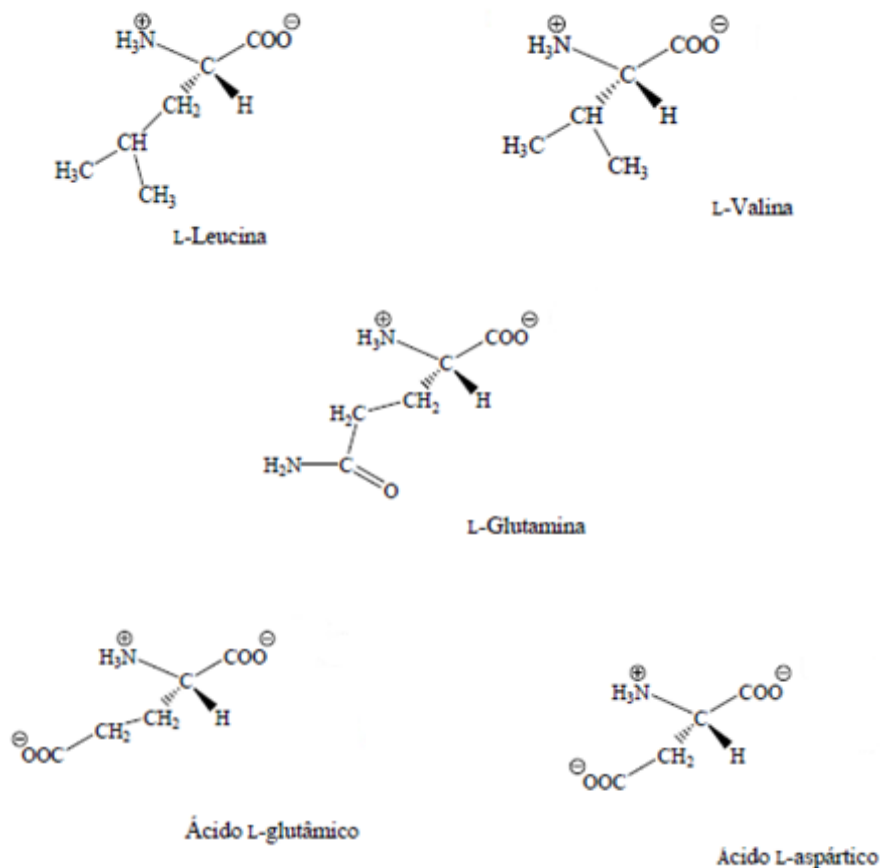


Figura 3: Estrutura química dos aminoácidos mais abundantes em cogumelos silvestres (Ferreira, 2011).

Para além de monómeros de proteínas, os α -aminoácidos são metabolitos energéticos e precursores de vários compostos biologicamente importantes tais como heme, glutatona, muitas hormonas, nucleótidos, coenzimas de nucleótidos, amins fisiologicamente ativas (neurotransmissores) (Voet et al., 2004).

Ao contrário das proteínas, os lípidos apresentam-se em baixas quantidades nos cogumelos, conferindo assim um carácter mais saudável a este tipo de alimento. Segundo estudos efetuados anteriormente, alguns dos lípidos encontrados em cogumelos incluem ácidos gordos livres, lípidos complexos de reserva tais como acilgliceróis (mono-, di- e triglicéridos), lípidos complexos com função estrutural tais

como fosfolípidos (maioritariamente fosfatidilcolina; **Figura 4**) e lípidos simples como os esteróides (Mattila et al., 2002; Kalač, 2009; Ferreira, 2011).

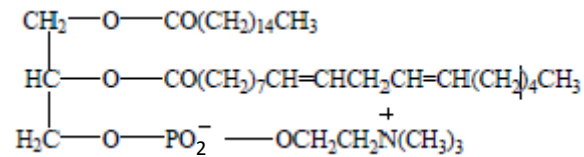


Figura 4: Estrutura química de uma fosfatidilcolina (lecitina) (Ferreira, 2011).

Os ácidos gordos insaturados são essenciais na dieta humana, no entanto, os ácidos gordos saturados podem ser prejudiciais à saúde. Estruturalmente, os ácidos gordos de cadeia linear monoinsaturados e polinsaturados agem como reguladores do metabolismo lipídico em diferentes níveis. Os ácidos linoleico e linolénico (dois ácidos gordos de cadeia longa) são fundamentais para a dieta humana denominando-se assim de ácidos gordos essenciais, sendo que, a falta destes na dieta ou um metabolismo ineficiente têm sido implicados na etiologia e progressão de várias doenças (Chang & Miles, 2004). Do ponto de vista nutricional, importa realçar os ácidos gordos. Os mais abundantes em cogumelos silvestres são os ácidos linoleico, oleico e palmítico (Ferreira, 2011; **Figura 5**).

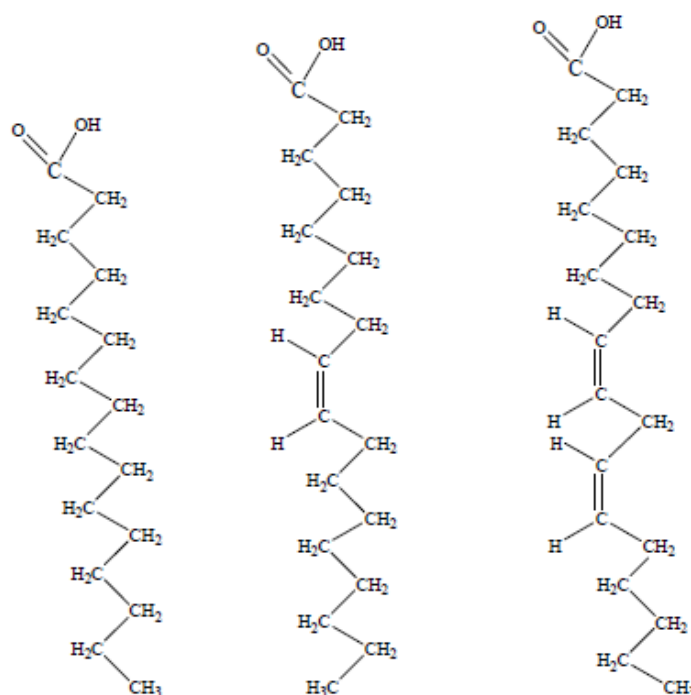


Figura 5: Estrutura química do ácido palmítico (16:0), ácido oleico (18:1 Δ^9) e ácido linoleico (18:2 $\Delta^{9,12}$) (Ferreira, 2011).

Os ácidos linoleico e oleico são comuns em organismos eucariotas, nomeadamente fungos, sendo raros em bactérias. O ácido palmítico é comum em vários tipos de organismos (Karlinski et al., 2007). O ácido linoleico é um ácido gordo essencial para os mamíferos já que estes não conseguem sintetizá-lo, tendo que os adquirir na dieta alimentar. É precursor do ácido araquidónico e da biossíntese de prostaglandinas, compostos de função análoga à das hormonas e que, em quantidades pequenas ou mesmo vestigiais, exercem efeitos determinantes em várias atividades fisiológicas, produzindo efeitos em doenças cardiovasculares, níveis de triglicéridos, pressão sanguínea e artrite (Lehninger et al., 2008; Ribeiro et al., 2009). O ácido linoleico é também precursor do oct-1-en-3-ol, conhecido como “álcool dos fungos”, o principal componente aromático na maioria dos fungos e que contribui para o sabor dos cogumelos (Maga, 1981).

Deste modo, o facto dos cogumelos terem um alto teor de ácidos gordos insaturados em relação aos saturados, e uma alta percentagem de ácido linoleico,

valoriza o seu consumo numa perspetiva de alimento saudável (Chang & Miles, 2004). No entanto, é de salientar que a composição de ácidos gordos nos cogumelos é variável de acordo com a espécie (Yilmaz, 2006).

Os glúcidos são outros macronutrientes presentes nos cogumelos. Recentemente, verifica-se um elevado interesse em caracterizar os componentes dos polissacáridos solúveis em água, obtidos a partir dos corpos de frutificação de cogumelos, devido à sua capacidade de inibir o crescimento de tumores (Chang & Miles, 2004). De acordo com vários trabalhos de investigação, o manitol e a trealose (**Figura 6**) são, respetivamente, o derivado de açúcar e o açúcar mais abundante nos cogumelos (Barros et al., 2007a; Barros et al., 2007b; Barros et al., 2007c; Barros et al., 2008a; Barros et al., 2008b; Heleno et al., 2009; Kalač, 2009; Ferreira, 2011).

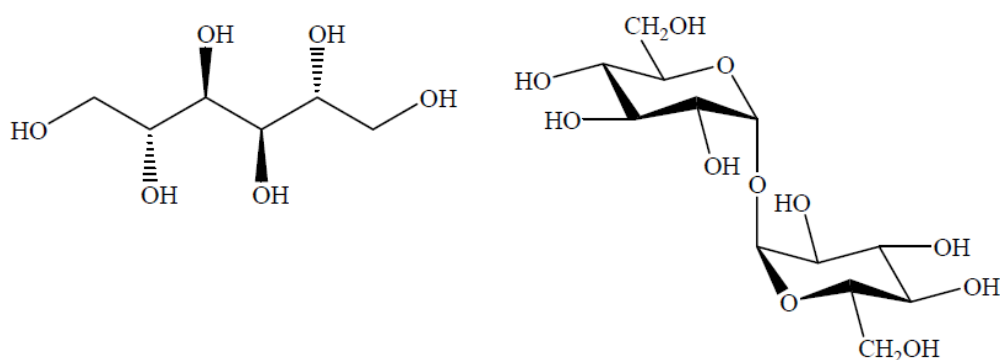


Figura 6: Estrutura química do D-Manitol e da Trealose (Ferreira, 2011).

Os álcoois derivados de açúcares, nomeadamente o manitol, garantem o suporte e expansão do corpo frutífero dos cogumelos (Barros et al., 2008b). Efetivamente, os açúcares constituem o tronco principal do metabolismo energético celular podendo também ser utilizados na constituição de polissacáridos de reserva ou estruturais (Quintas et al., 2008). Os açúcares são apenas uma pequena parte do conteúdo total de glúcidos, isto porque, os cogumelos silvestres são ricos em polissacáridos tais como glicogénio (polissacárido de reserva nos cogumelos), β -glucanos e quitina (polímeros estruturais) (Kalač, 2009; Ferreira, 2011).

1.3. Potencial antioxidante dos cogumelos

Os cogumelos são também conhecidos como alimentos funcionais e como uma fonte para o desenvolvimento de fármacos e nutracêuticos (Chang, 1999; Barros et al., 2007) nomeadamente de compostos antioxidantes (Yen et al., 2000; Yang et al., 2002; Mau et al., 2004; Cheung et al., 2005; Lo et al., 2005).

A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes é uma condição essencial para o funcionamento normal do organismo. Quando este equilíbrio tende para a produção de radicais livres dizemos que o organismo está em *stress* oxidativo, e nestas situações os radicais livres em excesso podem oxidar e danificar lípidos celulares, proteínas e DNA, inibindo a sua função normal e conduzindo a várias doenças (Valko et al., 2007; Ferreira et al., 2009).

O *stress* oxidativo pode ter causas naturais, como o que ocorre em situações de exercício físico extremo, ou em processos de inflamação; mas pode também ter causas não naturais como a presença de xenobióticos no organismo ou em situações relacionadas com várias doenças (**Figura 7**). De facto, a produção não controlada de radicais livres foi já associada como causa, ou como estando relacionada com mais de uma centena de doenças incluindo: vários tipos de cancro, diabetes, cirrose, doenças cardiovasculares e desordens do foro neurológico, entre outras (Halliwell et al., 1984; Halliwell, 1996; Valko et al., 2007). A sobreprodução de ROS (espécies reativas de oxigénio) tem sido inclusivamente relacionada com o processo de envelhecimento (Lachance et al., 2001).

