



Contribuição para a inventariação química e nutricional de cogumelos do Nordeste de Portugal

Eliana Andreia Pires Castilho Pereira

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
2011**

Aos meus pais...

Agradecimentos

Gostaria de proferir os meus sinceros agradecimentos a algumas pessoas que pela sua ajuda, dedicação e apoio tornaram possível o desenvolvimento deste trabalho.

Assim, manifesto o meu profundo reconhecimento **às Professoras Doutoras Isabel C.F.R. Ferreira e Anabela Martins** pela excelente orientação, pela experiência e conhecimentos que me proporcionaram, pelo apoio, dedicação e simpatia com que me receberam e acompanharam durante o meu percurso.

À **Doutora Lillian Barros** pela atenção, disponibilidade, empenho, pela ajuda que sempre me disponibilizou, por tudo que me ensinou e carinho com que me recebeu desde o início.

Aos meus **pais** e à minha **irmã**, que sem eles nada disto teria sido possível. Agradeço-lhe toda a cooperação, apoio, motivação e por acreditarem sempre no meu trabalho.

Ao **Fernando** pela ajuda, apoio incondicional e encorajamento constante.

À **Ângela Feitor** e à **Carla Pereira** que sempre me ajudaram no laboratório, pela amizade e pelos bons momentos com que me prendaram.

Aos meus **amigos** que sempre acreditaram e apoiaram esta etapa do meu percurso académico.

Por fim, a todas as outras pessoas, que directa ou indirectamente, fizeram com que este trabalho fosse possível.

A todos **MUITO OBRIGADO.**

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



Índice

Agradecimentos	3
Lista de tabelas.....	7
Lista de Figuras.....	8
Abreviaturas.....	9
Resumo	11
Abstract.....	12
1. Introdução	13
1.1. Fungos	13
1.1.2. Ecologia.....	15
1.1.3. Classificação.....	16
1.1.4. Valor alimentar dos cogumelos	18
1.2. Nutrientes e nutracêuticos em cogumelos silvestres	19
1.2.1. Macronutrientes	21
1.2.2. Micronutrientes	25
1.2.3. Não-nutrientes.....	29
1.3. Objectivos.....	32
2. Material e métodos	33
2.1. Amostras	33
2.2. Padrões e reagentes.....	35
2.3. Determinação de macronutrientes.....	35

2.3.1. Avaliação do valor nutricional	35
2.3.2. Determinação de açúcares livres	36
2.3.3. Determinação de ácidos gordos	36
2.4. Determinação de micronutrientes	37
2.4.1. Determinação de tocoferóis	37
2.4.2. Determinação do teor de ácido ascórbico	38
2.4.3. Determinação do teor de carotenóides	38
2.5. Determinação de não-nutrientes e avaliação das propriedades antioxidantes	39
2.5.1. Extracção das amostras	39
2.5.2. Determinação do teor de fenóis	39
2.5.3. Determinação do teor de flavonóides	40
2.5.4. Avaliação da actividade captadora de radicais DPPH	40
2.5.5. Avaliação do poder redutor	41
2.5.6. Avaliação da inibição da descoloração do β -caroteno	42
2.6. Análise estatística	44
3. Resultados obtidos	45
4. Discussão dos resultados	54
5. Considerações finais	57
6. Referências bibliográficas	58
Anexos	70

Lista de tabelas

Tabela 1. Informação sobre as espécies de cogumelos comestíveis analisados	34
Tabela 2. Composição em macronutrientes e valor energético das espécies de cogumelos silvestres comestíveis.....	46
Tabela 3. Principais ácidos gordos encontrados nas espécies de cogumelos silvestres comestíveis.	47
Tabela 4. Composição em micronutrientes das espécies de cogumelos silvestres comestíveis.	50
Tabela 5. Composição em não-nutrientes e propriedades antioxidantes in vitro (valores de EC ₅₀) das espécies de cogumelos silvestres comestíveis.....	52

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura de um cogumelo	13
Figura 2. Crescimento do cogumelo.....	14
Figura 3. Estrutura química dos aminoácidos mais abundantes em cogumelos silvestres.	22
Figura 4. Estrutura química de uma fosfatidilcolina (lecitina).	23
Figura 5. Estrutura química do ácido palmítico (16:0), ácido oleico (18:1 Δ^9) e ácido linoleico (18:2 $\Delta^{9,12}$).	24
Figura 6. Estrutura química do D-Manitol e da Trealose.	25
Figura 7. Estrutura química do ácido L-ascórbico.	27
Figura 8 . Estrutura química de tocoferóis	28
Figura 9. Estrutura química do β -caroteno.	29
Figura 10. Redução do DPPH*	41
Figura 11. Cromatograma individual de tocoferóis de <i>Lycoperdon umbrinum</i>	49
Figura 12. Actividade captadora de radicais DPPH, poder redutor e inibição da descoloração do β -caroteno de cinco espécies provenientes de diferentes habitats...	53
Figura 13. Cromatograma individual de açúcares de <i>Agaricus campestris</i>	55

Abreviaturas

A – Absorvância

A[•] - Radical livre

AH – Molécula antioxidante

AsH⁻ - Ião ascorbato

ArOH - Antioxidante fenólico

ABS - Absorvância

ANOVA - Análise de variância

AOAC - Association of Official Analytical Chemist

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

CE – Equivalentes de catequina

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

dw – Massa seca

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

FAME - Ésteres metílicos de ácidos gordos

FID - Detector de ionização de chama

fw – Massa fresca

GC - Cromatografia gasosa

GAE – Equivalentes de ácido gálico

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

nº - Número

nd - Não detectado
PI - Padrão interno
PUFA - Ácidos gordos polinsaturados
RI – Índice de refração
ROOH - Radical hidroperóxido reduzido
RSA - Actividade captadora de radicais livres
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

Os cogumelos são muito apreciados quer como alimentos nutritivos e saborosos, quer como fonte de compostos com propriedades medicinais. Nessa perspectiva, o enorme “reservatório” de cogumelos do Nordeste de Portugal deve ser química e nutricionalmente caracterizado para o benefício das populações e para a conservação genética de macrofungos silvestres.

Este trabalho contribui para a inventariação química, nutricional e bioactiva de espécies com potencial interesse (e ainda não caracterizadas na literatura) provenientes de diferentes habitats (*Castanea sativa*, *Pinus* sp., *Quercus* sp., prados e povoamentos mistos).

O valor nutricional foi obtido após determinação da humidade, proteínas, lípidos, glúcidos e cinzas. A determinação de macronutrientes incluiu a análise de mono e oligossacáridos (açúcares) e ácidos gordos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detecção por índice de refração (HPLC/RI) e por cromatografia gasosa acoplada a detecção por ionização de chama (GC/FID), respectivamente. A análise de micronutrientes incluiu a determinação de tocoferóis por HPLC-fluorescência, e ácido ascórbico e carotenóides por técnicas espectrofotométricas. Finalmente, a análise de não-nutrientes englobou a determinação de fenóis e flavonóides totais, que foram relacionados com as propriedades antioxidantes, avaliadas pela actividade captadora de radicais livres, poder redutor e inibição da peroxidação lipídica.

As espécies de cogumelos estudadas revelaram uma proporção equilibrada de macronutrientes, mas também micronutrientes importantes (tocoferóis, ácido ascórbico e carotenóides) e não-nutrientes (fenóis) com propriedades bioactivas, nomeadamente potencial antioxidante. Sendo uma fonte importante de antioxidantes, as espécies estudadas, principalmente *Suillus variegatus* (proveniente de um habitat de *Pinus* sp.), *Boletus armeniacus* (proveniente de um habitat de *Castanea sativa*), *Clavariadelphus pistillaris* (proveniente de um habitat de *Quercus* sp.), *Agaricus lutosus* (proveniente de um prado) e *Bovista aestivalis* (proveniente de um povoamento misto), podem ser incorporadas na alimentação como nutracêuticos e/ou alimentos funcionais, contribuindo para a manutenção e promoção da saúde, longevidade e qualidade de vida.

Abstract

Mushrooms have long been valued as highly tasty/nutritional foods and as a source of compounds with medicinal properties. The huge mushrooms “reservoir” of Northeast Portugal must be chemically and nutritionally characterized for the benefit of populations and for the wild macrofungi genetic conservation.

Herein, a chemical, nutritional and bioactive inventory of potentially interesting species (and not yet characterized in literature) from different habitats (*Castanea sativa*, *Pinus* sp., *Quercus* sp., fields and mixed stands) was performed.

The nutritional value was obtained after determination of moisture, proteins, lipids, carbohydrates and ash. The determination of macronutrients included the analysis of mono and oligosaccharides (sugars) and fatty acid by high performance liquid chromatography coupled to refraction index detection (HPLC/RI) and by gas chromatography coupled to flame ionization detection (GC/FID), respectively. The analysis of micronutrients included the determination of tocopherols by HPLC-fluorescence, and ascorbic acid and carotenoids by spectrophotometric techniques. The analysis of non-nutrients involved the determination of total phenols and flavonoids, which were further related to antioxidant properties, evaluated by free radical scavenging activity, reducing power and lipid peroxidation inhibition.¹

Besides macronutrients with a well-balanced proportion, the studied wild mushrooms have also important micronutrients (tocopherols, ascorbic acid and carotenoids) and non-nutrients (phenolics) with bioactive properties such as antioxidant potential. Furthermore, being a source of important antioxidants the wild species, mainly *Suillus variegatus* (*Pinus* sp. habitat), *Boletus armeniacus* (*Castanea sativa* habitat), *Clavariadelphus pistillaris* (*Quercus* sp. habitat), *Agaricus lutosus* (fields) and *Bovista aestivalis* (mixed stands), can be used in diet as nutraceuticals and/or functional foods maintaining and promoting health, longevity and life quality.