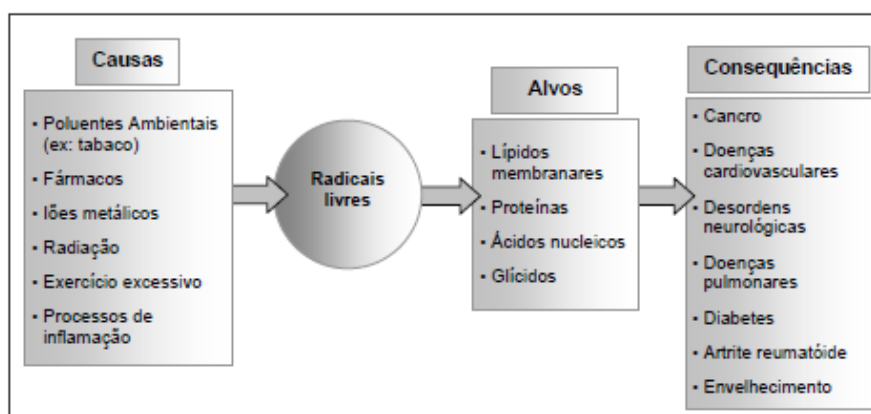


Figura 7: Principais causas e consequências da ação dos radicais livres (Ferreira et al., 2009).

Considerando a estimativa de que 70% das doenças crónicas e dos custos associados podem ser prevenidos, facilmente se compreende a primordial importância do conhecimento, e se possível, do controle da produção excessiva de ROS (Fries et al., 1993). Este controle pode ser obtido assegurando níveis adequados de antioxidantes e quelantes de radicais livres; quer melhorando a qualidade da dieta (maior consumo de vegetais, leguminosas e frutos), quer evitando comportamentos conducentes a uma maior produção de radicais livres e ROS como o tabaco e a exposição excessiva a poluentes ambientais e xenobióticos (Lachance et al., 2001).

Os cogumelos comestíveis são considerados como uma boa fonte de várias vitaminas, incluindo a tiamina (vitamina B₁), riboflavina (vitamina B₂), niacina, biotina e ácido ascórbico (Chang & Miles, 2004). As vitaminas, substâncias de natureza orgânica são importantes para uma alimentação equilibrada e saudável contribuindo assim para o crescimento e manutenção da saúde humana (Ferreira, 1983).

A vitamina E apresenta extrema relevância quanto à composição nutricional dos cogumelos. Trata-se de uma vitamina lipossolúvel com atividade antioxidante altamente eficaz protegendo as membranas celulares contra danos oxidativos e intervém também na atividade anti-tumoral (Mitchel & McCann, 2003). O termo vitamina E é usado frequentemente para designar uma família de compostos quimicamente relacionados, isto é, tocoferóis e tocotrienóis. Segundo o seu papel captador de radicais livres, esta vitamina parece ter como funcionalidade proteger o nosso organismo de várias disfunções degenerativas, nomeadamente cancro e doenças cardiovasculares (Fang et al., 2002). Nos cogumelos foram apenas detetados tocoferóis (**Figura 8**), antioxidantes naturais muito importantes nos alimentos, especialmente naqueles que são ricos em ácidos gordos polinsaturados (Ferreira, 2011).

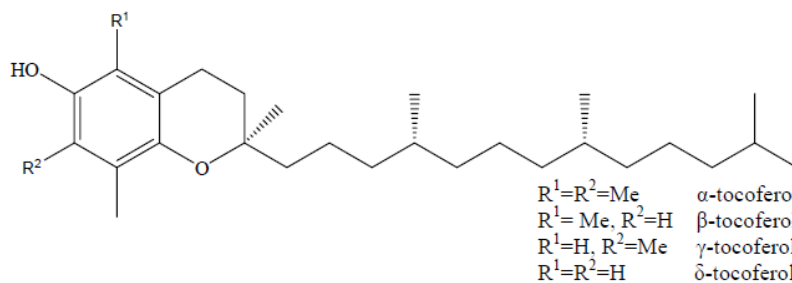


Figura 8 : Estrutura química de tocoferóis (Ferreira, 2011).

No que diz respeito à eficácia desta vitamina como um antioxidante, pode-se dizer que não depende apenas da reatividade que apresenta em relação a radicais prejudiciais, mas também da natureza relativamente estável do seu radical devido à deslocalização do eletrão desemparelhado sobre o anel cromanol (Kagan et al., 2003).

O ácido ascórbico, mais em concreto a vitamina C, é um dos açúcares-ácidos mais importantes e abundantes nos cogumelos, sendo uma γ -lactona com um grupo enodiol nos carbonos 2 e 3 (Lehninger et al., 2008; **Figura 9**).

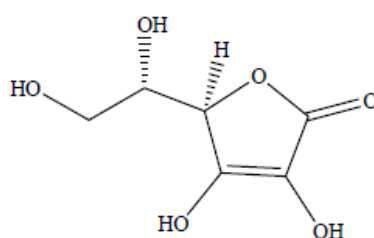


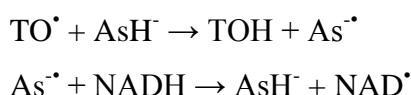
Figura 9: Estrutura química e tridimensional do ácido L-ascórbico (Ferreira, 2011).

Determinados cientistas consideram esta vitamina como uma “universal panacea” devido às suas características bioquímicas e funções gerais farmacológicas (Yi et al., 2009). O ácido ascórbico parece exercer um papel protetor contra algumas doenças relacionadas com o *stress* oxidativo, nomeadamente cancro e doenças cardiovasculares (Lehninger et al., 2008).

Portanto, pode-se afirmar que os principais antioxidantes naturais que estão presentes nos alimentos são as Vitaminas E e C.

Existem interações cooperativas entre estas vitaminas que atuam sinergisticamente na interface membrana-citosol de maneira a regenerar a forma de Vitamina E oxidada ligada à membrana (Chew, 1995; Nagaoka et al., 2007). A Vitamina E (tocoferóis), como antioxidante lipofílico pode interagir com componentes lipídicos das membranas celulares ou com lipoproteínas de baixa densidade, protegendo-os de danos oxidativos. Face a esta interação, resulta uma oxidação dos tocoferóis que são transformados em radicais tocoferoxilo reativos que, por sua vez, podem reagir com lípidos insaturados ($TO^{\bullet} + LH \rightarrow TOH + L^{\bullet}$) ou hidropéroxidos

lipídicos ($\text{TO}^\bullet + \text{LOOH} \rightarrow \text{TOH} + \text{LOO}^\bullet$), iniciando a oxidação lipídica (efeito pró-oxidante). Para evitar este efeito, a Vitamina E oxidada pode ser novamente reduzida à sua forma antioxidante através de substâncias redutoras em fase aquosa como o ácido ascórbico. Posteriormente o ácido ascórbico (ião ascorbato, AsH^-) reage rapidamente com o radical tocoferoxilo formando o radical ascorbato (semidesidroascorbato) que regenera o ião ascorbato numa reacção catalisada pela semidesidroascorbato redutase (Li e Schellhorn, 2007; Nagaoka et al., 2007).



Por outro lado, o ascorbato pode sequestrar no plasma radicais aquosos antes destes poderem oxidar a Vitamina E da fase lipídica. As interações entre estes antioxidantes são muito importantes na protecção das células, uma vez que a concentração individual de cada antioxidante pode não ser suficiente para proteger de forma efetiva as células da peroxidação lipídica (Chew, 1995).

O β -caroteno é um carotenóide que pertence à classe dos terpenos (lípidos simples). Apresenta uma estrutura poliisoprénica com uma longa cadeia de ligações duplas conjugadas responsável pela sua reatividade química e propriedades de absorção de luz. Em cada extremidade, a molécula apresenta um ciclo-hexeno substituído (Lehninger et al., 2008; **Figura 10**).

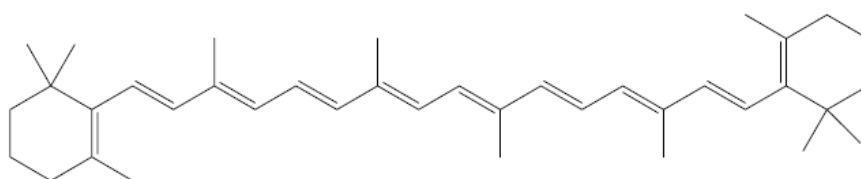


Figura 10: Estrutura química e tridimensional do β -caroteno (Ferreira, 2011).

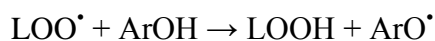
Os carotenóides funcionam como antioxidantes dos quais interrompem reacções em cadeia em ambiente lipídico. A presença de várias ligações duplas torna os carotenóides suscetíveis ao ataque dos radicais peroxilo (LOO^\bullet), originando produtos inativos (Chew, 1995). É de salientar também, o facto dos carotenóides parecerem

exercer efeitos benéficos na prevenção de doenças nomeadamente cancro, doenças cardiovasculares e osteoporose (Rao & Rao, 2007).

No que diz respeito aos compostos fenólicos, efetivamente os cogumelos contêm vários dos quais são reconhecidos como excelentes antioxidantes devido à sua capacidade para captar radicais livres por transferência de um único eletrão e às excelentes propriedades redox dos seus grupos hidroxilos fenólicos (Bors et al., 1987). Os compostos fenólicos mais comuns em cogumelos silvestres são ácidos fenólicos, nomeadamente ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos (Ferreira et al., 2009).

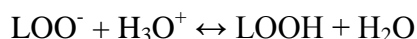
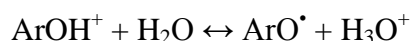
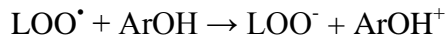
A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos (ArOH) parece estar relacionada com os grupos fenólicos através de mecanismos de transferência de:

(i) átomos de hidrogénio (exemplificada para o processo de peroxidação lipídica):



O radical ArO^{\bullet} deve ser relativamente estável para que reaja lentamente com o substrato LH, mas rapidamente com LOO^{\bullet} , interrompendo as reações em cadeia (Wright et al., 2001).

(ii) eletrão (exemplificada para o processo de peroxidação lipídica):



A atividade antioxidante de extratos ricos em compostos fenólicos é normalmente correlacionada com o teor de fenóis totais e estes são quantificados segundo o ensaio de Folin-Ciocalteu (Palácios et al., 2011). Ultimamente é notória a expansão constante do setor de cogumelos no que diz respeito às suas propriedades medicinais (Chang & Miles, 2004).

Uma dieta adequada que envolva o consumo de antioxidantes pode minimizar os riscos de cancro (efeito quimiopreventivo). Assim sendo, é de máxima relevância encontrar antioxidantes naturais para utilização na alimentação com o objetivo de retardar a oxidação lipídica ou em aplicações farmacêuticas para doenças crónicas relacionadas com a produção de radicais livres (Prior, 2003).

1.4. Objetivos

O presente trabalho teve como principais objetivos avaliar os efeitos do trofismo de cogumelos silvestres comestíveis do Nordeste de Portugal no seu potencial nutricional e nutracêutico, estudando as suas propriedades antioxidantes *in vitro* e comparando os resultados com compostos individuais identificados por técnicas cromatográficas.

As espécies de cogumelos silvestres estudadas foram as seguintes:

Saprotroficas- *Calvatia utriformis*, *Clitopilus prunulus*, *Lycoperdon echinatum*, *Lyophyllum decastes* e *Macrolepiota excoriata*;

Micorrízicas- *Boletus erythropus*, *Boletus fragrans*, *Hygrophorus pustulatus*, *Russula cyanoxantha* e *Russula olivacea*,

O seu valor nutricional foi obtido após determinação da humidade, proteínas, lípidos, glúcidos e cinzas. A sua composição química foi também estudada nomeadamente em mono e oligossacáridos (açúcares) e ácidos gordos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC/RI) e cromatografia gasosa acoplada a um detetor de ionização de chama (GC/FID), respetivamente, tocoferóis por HPLC-fluorescência, ácido ascórbico e fenóis por técnicas espectrofotométricas.

As propriedades antioxidantes foram estudadas através do efeito captador de radicais livres, poder redutor e inibição da peroxidação lipídica, e relacionadas com alguns compostos identificados nas espécies estudadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Biológico

Cinco espécies de cogumelos comestíveis silvestres saprotróficos, nomeadamente *Calvatia utriformis* (Bull.) Jaap., *Clitopilus prunulus* (Scop. ex Fr.) P. Kumm, *Lycoperdon echinatum* Pers., *Lyophyllum decastes* (Fries: Fries) Singer e *Macrolepiota excoriata* (Schaeff.) M.M. Moser e cinco espécies de cogumelos comestíveis silvestres micorrízicos, designadamente *Boletus erythropus* (Pers.), *Boletus fragrans* (Vittadini), *Hygrophorus pustulatus* (Persoon:Fries) Fries, *Russula cyanoxantha* (Schaeff.) Fr. e *Russula olivacea* (Schaeff.) Fr. foram colhidas em Bragança (Nordeste de Portugal). Na Tabela 1 encontra-se a caracterização das espécies estudadas, onde se poderá ter informação sobre a identificação taxonómica, sendo esta efetuada, de acordo com vários autores (Bon, 1988; Courtecuisse & Duhem, 2005; Frade & Afonso, 2005).

Exemplares representativos de cada uma das espécies foram depositados no herbário da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança. Todas as amostras foram liofilizadas (Ly-8-FM-ULE, Snijders, Holanda), reduzidas a pó (20 mesh) e mantidas a -20°C até posterior análise.

Tabela 1: Informação sobre as espécies de cogumelos comestíveis analisadas.

Nome científico	Habitat	Data de colheita	Ecologia
<i>Calvatia utriformis</i> (Bull.) Jaap.	Misto	Outubro 2009	Saprotrofico
<i>Clitopilus prunulus</i> (Scop. ex Fr.) P. Kumm	Misto	Novembro 2009	Saprotrofico
<i>Lycoperdon echinatum</i> Pers.	Pinus sp.	Novembro 2009	Saprotrofico
<i>Lyophyllum decastes</i> (Fries: Fries) Singer	Misto	Novembro 2009	Saprotrofico
<i>Macrolepiota excoriata</i> (Schaeff.) M.M. Moser	Misto	Outubro2009	Saprotrofico
<i>Boletus erythropus</i> (Pers.)	<i>Castanea sativa</i>	Outubro 2010	Micorrízico
<i>Boletus fragrans</i> (Vittadini)	<i>Castanea sativa</i>	Outubro2010	Micorrízico
<i>Hygrophorus pustulatus</i> (Persoon : Fries) Fries	Pinus sp.	Novembro 2009	Micorrízico
<i>Russula cyanoxantha</i> (Schaeff.) Fr.	Misto	Outubro 2010	Micorrízico
<i>Russula olivacea</i> (Schaeff.) Fr.	Quercus sp.	Outubro 2010	Micorrízico

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). A mistura padrão com 37 ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) (referência 47885-U) foi adquirida da Sigma (St. Louis, MO, EUA), assim como outros isómeros individuais de ácidos gordos, o ácido gálico, o ácido L-ascórbico, os tocoferóis (isoformas α , β , γ e δ), os padrões de açúcares (D(-)-frutose, D(-)-manitol e D(+)-trealose) e o trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico). A solução de tocol racémico, 50 mg/ml, foi adquirida da Matreya (PA, EUA). O 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) foi obtido da Alfa Aesar (Ward Hill, MA, EUA). Todos os outros produtos químicos e solventes eram de grau analítico e foram adquiridos a partir de fontes comuns. A água foi tratada com um sistema de purificação de água Milli-Q (TGI Pure Water Systems, EUA).

2.3. Determinação de macronutrientes

As amostras foram analisadas quanto à composição química, nomeadamente, humidade, proteínas, lípidos, glúcidos e cinzas de acordo com os procedimentos oficiais de análise (AOAC, 1995).

O teor proteico ($N \times 4,38$) presente nas amostras foi estimado pelo método macro-Kjeldahl; o teor lipídico foi determinado após extração em soxhlet com éter de petróleo de uma massa conhecida de amostra; as cinzas foram determinadas por incineração a 600 ± 15 °C; os glúcidos foram calculados por diferença: Glúcidos = $100 - (g \text{ proteínas} + g \text{ cinzas} + g \text{ lípidos})$. A energia total foi calculada através da seguinte equação: Energia (kcal) = $4 \times (g \text{ proteínas} + g \text{ glúcidos}) + 9 \times (g \text{ lípidos})$.

2.4. Determinação de ácidos gordos

Os ácidos gordos foram determinados por cromatografia gasosa através de um detetor de ionização de chama (GC-FID), de acordo com o procedimento otimizado e implementado no Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada da Escola

superior Agrária de Bragança (Heleno et al., 2009), após um processo de transesterificação: os ácidos gordos foram metilados com 5 ml de metanol: ácido sulfúrico 95%: tolueno 2:1:1 (v/v/v), durante pelo menos 12 h num banho a 50°C e a 160 rpm; de seguida, adicionaram-se 3 ml de água desionizada para obter uma separação de fases. Recuperaram-se os 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 objetivo 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 injetor *split/splitless*, um detetor FID e uma coluna Macherey-Nagel (30 m × 0,32 mm ID × 0,25 µm *df*). A temperatura do FID foi de 260°C. O programa de temperatura do forno foi o seguinte: a temperatura inicial da coluna foi 50°C, durante 2 min; em seguida, aumentou-se a temperatura a 30°C/min até 125 °C, 5°C/min até 160°C, 20°C/min até 180°C, 3°C/min até 200°C, 20°C/min até 220°C que foi mantida por 15 min. O gás de transporte (hidrogénio) tinha um caudal de 4,0 ml/min (0,61 bar), medido a 50°C. Utilizou-se um modo de injeção *split* (1:40) a 250 °C. O volume de amostra injetado foi de 1 µl. A identificação dos ácidos gordos foi feita por comparação dos tempos de retenção relativos das amostras com os picos dos padrões de FAME. Os resultados foram processados usando o software CSW 1.7 (DataApex 1.7) e expressos em percentagem relativa de cada ácido gordo.

2.5. Determinação de açúcares livres

Os açúcares livres foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência ligada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI), seguindo o procedimento implementado no Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada da Escola superior Agrária de Bragança (Heleno et al., 2009). Portanto, adicionou-se 1 ml do padrão interno PI (rafinose, 5 mg/ml) à amostra liofilizada (1 g) e extraiu-se com 40 ml de etanol 80% a 80°C durante 1 h e 30 min. Posteriormente, procedeu-se à filtração e evaporação do etanol (evaporador rotativo Büchi R-210). O sobrenadante foi 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, seguidamente transferido para um frasco âmbar e analisado. O volume de amostra injetado foi de 10 µl.

O equipamento de HPLC consistiu num sistema integrado com uma bomba (Knauer, Smartline 1000), sistema desgaseificador (Smartline manager 5000), amostrador automático (AS-2057 Jasco) e um detetor de RI (Knauer, Smartline 2300). A separação cromatográfica foi conseguida com uma coluna NH₂ Eurospher 100-5 (4,6 × 250 mm, 5 µm, Knauer) operando a 30°C (forno 7971 R Grace). A fase móvel foi água desionizada/acetoneitrilo, 70:30 (v/v) com um fluxo de 1 ml/min. Os dados foram analisados utilizando o Software Clarity 2.4 (DataApex).

Os compostos foram identificados por comparação cromatográfica com padrões e a quantificação foi realizada usando o método do padrão interno. Os resultados foram expressos em g por 100 g de massa seca.

2.6. Determinação de vitaminas

A quantidade de tocoferóis presente nas amostras foi determinada seguindo um protocolo previamente otimizado e implementado no Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada da Escola Superior Agrária de Bragança (Heleno et al., 2010).

Uma solução de BHT (2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol) em hexano (10 mg/ml; 100 µl) e o padrão interno (PI) de tocol em hexano (50 µg/ml; 250 µl) foram adicionados às amostras liofilizadas antes do procedimento de extração. As amostras, com uma massa aproximada de 500 mg, foram homogeneizadas com 4 ml de metanol num vórtex cerca de 1 min. Subsequentemente, adicionou-se 4 ml de hexano e homogeneizou-se novamente no vórtex (durante 1 min). De seguida, adicionou-se 2 ml de solução saturada de NaCl, homogeneizou-se a mistura durante 1 min, centrifugou-se (centrífuga refrigerada Centurion K24OR, 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 1 ml de hexano, desidratados com sulfato de sódio anidro, filtrados através de um filtro (0,22 µm), transferidos para frascos âmbar e analisados por HPLC.

As análises foram realizadas pelo sistema de HPLC descrito anteriormente, conectado a um detetor de fluorescência (FP-2020; Jasco), programado para excitação a

290 nm e emissão a 330 nm. A separação cromatográfica foi feita com uma coluna de poliamida II (250 × 4,6 mm) de fase normal (YMC Waters) a 30°C. A fase móvel era uma mistura de hexano e acetato de etilo (70:30,v/v) com um fluxo de 1 ml/min e volume de amostra injetado foi de 20 µl.

Os compostos foram identificados através de comparação cromatográfica com padrões. A quantificação foi baseada na resposta do sinal fluorescente, usando o método do padrão interno. A quantidade de tocoferóis foi expressa em µg por 100 g de massa seca.

O ácido ascórbico foi determinado após a amostra liofilizada (150 mg) ter sido extraída com ácido metafosfórico (1%, 10 ml) durante 45 min à temperatura ambiente e filtrada através de um papel de filtro Whatman n.º 4. De seguida, o filtrado (1 ml) foi misturado com 2,6-dicloro-indofenol (9 ml) e, após 30 min, mediu-se a absorvância a 515 nm (Espectrofotómetro AnalytikJena 200). O teor de ácido ascórbico foi determinado com base na curva de calibração de ácido L-ascórbico (6×10^{-3} - 0.1 mg/ml), e os resultados foram expressos em mg de ácido ascórbico por 100 g de massa seca.

2.7. Determinação de fenóis totais

As amostras (~1,5 g) foram submetidas a uma extração líquido-sólido, com 40 ml de metanol durante 1 h (25°C a 150 rpm) e filtradas com papel Whatman n.º 4. O resíduo foi posteriormente extraído com 20 ml de metanol. Os extratos metanólicos combinados foram evaporados a 35°C; o resíduo foi novamente dissolvido em metanol de modo a atingir-se uma concentração de 20 mg/ml e armazenado a 4°C até posterior utilização.

Os fenóis presentes nos extratos metanólicos foram determinados segundo o ensaio de Folin-Ciocalteu. A solução de extrato (1 ml) foi misturada com o reagente de Folin-Ciocalteu (5 ml, previamente diluído com água 1:10, v/v) e carbonato de sódio (75 g/l, 4 ml). Os tubos foram agitados no vórtex durante 15 s e deixou-se repousar por 30 min a 40°C para o desenvolvimento de cor. A absorvância foi medida a 765 nm. Na elaboração da curva padrão utilizou-se ácido gálico (9.4×10^{-3} - 0.15 mg/ml) e os resultados foram apresentados em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de extrato.

2.8. Avaliação da atividade antioxidante

Para avaliar a atividade antioxidante das amostras foram utilizados ensaios *in vitro* implementados no Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada da Escola superior Agrária de Bragança (Helena et al., 2010). Utilizaram-se soluções dos extratos com diferentes concentrações, com a finalidade de encontrar valores de EC₅₀ (concentração de extrato correspondente a 50% de atividade antioxidante ou a 0,5 de absorvância no ensaio do poder redutor), obtidos a partir dos gráficos de potencial antioxidante em função da concentração do extrato. Utilizou-se o trolox como controlo positivo.

2.8.1. Atividade captadora de radicais DPPH

Este ensaio foi realizado num Leitor de microplacas (Bio-Tek ELX800). A mistura de reação em cada um dos 96 poços da microplaca consistia em soluções dos extratos com diferentes concentrações (30 µl) e solução metanólica de radicais DPPH (270 µl a uma concentração de 6×10^{-5} mol/l). A mistura foi deixada no escuro durante 60 min (até estabilização dos valores de absorvância). A redução do radical DPPH foi avaliada medindo a absorvância a 515 nm. A atividade captadora do radical (ACR) foi calculada pela percentagem de descoloração de DPPH utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ ACR} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{A}})/A_{\text{DPPH}}] \times 100, \text{ onde:}$$

A_{A} corresponde à absorvância da solução contendo a amostra de extrato de cada concentração em particular, e A_{DPPH} corresponde à absorvância da solução de DPPH.

2.8.2. Poder Redutor

O poder redutor foi realizado utilizando o Leitor de microplacas mencionado anteriormente. As soluções dos extratos com diferentes concentrações (0,5 ml) foram misturadas com tampão fosfato de sódio (0,5 ml, 200 mM, pH 6,6) e ferricianeto de potássio (1% m/v, 0,5 ml). A mistura foi incubada a 50°C durante 20 min e depois

adicionou-se ácido tricloroacético (10%, 0,5 ml). De seguida, a mistura (0,8 ml) foi colocada numa microplaca de 48 poços, assim como, a água desionizada (0,8 ml) e o cloreto de ferro (0,1% w/v; 0,16 ml) sendo, posteriormente, medida a absorvância a 690 nm.

2.8.3. *Inibição da descoloração do β -caroteno*

A solução de β -caroteno foi preparada por dissolução de β -caroteno (2 mg) em clorofórmio (10 ml). A partir desta solução, pipetaram-se 2 ml para um balão de fundo redondo. Após remoção do clorofórmio da solução de β -caroteno a 40°C sob vácuo, procedeu-se à adição de ácido linoleico (40 mg), emulsificador Tween 80 (400 mg) e água destilada (100 ml) agitando vigorosamente. Transferiram-se alíquotas (4,8 ml) desta emulsão para diferentes tubos de ensaio contendo soluções dos extratos com diferentes concentrações (0,2 ml). 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 descoloração do β -caroteno foi calculada utilizando a seguinte equação: $[(A_{470} \text{ após } 2\text{h}/A_{470} \text{ inicial}) \times 100]$.

2.9. 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 desvios padrão (SD). Os resultados obtidos foram analisados pela análise da variância (ANOVA) seguida de um teste de Tukey com $\alpha=0.05$. Este tratamento foi efetuado utilizando o software SPSS v. 16.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados relativos à composição química e ao valor energético dos cogumelos comestíveis silvestres saprotróficos e micorrízicos são apresentados na Tabela 2. Os teores de humidade variaram entre 78,00 g/100 g de massa fresca na espécie *Boletus fragrans* e 93,03 g/100 g de massa fresca na espécie *Hygrophorus pustulatus*. Quanto ao teor proteico, este foi elevado e variou entre 16,80 g/100 g de massa seca para a espécie *Russula cyanoxantha* e 25,52 g/100 g de massa seca para *Lyophyllum decastes*. O teor lipídico variou entre 0,75 g/100 g de massa seca em *Boletus erythropus* e 3,06 g/100 g de massa seca em *Hygrophorus pustulatus*, o que torna os cogumelos comestíveis silvestres ideais para serem incluídos numa dieta de baixo índice calórico. O teor em glúcidos, calculado por diferença conhecendo o teor proteico e lipídico, revelou estas moléculas como sendo macronutrientes abundantes e os seus níveis variaram entre 43,38 g/100 g de massa seca para a espécie *Russula olivacea* e 76,29 g/100 g de massa seca para *Boletus fragrans*. No que diz respeito ao teor em cinzas, este variou entre 4,74 g/100 g de massa seca em *Boletus fragrans* e 37,78 g/100 g de massa seca em *Russula olivacea*. Com base na análise nutricional descrita, observou-se que 100 g de massa seca destes cogumelos garante, em média, 335 kcal. Os valores de energia mais elevados foram encontrados na espécie *Boletus fragrans*, enquanto que a espécie que apresentou a menor contribuição energética foi *Russula olivacea* (Tabela 2). Com base na sua composição em macronutrientes, não foi possível distinguir os cogumelos saprotróficos dos micorrízicos. Na realidade, as proporções encontradas dos diferentes macronutrientes estão, em média, de acordo com outros estudos em diferentes espécies de cogumelos (Heleno et al., 2009; Kalač, 2009).

Tabela 2: Composição nutricional e valor energético das espécies de cogumelos silvestres comestíveis saprotróficos e micorrízicos.

 Em cada coluna, letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Amostras	Humidade (g/100 g fw)	Lípidos (g/100 g dw)	Proteínas (g/100 g dw)	Cinzas (g/100 g dw)	Glúcidos (g/100 g dw)	Energia (kcal/100 g dw)
<i>Calvatia utriformis</i>	78,00 ± 1,36 e	1,90 ± 0,01 cb	20,37 ± 0,49 bcd	17,81 ± 0,22 d	59,91 ± 0,40 c	338,26 ± 0,61 d
<i>Clitopilus prunulus</i>	89,78 ± 1,46 b	1,01 ± 0,06 ed	18,13 ± 0,37 cd	30,19 ± 2,50 b	50,66 ± 2,21 d	284,30 ± 5,80 f
<i>Lycoperdon echinatum</i>	85,24 ± 0,48 cd	1,22 ± 0,20 ed	23,52 ± 2,20 ba	9,43 ± 0,23 e	65,83 ± 2,09 b	368,34 ± 0,66 bc
<i>Lyophyllum decastes</i>	87,38 ± 1,40 cb	2,10 ± 0,12 b	25,52 ± 3,49 a	7,38 ± 0,64 fe	64,99 ± 2,96 cb	380,98 ± 1,82 ba
<i>Macrolepiota excoriata</i>	88,92 ± 1,57 b	1,55 ± 0,10 cd	25,28 ± 2,64 a	28,98 ± 1,11 cb	44,19 ± 2,14 e	291,84 ± 3,51 fe
<i>Boletus erythropus</i>	88,36 ± 1,49 b	0,75 ± 0,02 e	20,92 ± 0,05 bc	25,90 ± 0,28 c	52,44 ± 0,20 d	300,15 ± 0,88 e
<i>Boletus fragrans</i>	77,99 ± 0,07 e	1,83 ± 0,17 cb	17,15 ± 0,04 d	4,74 ± 0,19 f	76,29 ± 0,27 a	390,19 ± 0,06 a
<i>Hygrophorus pustulatus</i>	93,03 ± 0,79 a	3,06 ± 0,51 a	18,64 ± 0,40 cd	14,04 ± 0,14 d	64,26 ± 0,72 cb	359,16 ± 1,40 c
<i>Russula cyanoxantha</i>	85,44 ± 0,99 cd	1,52 ± 0,52 cd	16,80 ± 0,06 d	7,03 ± 0,87 fe	74,65 ± 1,01 a	379,46 ± 0,61 ba
<i>Russula olivacea</i>	84,58 ± 1,01 d	1,99 ± 0,44 cb	16,84 ± 0,05 d	37,78 ± 5,20 a	43,38 ± 3,71 e	258,84 ± 14,71 g

fw- massa fresca; **dw-** massa seca

Na Tabela 3, apresentam-se os resultados da composição em ácidos gordos e as percentagens relativas de ácidos gordos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA) das espécies de cogumelos silvestres comestíveis saprotróficos e micorrízicos estudadas. Na maioria das amostras foram detetados até 26 ácidos gordos diferentes. O principal ácido gordo encontrado foi o ácido linoleico (C18:2n6), exceto nas espécies *Lyophyllum decastes* e *Hygrophorus pustulatus* onde o ácido oleico (C18:1n9) foi predominante, contribuindo assim para a prevalência de MUFA nas últimas duas espécies. As espécies estudadas também revelaram a presença de ácido palmítico (C16:0) como um dos principais ácidos gordos. Os UFA oleico e linoleico também foram os ácidos gordos encontrados maioritariamente em amostras de *Boletus erythropus* provenientes do Canadá (Pedneault et al., 2006) e de *Russula cyanoxantha* de Portugal (Ribeiro et al., 2009). No entanto, no presente estudo, a amostra de *Russula cyanoxantha* revelou maiores valores de ácido linoleico do que de ácido oleico (C18:2>C18:1), com predominância de PUFA. Por outro lado, uma amostra colhida em 2006, apresentou uma percentagem mais elevada de ácido oleico do que de ácido linoleico (C18:1>C18:2), com predominância de MUFA (Ribeiro et al., 2009). Não foram observadas diferenças relevantes entre os perfis de ácidos gordos das espécies estudadas de cogumelos silvestres comestíveis saprotróficos e micorrízicos.

Tabela 3: Composição em ácidos gordos (percentagem relativa) das amostras de cogumelos silvestres comestíveis saprotroficos e micorrizicos.

 Em cada coluna, letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

	<i>Calvatia utriformis</i>	<i>Clitopilus prunulus</i>	<i>Lycoperdon echinatum</i>	<i>Lyophyllum decastes</i>	<i>Macrolepiota excoriata</i>	<i>Boletus erythropus</i>	<i>Boletus fragrans</i>	<i>Hygrophorus pustulatus</i>	<i>Russula cyanoxantha</i>	<i>Russula olivacea</i>
C6:0	0,36 ± 0,04	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,10 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,02 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,09 ± 0,03	0,13 ± 0,01
C8:0	0,04 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,09 ± 0,03	0,03 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00
C10:0	0,05 ± 0,00	0,12 ± 0,04	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,09 ± 0,02	0,03 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,20 ± 0,02
C12:0	0,20 ± 0,01	0,23 ± 0,04	0,20 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,55 ± 0,02	0,27 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,37 ± 0,00	0,37 ± 0,06
C13:0	0,05 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,01 ± 0,00	nd	0,04 ± 0,01	nd
C14:0	0,48 ± 0,02	0,23 ± 0,05	0,56 ± 0,05	0,21 ± 0,00	0,22 ± 0,00	1,38 ± 0,12	0,45 ± 0,08	0,15 ± 0,04	0,39 ± 0,04	0,29 ± 0,02
C15:0	2,20 ± 0,03	0,82 ± 0,05	2,68 ± 0,42	0,62 ± 0,00	0,20 ± 0,00	1,87 ± 0,03	0,74 ± 0,07	0,43 ± 0,03	0,47 ± 0,01	0,17 ± 0,02
C16:0	13,54 ± 0,14	10,11 ± 0,30	10,82 ± 0,35	10,95 ± 0,04	17,83 ± 0,05	21,33 ± 1,46	14,91 ± 0,12	6,96 ± 0,34	12,95 ± 0,22	16,13 ± 0,39
C16:1	0,22 ± 0,03	0,78 ± 0,04	0,39 ± 0,07	0,37 ± 0,00	0,79 ± 0,01	1,23 ± 0,17	1,70 ± 0,15	0,15 ± 0,02	0,56 ± 0,04	1,31 ± 0,04
C17:0	1,12 ± 0,01	0,22 ± 0,04	0,77 ± 0,07	0,37 ± 0,00	0,17 ± 0,00	0,82 ± 0,10	0,27 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,10 ± 0,00
C18:0	2,43 ± 0,07	2,47 ± 0,11	2,08 ± 0,14	4,88 ± 0,02	1,94 ± 0,01	4,15 ± 0,02	2,39 ± 0,10	3,96 ± 0,16	11,10 ± 0,15	2,78 ± 0,03
C18:1n9	6,00 ± 0,13	20,42 ± 0,70	9,16 ± 0,66	47,43 ± 1,43	10,21 ± 0,36	14,74 ± 1,19	19,80 ± 0,81	51,53 ± 0,05	28,39 ± 1,11	25,99 ± 0,12
C18:2n6	70,29 ± 0,32	59,92 ± 1,97	69,92 ± 0,71	32,03 ± 1,39	66,19 ± 0,05	48,76 ± 0,86	56,89 ± 0,62	34,74 ± 0,39	43,65 ± 1,45	50,20 ± 0,28
C18:3n6	nd	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,00	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C18:3n3	0,57 ± 0,00	1,25 ± 0,00	0,12 ± 0,02	0,19 ± 0,00	0,07 ± 0,01	1,09 ± 0,04	0,19 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,03	0,06 ± 0,02
C20:0	0,34 ± 0,01	0,37 ± 0,07	0,42 ± 0,07	0,35 ± 0,00	0,14 ± 0,00	0,44 ± 0,02	0,19 ± 0,01	0,21 ± 0,04	0,13 ± 0,00	0,39 ± 0,02
C20:1	0,06 ± 0,01	0,25 ± 0,02	0,06 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,05 ± 0,00	nd	0,13 ± 0,03	0,16 ± 0,03	0,08 ± 0,00	0,05 ± 0,01

C20:2	0,07 ± 0,02	0,31 ± 0,03	0,06 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,07 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00
C20:3n6	nd	0,06 ± 0,03	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,02	nd	nd	0,06 ± 0,00	nd	nd	0,04 ± 0,01
C20:4n6	nd	0,18 ± 0,01	0,29 ± 0,04	0,18 ± 0,02	0,02 ± 0,00	nd	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	nd	nd
C20:3n3+C21:0	0,04 ± 0,00	0,08 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,07 ± 0,02	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,02 ± 0,00	nd
C20:5n3	0,20 ± 0,02	0,19 ± 0,01	0,20 ± 0,02	0,11 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,12 ± 0,00	0,53 ± 0,02
C22:0	0,78 ± 0,08	0,66 ± 0,04	0,74 ± 0,07	0,62 ± 0,01	0,28 ± 0,04	0,74 ± 0,17	0,42 ± 0,01	0,54 ± 0,06	0,30 ± 0,03	0,48 ± 0,02
C23:0	0,15 ± 0,04	0,39 ± 0,13	0,27 ± 0,04	0,40 ± 0,04	0,13 ± 0,05	0,42 ± 0,08	0,15 ± 0,03	0,06 ± 0,01	0,12 ± 0,03	0,09 ± 0,02
C24:0	0,65 ± 0,04	0,72 ± 0,09	0,79 ± 0,04	0,71 ± 0,00	1,26 ± 0,22	1,54 ± 0,13	0,89 ± 0,03	0,61 ± 0,11	0,67 ± 0,05	0,59 ± 0,03
C24:1	0,19 ± 0,03	0,07 ± 0,01	0,14 ± 0,03	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,09 ± 0,03	0,24 ± 0,03	nd	0,03 ± 0,00	0,04 ± 0,01
SFA	22,37 ± 0,22c	16,45 ± 0,84 f	19,45 ± 0,11 e	19,31 ± 0,03 e	22,49 ± 0,29 c	33,62 ± 1,78 a	20,75 ± 0,09 d	13,18 ± 0,39 g	26,90 ± 0,36 b	21,75 ± 0,39 dc
MUFA	6,47 ± 0,11 i	21,51 ± 0,83 e	9,75 ± 0,56 h	47,94 ± 1,44 b	11,10 ± 0,37 g	16,06 ± 0,99 f	21,86 ± 0,71e	51,85 ± 0,01a	29,06 ± 1,06 c	27,40 ± 0,07 d
PUFA	71,16 ± 0,33 a	62,04 ± 1,67 c	70,80 ± 0,67 a	32,75 ± 1,41 h	66,41 ± 0,08 b	50,32 ± 0,80 e	57,38 ± 0,62 d	34,98 ± 0,39 g	44,04 ± 1,43 f	50,85 ± 0,32 e

nd- não detetado; C- átomos carbono; SFA – ácidos gordos saturados; MUFA – ácidos gordos monoinsaturados; PUFA – ácidos gordos polinsaturados.

No que diz respeito à composição em açúcares livres, os que predominam nos cogumelos silvestres comestíveis estudados são o manitol e a trealose (Tabela 4). A presença de frutose (0,15 – 2,26 g/100 g de massa seca) apenas foi detetada nas espécies micorrízicas. Os fungos micorrízicos não têm a capacidade de hidrolisar sacarose em glucose e frutose devido à ausência da enzima hidrolítica. A única forma destes fungos usarem sacarose é em simbiose, quando o dissacárido é hidrolisado por uma invertase apoplástica ou ligada à parede celular da planta hospedeira. A sacarose produzida pela planta é transportada para as raízes, subindo ao apoplasto e sendo hidrolisada, pela invertase extracelular, em glucose e frutose. No apoplasto acidificado, a glucose é absorvida por transportadores com alta afinidade para hexoses. A frutose, também libertada pela invertase, exerce retro-inibição sobre a atividade da invertase, enquanto que a glucose inibe a captação de frutose pelo fungo. À medida que a concentração de glucose no apoplasto diminui, o fungo começa a absorver frutose que, então, cessa a inibição da retro-inibição da invertase, permitindo a renovação da hidrólise da sacarose. A glucose e a frutose não são difundidas para o apoplasto a partir do micélio, uma vez que são convertidos em glúcidos específicos (Smith & Read, 1997; Orcutt & Nilsen, 2000; Nehls et al., 2001). Sabe-se que os fungos convertem fontes de carbono vegetais, como glucose e frutose, em trealose, arabitol e manitol (Hughes & Mitchell, 1995; Nehls et al., 2001). A sacarose é hidrolisada por uma família de 32 enzimas de glucosil hidrolases da planta (GH32) nos seus monossacáridos constituintes, de forma a responder às necessidades celulares da planta. Os fungos biotróficos de plantas exibem uma elevada capacidade de acesso à sacarose sintetizada pela planta mas, no entanto, os genes GH32 estão ausentes a maioria dos genomas micorrízicos. A dependência destes simbiontes em relação à atividade enzimática GH32 da planta para aquisição de C, suporta as previsões anteriores de controlo da planta sobre a possível alocação de C na simbiose com fungos micorrízicos (Parrent et al., 2009). Além disso, as espécies micorrízicas revelaram o manitol como sendo o açúcar mais abundante (15,25-36,97 g/100 g de massa seca; Tabela 4). Devido ao seu sabor adocicado característico, o manitol torna-se muito interessante do ponto de vista da indústria alimentar, uma vez que é um glúcido dietético com baixo índice calórico, sendo apenas parcialmente absorvido no intestino delgado. Na realidade, este álcool derivado de açúcar encontra

importantes aplicações na indústria farmacêutica, de cosméticos e alimentar (Oliveira et al., 2009).

Os cogumelos micorrízicos revelaram níveis mais elevados de manitol e trealose e de açúcares totais comparativamente com as espécies sapotróficas. As espécies *Boletus fragrans* e *Boletus erythropus* revelaram os níveis mais altos de açúcares totais (42,37 e 34,46 g/100 g de massa seca, respetivamente) e de trealose (3,14 e 4,84 mg/100 g de massa seca, respetivamente). Este dissacárido (constituído por duas moléculas de glucose ligadas por uma ligação glucosídica alfa, alfa-1,1, sem poder redutor) é conhecido por ser uma das fontes de energia na maioria dos organismos vivos e pode ser encontrado em bactérias, fungos, insetos, plantas e invertebrados. Além disso, a trealose protege os organismos contra diversas agressões, tais como secagem, congelação e osmopressão. A trealose tem também funções de estabilização, nomeadamente de impedimento da retrodegradação do amido, desnaturação de proteínas e degradação de lípidos. Este sacárido também apresenta um sabor doce, tal como a sacarose, sendo usado como adoçante na indústria alimentar (Higashiyama, 2002).

Tabela 4: Composição em açúcares livres das amostras de cogumelos silvestres comestíveis saprotróficos e micorrízicos.

Em cada coluna, letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Amostras	Frutose	Manitol	Trealose	Açúcares Totais (g/100 g dw)
<i>Calvatia utriformis</i>	nd	nd	0,40 ± 0,01 f	0,40 ± 0,01 e
<i>Clitopilus prunulus</i>	nd	0,95 ± 0,10 e	0,95 ± 0,16 edf	1,90 ± 0,27 ed
<i>Lycoperdon echinatum</i>	nd	0,85 ± 0,03 e	1,38 ± 0,09 ed	2,23 ± 0,06 ed
<i>Lyophyllum decastes</i>	nd	11,03 ± 0,74 d	3,98 ± 0,54 b	15,01 ± 1,28 c
<i>Macrolepiota excoriata</i>	nd	4,10 ± 0,04 e	2,75 ± 0,04 c	6,85 ± 0,09 d
<i>Boletus erythropus</i>	1,72 ± 0,03 b	27,90 ± 0,30 b	4,84 ± 0,51 a	34,46 ± 0,24 b
<i>Boletus fragrans</i>	2,26 ± 0,11 a	36,97 ± 0,33 a	3,14 ± 0,26 c	42,37 ± 0,60 a
<i>Hygrophorus pustulatus</i>	0,15 ± 0,05 d	35,37 ± 5,24 a	3,00 ± 0,00 c	38,52 ± 5,29 ba
<i>Russula cyanoxantha</i>	0,34 ± 0,04 c	16,18 ± 0,61 c	1,64 ± 0,32 d	18,16 ± 0,26 c
<i>Russula olivacea</i>	0,23 ± 0,03 dc	15,25 ± 0,24 dc	0,71 ± 0,07 ef	16,19 ± 0,34 c

dw- massa seca.

Relativamente à composição em tocoferóis, pode-se observar que apesar do α -tocoferol ter sido encontrado em todas as espécies, o γ - e δ - tocoferóis foram os principais vitâmeros nas amostras estudadas. O β - tocoferol foi apenas encontrado em duas espécies saprotróficas, nomeadamente *Lycoperdon echinatum* e *Lyophyllum decastes*. Esta última espécie foi a que apresentou maior concentração de tocoferóis (170,79 $\mu\text{g}/100$ g de massa seca), enquanto os cogumelos micorrízicos *Boletus erythropus* e *Boletus fragrans* foram as espécies que revelaram valores mais baixos (19,16 e 22,23 $\mu\text{g}/100$ g de massa seca, respetivamente). O ácido ascórbico foi encontrado em níveis elevados. A concentração mais elevada foi obtida na espécie saprotrófica *Clitopilus prunulus* (400,36 mg/100 g de massa seca), enquanto que a menor concentração foi observada na espécie micorrízica *Boletus fragrans*. No entanto, este comportamento não foi generalizado, o que indica que os teores de vitaminas não parecem estar relacionados com o trofismo dos cogumelos.

A vitamina E (tocoferóis e tocotrienóis) é um potencial antioxidante com propriedades anti-inflamatórias. Diversas evidências sugerem que esta apresenta potenciais efeitos benéficos em relação à doença cardiovascular. A suplementação com tocoferóis em humanos e modelos de animais, demonstrou diminuir a peroxidação lipídica, a produção de superóxido impedindo a formação da oxidase do fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reduzida), bem como diminuir a expressão de recetores captadores, particularmente importantes na formação de células de ateromas (Singh et al., 2005). A vitamina C (ácido ascórbico) também está envolvida em reações químicas do metabolismo celular. Estudos epidemiológicos mostraram que a deficiência em ácido ascórbico pode conduzir, a longo prazo, a patologias associadas ao stresse oxidativo (Chepda et al., 1999).

Tabela 5: Composição em vitaminas das amostras de cogumelos silvestres comestíveis saprotróficos e micorrízicos.

 Em cada coluna letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Amostras	α -tocoferol	β -tocoferol	γ -tocoferol	δ -tocoferol	Tocoferóis totais ($\mu\text{g}/100 \text{ g dw}$)	Ácido ascórbico ($\text{mg}/100 \text{ g dw}$)
<i>Calvatia utriformis</i>	8,74 \pm 0,30 cd	nd	56,43 \pm 0,37 d	nd	65,17 \pm 0,68 d	152,89 \pm 4,60 c
<i>Clitopilus prunulus</i>	10,02 \pm 0,31 cd	nd	nd	18,98 \pm 1,27 c	29,00 \pm 1,59 fg	400,36 \pm 18,46 a
<i>Lycoperdon echinatum</i>	9,42 \pm 0,25 cd	48,21 \pm 5,54 a	73,92 \pm 1,57 c	nd	131,55 \pm 3,72 c	166,13 \pm 8,89 c
<i>Lyophyllum decastes</i>	13,73 \pm 0,30 b	8,30 \pm 1,47 b	135,23 \pm 0,26 a	13,53 \pm 0,66 dc	170,79 \pm 0,77 a	385,55 \pm 11,68 a
<i>Macrolepiota excoriata</i>	18,73 \pm 3,06 a	nd	94,34 \pm 8,69 b	44,36 \pm 5,82 a	157,43 \pm 0,19 b	176,85 \pm 28,81 c
<i>Boletus erythropus</i>	1,52 \pm 0,32 e	nd	17,64 \pm 1,95 e	nd	19,16 \pm 2,27 g	169,20 \pm 23,01 c
<i>Boletus fragrans</i>	1,93 \pm 0,04 e	nd	10,30 \pm 1,63 fe	10,00 \pm 1,32 de	22,23 \pm 2,91 g	81,32 \pm 4,75 d
<i>Hygrophorus pustulatus</i>	8,09 \pm 0,56 d	nd	103,34 \pm 12,22 b	15,72 \pm 0,36 dc	127,15 \pm 11,30 c	387,80 \pm 7,01 a
<i>Russula cyanoxantha</i>	10,46 \pm 0,07 cd	nd	21,92 \pm 2,34 e	6,48 \pm 0,98 e	38,86 \pm 1,28 fe	189,61 \pm 53,93 c
<i>Russula olivacea</i>	11,73 \pm 0,85 cb	nd	11,84 \pm 1,37 fe	26,18 \pm 0,72 b	49,75 \pm 1,23 e	247,38 \pm 65,03 b

dw- massa seca

As propriedades antioxidantes dos cogumelos saprotróficos e micorrízicos foram avaliadas através da atividade captadora de radicais livres DPPH (obtida pela capacidade de diminuição da absorvância a 515 nm da solução de DPPH), poder redutor (que mede a conversão do Fe^{3+} /complexo de ferricianeto à sua forma ferrosa) e a inibição da peroxidação lipídica no sistema β -caroteno-linoleato (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). Os resultados, incluindo os valores de EC_{50} , são apresentados nas Figuras 11-13, que evidenciam um aumento das propriedades antioxidantes com o aumento da concentração dos extratos.

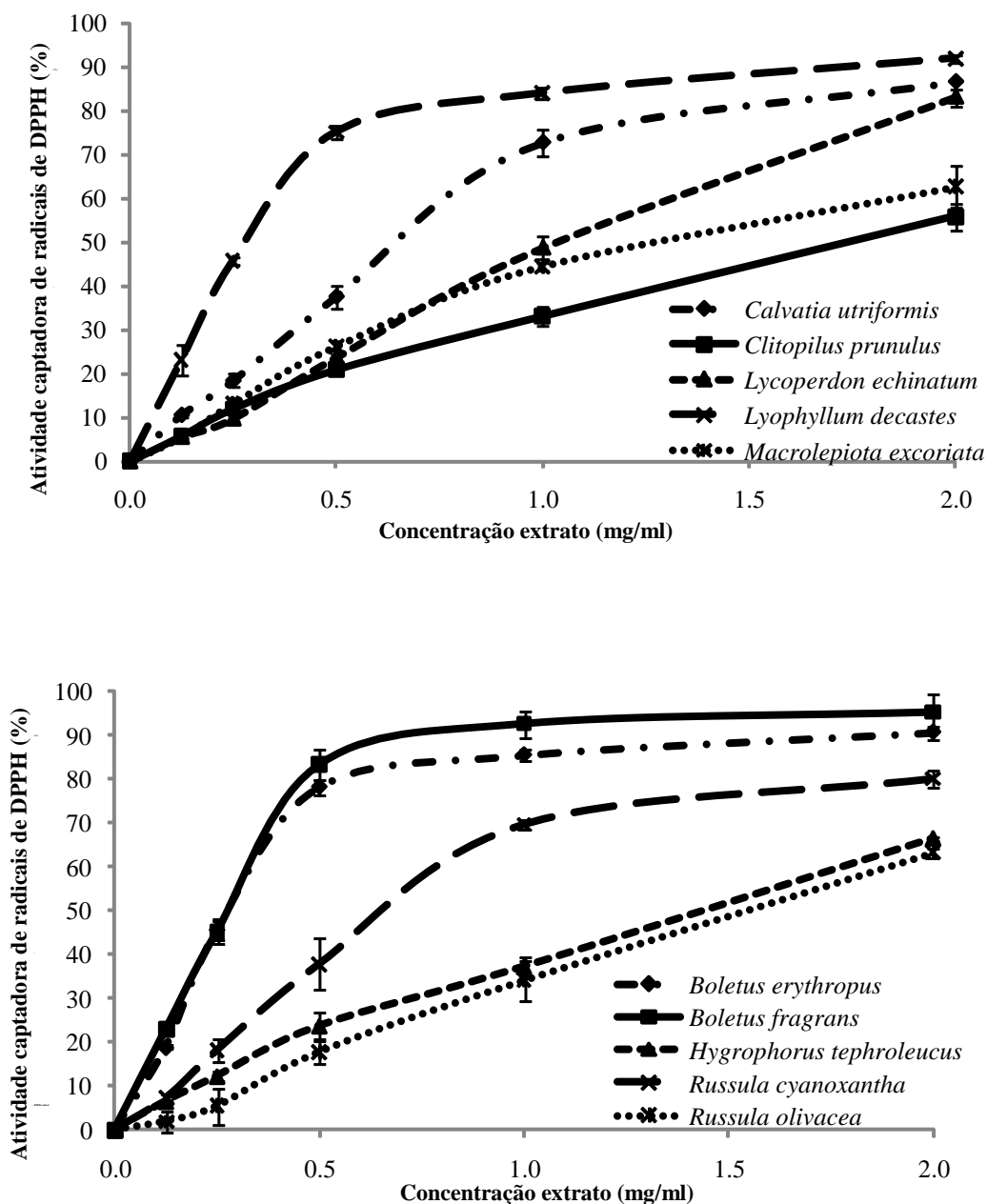


Figura 11: Atividade captadora de radicais de DPPH das amostras de cogumelos silvestres comestíveis.

Valores de EC₅₀ para as espécies saprotróficas (mg/ml): *Calvatia utriformis* 0,68 ± 0,04; *Clitopilus prunulus* 1,75 ± 0,13; *Lycoperdon echinatum* 1,04 ± 0,08; *Lyophyllum decastes* 0,29 ± 0,01; *Macrolepiota excoriata* 1,32 ± 0,09.

Valores de EC₅₀ para as espécies micorrízicas (mg/ml): *Boletus erythropus* 0,28 ± 0,02; *Boletus fragrans* 0,28 ± 0,01; *Hygrophorus tephroleucus* 0,74 ± 0,02; *Russula cyanoxantha* 0,69 ± 0,03; *Russula olivacea* 1,47 ± 0,08.

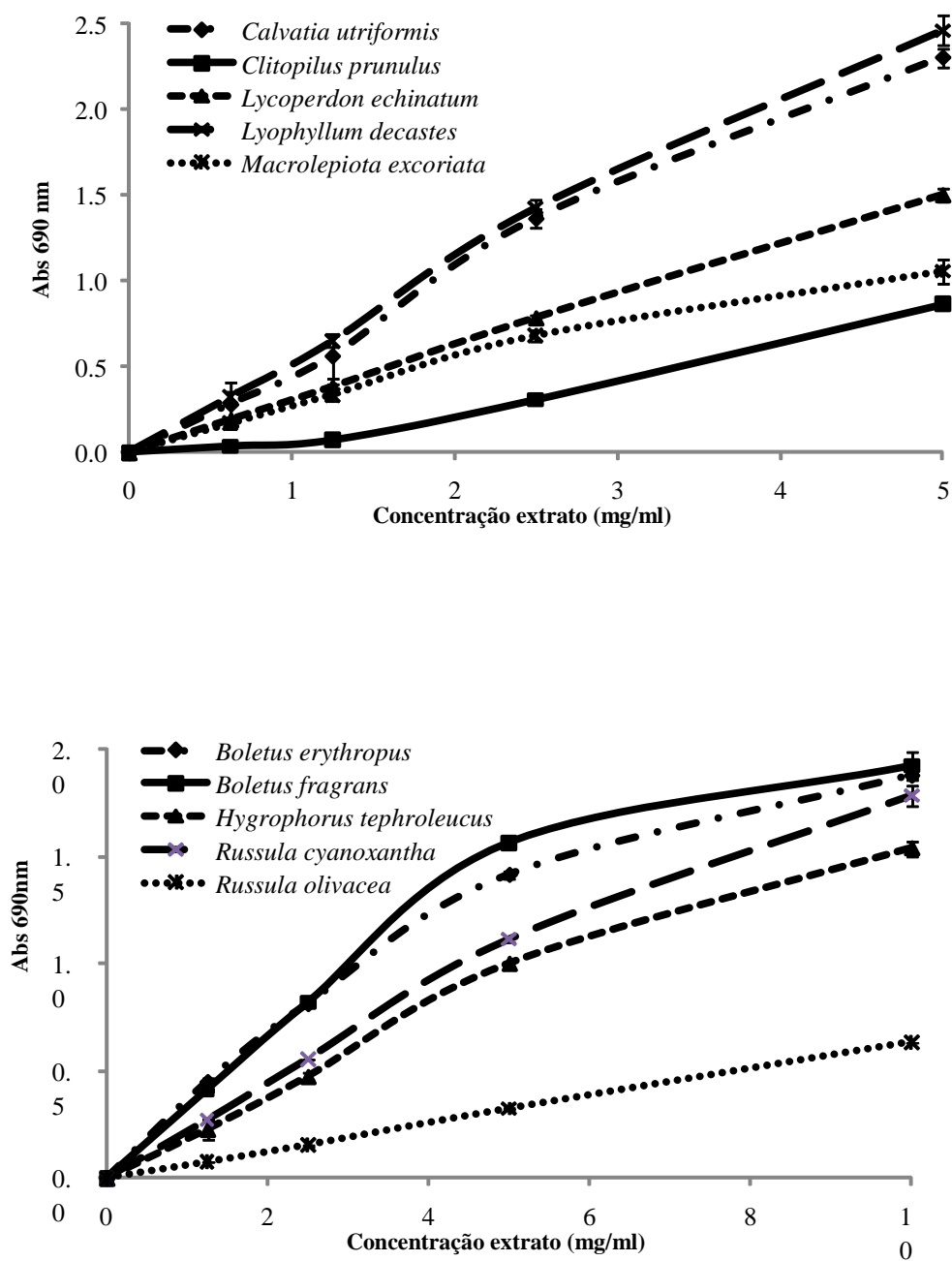


Figura 12: Poder redutor das amostras de cogumelos silvestres comestíveis.

Valores de EC50 para as espécies saprotróficas (mg/ml): *Calvatia utriformis* $1,16 \pm 0,27$; *Clitopilus prunulus* $3,36 \pm 0,03$; *Lycoperdon echinatum* $1,61 \pm 0,05$; *Lyophyllum decastes* $0,97 \pm 0,04$; *Macrolepiota excoriata* $1,84 \pm 0,03$.

Valores de EC₅₀ para as espécies micorrízicas (mg/ml): *Boletus erythropus* 1,42 ± 0,05; *Boletus fragrans* 1,52 ± 0,02; *Hygrophorus tephroleucus* 2,61 ± 0,08; *Russula cyanoxantha* 2,26 ± 0,00; *Russula olivacea* 7,85 ± 0,01.

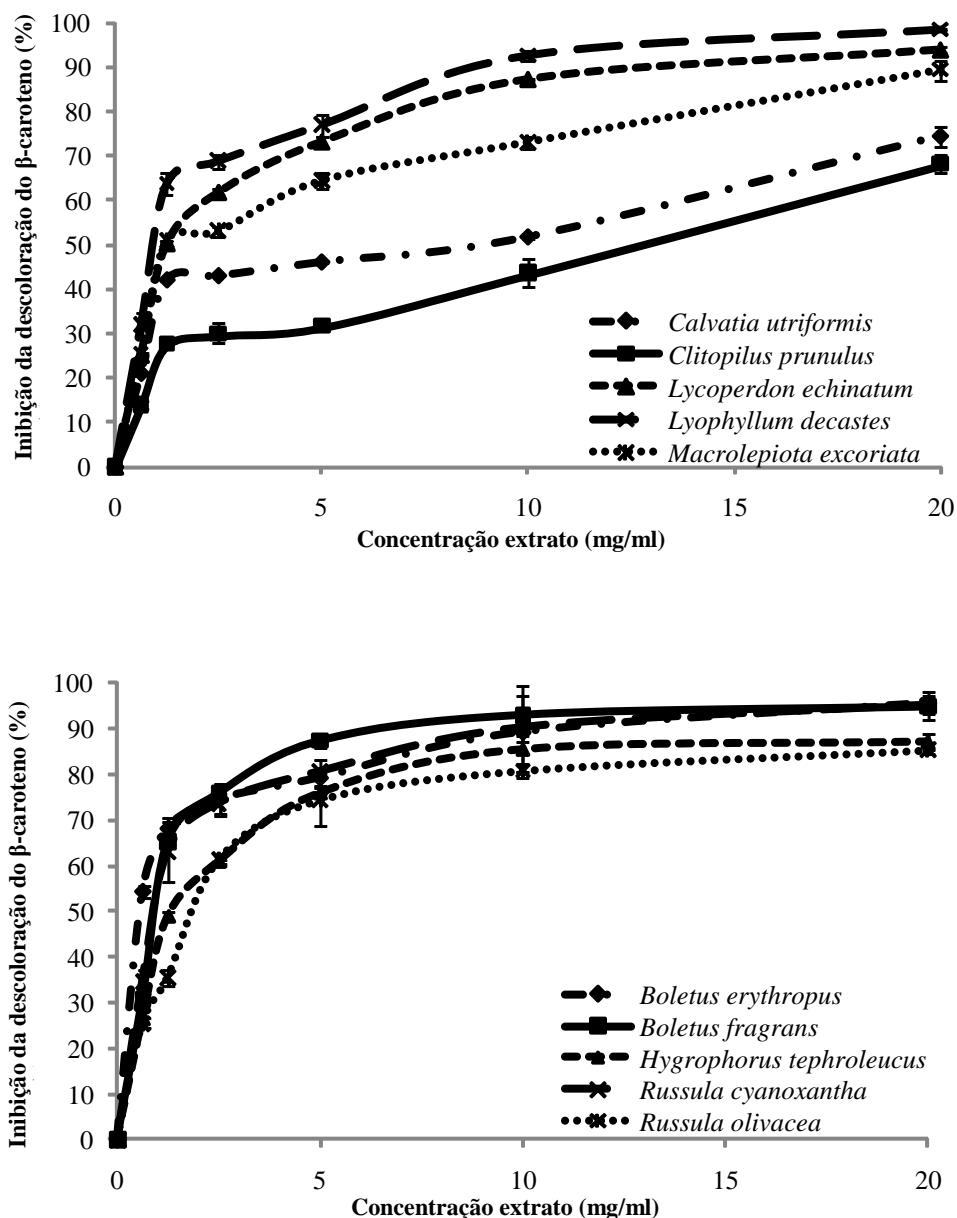


Figura 13: Capacidade de inibição da peroxidação lipídica das amostras de cogumelos silvestres comestíveis, medida pela inibição da descoloração do β-caroteno.

Valores de EC₅₀ para as espécies saprotróficas (mg/ml): *Calvatia utriformis* 8,40 ± 0,20; *Clitopilus prunulus* 12,06 ± 0,30; *Lycoperdon echinatum* 1,24 ± 0,01; *Lyophyllum decastes* 0,98 ± 0,04; *Macrolepiota excoriata* 1,23 ± 0,03.

Valores de EC₅₀ para as espécies micorrízicas (mg/ml): *Boletus erythropus* 0,58 ± 0,02; *Boletus fragrans* 0,96 ± 0,02; *Hygrophorus tephroleucus* 1,28 ± 0,04; *Russula cyanoxantha* 0,98 ± 0,07; *Russula olivacea* 1,95 ± 0,04.

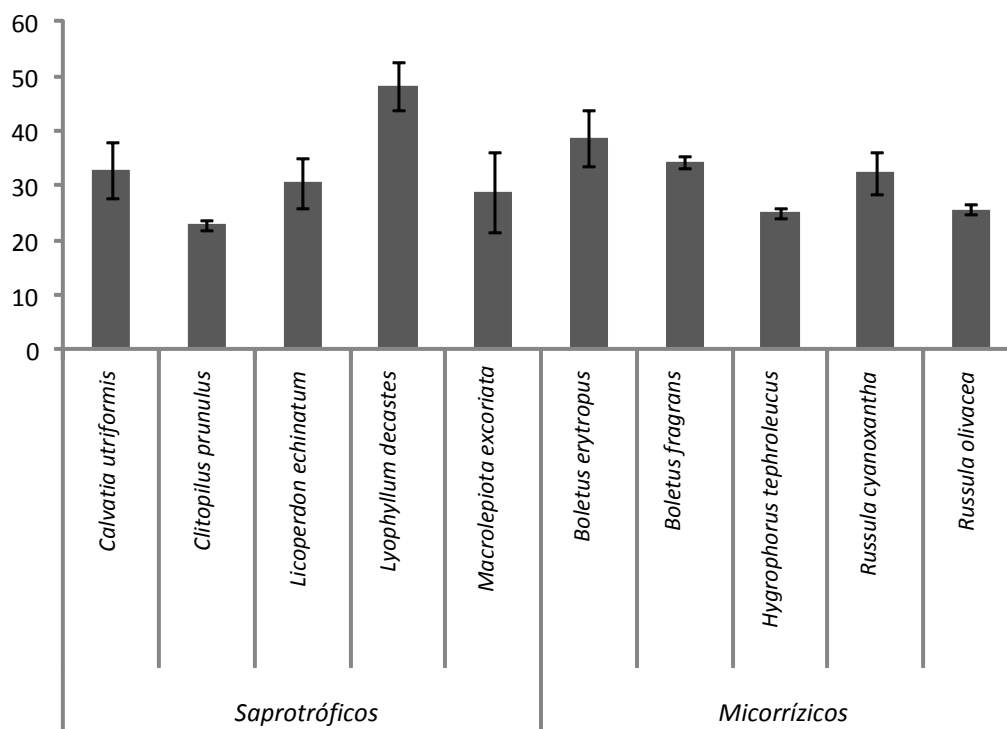


Figura 14: Conteúdo fenólico nas amostras de cogumelos silvestres comestíveis saprotróficos e micorrízicos.

Todas as amostras revelaram possuir propriedades antioxidantes independentemente do seu trofismo. A espécie saprotrófica *Lyophyllum decastes* e as espécies micorrízicas *Boletus erythropus* e *Boletus fragrans* foram as que apresentaram maior atividade captadora de radicais (valores de EC₅₀ ~0,3 mg/ml; Figura 11), o que

está de acordo com a sua maior concentração em antioxidantes polares, tais como fenóis (48, 39 e 34 mg EAG/g de extrato, respetivamente; Figura 14) e açúcares livres (34 e 42 g/100 g de massa seca, respetivamente para as espécies micorrízicas; Tabela 4). O mesmo comportamento foi observado para o poder redutor: a espécie saprotrófica *Lyophyllum decastes* e as espécies micorrízicas *Boletus erythropus* e *Boletus fragrans* apresentaram maior poder redutor (menores valores de EC₅₀ 0,97, 1,42 e 1,52 mg/ml, respetivamente; Figura 12). *Boletus erythropus* apresentou a maior percentagem de inibição da peroxidação lipídica (EC₅₀ de 0,58 mg/ml; Figura 3), seguido de *Boletus fragrans* (0,96 mg/ml) e *Lyophyllum decastes* (0,98 mg/ml; Figura 13).

A espécie *Russula cyanoxantha* (micorrízica) foi anteriormente estudada por Ribeiro et al. (2008) que descreveram atividades captadoras de radicais livres DPPH de 0,18, 0,11 e 0,08 mg/ml para o cogumelo inteiro, pé e chapéu, respetivamente. As atividades imunomoduladoras e anti-tumorais da espécie saprotrófica *Lyophyllum decastes* em modelos pré-clínicos de animais foram descritas e atribuídas a (1→3) e (1→6) -β-D-glucanas lineares (Ferreira et al., 2010). No entanto, pelo que sabemos, não existem trabalhos publicados relativamente às propriedades antioxidantes das outras espécies de cogumelos aqui estudadas.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, foram avaliados os efeitos de trofismo sobre o potencial nutricional e nutracêutico de cinco espécies de cogumelos comestíveis silvestres saprotróficos, nomeadamente *Calvatia utriformis*, *Clitopilus prunulus*, *Lycoperdon echinatum*, *Lyophyllum decastes* e *Macrolepiota excoriata*, e de cinco espécies de cogumelos comestíveis silvestres micorrízicos, designadamente *Boletus erythropus*, *Boletus fragrans*, *Hygrophorus pustulatus*, *Russula cyanoxantha* e *Russula olivacea*, todas provenientes de Bragança (Nordeste de Portugal).

As espécies de cogumelos saprotróficos e micorrízicos estudadas demonstraram um perfil similar em macronutrientes, ácidos gordos e vitaminas. No entanto, as espécies micorrízicas apresentaram uma concentração mais elevada em açúcares do que as espécies saprotróficas, e apenas as primeiras espécies apresentaram frutose (ceto-hexose). A espécie saprotrófica *Lyophyllum decastes* e as espécies micorrízicas *Boletus erythropus* e *Boletus fragrans* apresentaram o maior potencial antioxidante, principalmente devido à contribuição de antioxidantes polares, tais como fenóis e açúcares.

Este é o primeiro trabalho que descreve a composição química das espécies de cogumelos estudadas, constituindo uma evidência científica de usos tradicionais de espécies silvestres comestíveis. Além disso, sendo uma fonte importante de antioxidantes, as espécies silvestres podem ser utilizadas na prevenção de doenças relacionadas com o *stress* oxidativo, em aplicações dermatológicas, na cosmética, assim como em suplementos na indústria alimentar. Portanto, os cogumelos silvestres são muito especiais pois ao serem usados na dieta como nutracêuticos e/ou alimentos funcionais, estão de certa forma a contribuir para uma melhor qualidade de vida.

Os resultados desta dissertação foram divulgados nos documentos em anexo:

Anexo I - Publicação em revista internacional

Anexo II – Comunicações em congressos

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agahar-Murugkar, D., & Subbulakshmi, G. (2005). Nutritional value of edible wild mushrooms collected from the Khasi hills of Meghalaya. *Food Chemistry*, 89, 599 – 603.

Alencar, Y.B., Ríos-Velásquez, C., Lichtwardt, R.W., & Hamada, N. (2003). Trichomycetes (Zygomycota) in the Digestive tract of Arthropods in Amazonas, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98, 799-810.

Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., & Blackwell, M. (1996). *Introductory Mycology*. John Wiley and Sons editors, 4th ed., New York, USA, 868.

AOAC (1995). *Official methods of analysis* (16th Ed.). Arlington VA, USA: Association of Official Analytical Chemists.

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 fruting body maturity stage on chemical composition and antimicrobial activity of *Lactarius* sp. mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8766-8771.

Barros L., Cruz T., Baptista P., Estevinho L.M., & Ferreira I.C.F.R. (2008a). Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food Chemical and 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.
- Boa, E. (2004). Los hongos silvestres comestibles; Perspectiva global de su uso e importancia para la población. FAO, Rome.
- Bon, M. (1988). Guia de campo de los hongos de Europa. Barcelona: Ediciones Omega.
- Bors W, & Saran M. (1987). Radical scavenging by flavonoid antioxidants. *Free Radicals Research Communications*, 2, 289-94.
- Carlile, M.J., Watkinson, S.C., & Gooday, G.W. (2001). The Fungi. Academic Press, 2nd Edition. Hungary.
- Chang, S.T., & Miles P.G. (2004). Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact –2nd ed., 1-10, 27-35, 40-47.
- Chang, S.T. (1999). Global impact of edible and medicinal mushrooms of human welfare in the 21st century: nongreen revolution. *Free Radicals Research Communications*, 1, 1-7.
- Chepda, T., Perier, C., Chamson, A., & Frey, J. (1999). Effets pro- et antioxydants de l'ascorbate. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 13, 115-20.
- Cheung, L.M., & Cheung, P.C.K. (2005). Mushroom extracts with antioxidant activity against lipid peroxidation. *Food Chemistry*, 89, 403-409.
- Chew, B.P. (1995). Antioxidant vitamins affect food animal immunity and health. *The Journal of Nutrition*, 125, 1804S-1808S.
- Courtecuisse, R., & Duhem, B. (2005). Guía de los hongos de la Península Ibérica. Europa y Norte de África. Barcelona: Ediciones Omega.

- Díez, V.A., & Alvarez, A. (2001). Compositional and nutritional studies on two wild edible mushrooms from northwest Spain. *Food Chemistry*, 75, 417–422.
- Fang, Y.-Z., Yang, S., & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18, 872-879.
- Ferreira, F.A.G. (1983). *Nutrição humana*. Edição da fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa.
- Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., & Abreu, R.M.V. (2009). Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, 16, 1543-1560.
- Ferreira, I.C.F.R., Vaz, J.A., Vasconcelos, M.H., & Martins, A. (2010). Compounds from wild mushrooms with antitumor potential. *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 10, 424-436.
- Ferreira, I.C.F.R. (2011). *Biomoléculas em cogumelos silvestres: Estudo de caso*. Universidade do Minho, 3-21.
- Frade, B. L., & Alfonso, A. T. (2005). *Guía de Campo de los Hongos de la Península Ibérica*. : Celarayn editorial.
- Fries, J.F., Koop, C.E., Beadle, C.E., Cooper, P.P., England, M.J., Greaves, R.F. et al. (1993). Reducing health care costs by reducing the need and demand for medical services. The Health Project Consortium. *The New England Journal of Medicine*, 329, 321-325.
- Griffin, D.H. (1994). *Fungal Physiology*. Wiley-Liss, 2nd ed., New York, 485.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J.M. (1984). Free radicals, lipid peroxidation, and cell damage. *Lancet*, 2, 1095.
- Halliwell, B (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annual Reviews of Nutrition*, 16, 33-50.

- Heleno, S.A., Barros, L., Sousa, M.J., Martins, A., & Ferreira, I.C.F.R. (2009). Study and characterization of selected nutrients in wild mushrooms from Portugal by gas chromatography and high performance liquid chromatography. *Microchemical Journal*, 93, 195-199.
- Heleno, S.A., Barros, L., Sousa, M.J., Martins, A., & Ferreira, I.C.F.R. (2010). Tocopherols composition of Portuguese wild mushrooms with antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 119, 1443-1450.
- Higashiyama, T. (2002). Novel functions and applications of trehalose. *Pure and Applied Chemistry*, 74, 1263-1269.
- Hughes, E., & Mitchell, D. T. (1995). Utilization of sucrose by *Hymenoscyphus ericae* (an ericoid endomycorrhizal fungus) and ectomycorrhizal fungi. *Mycological Research*, 99, 1233-1238.
- James, T.Y., Kauff, F., Schoch, C. et al. (2006a). Reconstructing the early evolution of the fungi using a six gene phylogeny. *Nature*, 443, 818-822.
- James, T.Y., Letcher, P.M., Longcore, J.E., Mozley-Standridge, S.E., Porter, D., Powell, M.J., Griffith, G.W., & Vilgalys, R. (2006b). A molecular phylogeny of the flagellated Fungi (Chytridiomycota) and a proposal for a new phylum (Blastocladiomycota). *Mycologia*, 98, 860-871.
- Kagan, V.E., Kuzmenko, A.I., Shvedova, A.A., Kisin, E.R., Li, R., Martin, I., Quinn, P.J., Tyurin, V.A., Tyurina, Y.Y., & Yalowich, J.C. (2003). Direct evidence for recycling of myeloperoxidase-catalyzed phenoxyl radicals of a vitamin E homologue, 2,2,5,7,8-pentamethyl-6-hydroxy chromane, by ascorbate/dihydrolipoate in living HL-60 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subject*, 1620, 72-84.
- Kalač, P. (2009). Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry*, 113, 9-16.
- Karliński, L., Ravnskov, S., Kieliszewska-Rokicka, B., & Larsen, J. (2007). Fatty acid composition of various ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas of Norway spruce. *Soil Biology and Biochemistry*, 39, 854-866.

- Lachance, P.A., Nakat, Z., Jeong, W.S. (2001). Antioxidants: an integrative approach. *Nutrition* 2001, 17, 8358.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., & Cox, M.M. (2008). *Principles of Biochemistry*. W.H. Freeman, 5th edition.
- 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 Querétaro, México. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4329–4332.
- Li Y., & Schellhorn H.E. (2007). New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *The Journal of Nutrition*, 137, 2171-2184.
- Lo, K.M., & Cheung, P.C.K. (2005). Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. *alba*. *Food Chemistry*, 89, 533-539.
- Longvah, T., & Deosthale, Y.G. (1998). Compositional and nutritional studies on edible wild mushroom from northeast India. *Food Chemistry*, 63, 331–334.
- Maga, J.A. (1981). Mushroom flavor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29, 4–7.
- Martins, X.F. (2004). Cogumelos – Património Natural Transmontano. João Azevedo Editor, Portugal, Vol 1, 19-101.
- Martins, A. (2008). In vitro mycorrhization of micropropagated plants: Studies on *Castanea sativa* Mill. Z.A. Siddiqui et al., (eds.), *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*, 321-336, Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Mattila, P., Salo-Väänänen, P., Könkö, K., Aro, H., & Jalava, T. (2002). Basic composition and amino acid contents of mushrooms cultivated in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6419-6422.
- 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.

- Mdachi, S.J.M., Nkunya, M.H.H., Nyigo, V.A., & Urasa, I.T. (2004). Amino acid composition of some Tanzanian wild mushrooms. *Food Chemistry*, 86, 179–182.
- Mitchel, R.E.J., & McCann, R.A. (2003). Skin tumor promotion by Vitamin E in mice: amplification by ionizing radiation and Vitamin C. *Cancer Detection and Prevention*, 27, 102-108.
- Nagaoka, S.-I., Kakiuchi, T., Ohara, K., & Mukai, K. (2007). Kinetics of the reaction by which natural vitamin E is regenerated by vitamin C. *Chemistry and Physics of Lipids*, 146, 26-32.
- Nehls, U., Mikolajewski, S., Magel, E., & Hampp, R. (2001). Carbohydrate metabolism in ectomycorrhizas: gene expression, monosaccharide transport and metabolic control. *New Phytologist*, 150, 533-541.
- Oliveira, P. S. M., Ferreira, V. F., & Souza, M. V. N. (2009). Utilização do D-manitol em síntese orgânica. *Química Nova*, 32, 441-452.
- Orcutt, D. M., & Nilsen, E. T. (2000). *The Physiology of Plants Under Stress: Soil and biotic factors*. John Wiley and sons, 683 pp.
- 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.
- Palacios, I., Lozano, M., Moro, C., D'Arrigo, M., Rostagno, M.A., Martínez, J.A., García-Lafuente, A., Guillamón, E., & Villares, A. (2011). Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 128, 674-678.
- Parrent, Lynn, J., James, T. Y., Vasaitis, R., & Taylor, A. F. S. (2009). Friend or foe? Evolutionary history of glycoside hydrolase family 32 genes encoding for sucrolytic activity in fungi and its implications for plant-fungal symbioses. *BMC Evolutionary Biology*, 9, 148.
- Pedneault, K., Angers, P., Gosselin, A., & Tweddell, R. J. (2006). Fatty acid composition of lipids from mushrooms belonging to the family Boletaceae. *Mycological research*, 110, 1179-1183.

- Pereira E. (2011). Contribuição para a inventariação química e nutricional de cogumelos do Nordeste de Portugal. Dissertação de Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar. Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança.
- Prior, R.L. (2003). Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 570S–578S.
- Quintas, A., Ponces, A., & Halpern, M.J. (2008). Bioquímica, Organização Molecular da Vida. Lidel.
- Rao, A.V., & Rao, L.G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, 55, 207-216.
- Ribeiro, B., Andrade, P.B., Silva, B.M., Baptista, P., Seabra, R.M., & Valentão, P. (2008). Comparative study on free amino acid composition of wild edible mushroom species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10973–10979.
- Ribeiro, B., Pinho, P.G., Andrade, P.B., Baptista, P., & Valentão, P. (2009). Fatty acid composition of wild edible mushrooms species: A comparative study. *Microchemical Journal*, 93, 29-35.
- Rodríguez, J.A.S., Domínguez, E.R., & Fernández, D.R. (2008). Habitats de las setas: protección y conservación. IRMA, S.L., 11-29, León, Espanha.
- 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.
- Singh, U., Devaraj, S., & Jialal, I. (2005). Vitamin E, oxidative stress, and inflammation. *Annual Review of Nutrition*, 25, 151–74.
- Smith, S.E., & Read, D. J. (1997). Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, 605 pp.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., & Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39, 44-84.

Voet, D., & Voet, J.G. (2004). *Biochemistry*. John Wiley & Son, 3rd edition, 2004.

Webster, J., & Weber, R.W.S. (2007). *Introduction to Fungi*, 3rd Edition. Cambridge University Press, United Kingdom.

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., Linb, H.C., & Maub, J.L. (2002). Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry*, 77, 229-235.

Yen, G.C., & Hung, C.Y. (2000). Effects of alkaline and heat treatment on antioxidative activity and total phenolics of extracts from Hsian-tsao (*Mesona procumbens* Hemsl.). *Food Research International*, 33, 487-92.

Yi, W., Wu, X., Cao, R., Song, H., & Ma, L. (2009). Biological evaluations of novel vitamin C esters as mushroom tyrosinase inhibitors and antioxidants. *Food Chemistry*, 117, 381-386.

Yilmaz, N., Solmaz, M., Turkecul, I., & Elmastas, M. (2006). Fatty acid composition in some wild edible mushrooms growing in the middle Black Sea region of Turkey. *Food Chemistry*, 99, 168-174.

WEBSITES

Web 1:[http://www.herbarium.iastate.edu/fungi/fungispecies.php?sp=Clitopilus+prunulus+\(Scop.\)+Kummer](http://www.herbarium.iastate.edu/fungi/fungispecies.php?sp=Clitopilus+prunulus+(Scop.)+Kummer)

Web 2:http://en.wikipedia.org/wiki/File:Lyophyllum_decastes.jpg

Web 3:<http://www.cegep-sept-iles.qc.ca:8080/raymondboyer/Hygrophorus.htm>

Web 4:http://www.mtsn.tn.it/russulales-news/tx_photos.asp?index=5391

Web 5:http://www.fungoceva.it/tav_Macrolepiota_excoriata.htm

ANEXOS