1. Introdução

1.1. Fungos

O estudo dos fungos (micologia), surgiu como um ramo da botânica. Estes constituem um grupo de seres vivos que possuem uma grande variedade de formas e tamanhos, podem ser organismos unicelulares (as leveduras) ou pluricelulares filamentosos que se caracterizam por serem organismos não-móveis, formados por filamentos com crescimento apical denominados de hifas, por terem um ciclo de vida com reprodução sexuada e assexuada, usualmente a partir de um talo comum (talo haplóide que resulta da meiose zigótica) e ainda por possuírem nutrição heterotrófica, alimentando-se de compostos orgânicos já em decomposição ou vivos. A sua parede celular é composta por quitina e glucanos (como alfa-glucanos) (Griffin, 1994; Alexopoulos et al., 1996).

É usual dividir os fungos em dois grupos segundo a sua estrutura: os unicelulares e os filamentosos. Estes últimos são os que existem na natureza em maior número. Os filamentos são estruturas tubulares chamadas hifas, que crescem apenas nas pontas ou regiões especializadas. Através de ramificações, e em algumas espécies, por meio de anastomose ou fusão de hifas, é formada uma rede desses filamentos à qual se dá o nome de micélio, **Figura 1** (Chang e Miles, 2004).



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

Os cogumelos são a parte visível de determinados fungos (Martins, 2004). Define-se cogumelo ou carpóforo como um macrofungo com um corpo de frutificação distinto que pode ser epígeo (acima do solo) ou hipógeo (dentro do solo) e suficientemente grande para ser visto a olho nu (Chang e Miles, 2004).

A estrutura a que habitualmente se dá o nome de cogumelo é na realidade 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 e 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 (Calonge, 1990). Após um período de crescimento, e em condições favoráveis, o micélio estabelecido produz a estrutura de frutificação, à qual chamamos de cogumelo, **Figura 2** (Chang e Miles, 2004).

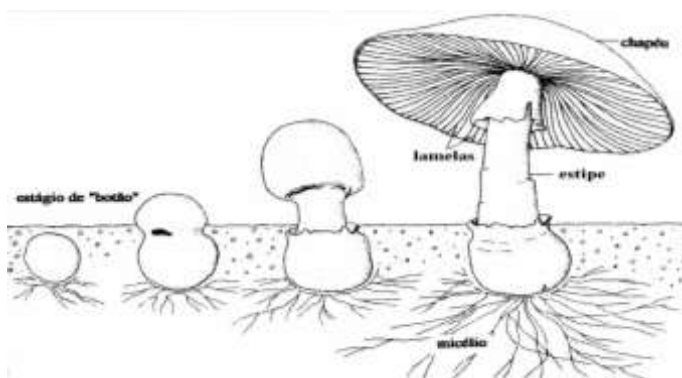


Figura 2. Crescimento do cogumelo (<http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/fungos/reino-fungi-17.php>).

O tipo mais comum de cogumelo é em forma de guarda-chuva, com píleo e estipe, e algumas espécies têm adicionalmente um anel, uma volva, ou ambos. Por baixo do chapéu apresentam uma superfície de consistência mole, o himénio, (que pode apresentar diferentes formas: lâminas ou lamelas, tubos ou poros, pregas mais ou menos definidas, superfícies lisas, entre outras), onde se produzem os esporos (Martins, 2004).

Contudo, esta estrutura não se aplica a todas as espécies, alguns cogumelos são em forma de taças flexíveis, outros são redondos como bolas de golfe, existem ainda aqueles que se assemelham a uma orelha humana. Constatamos, então, que existe uma incontável variedade de formas (Chang e Miles, 2004).

1.1.2. Ecologia

Os fungos têm vindo a desenvolver uma adaptação a todos ou quase todos os meios e possíveis formas de vida aquáticas e terrestres, podendo assim, viver sob a neve, água doce e salgada, em terra, nas areias escaldantes do deserto, em madeira, em húmus, em praias de areia, entre outro tipo de habitats (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 ingestão 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 (web 1).

Tendo em conta o seu comportamento como decompositores, os fungos podem ser saprófitas, parasitas ou ainda simbióticos dividindo-se estes últimos em micorrízicos (associações entre os 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 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, 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, ramos, troncos), terrícolas (vivem sobre terra sem vegetação e sem húmus, surgindo em taludes e bordaduras de caminhos), prátiolas (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).

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

1.1.3. Classificação

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 (Web 2). No entanto, em 1969 Robert Whittaker propôs a classificação em cinco reinos (reino animal, reino das plantas, reino dos fungos, reino protista e reino monera) onde pela primeira vez os fungos aparecem como um reino à parte (Carlile et al., 2001). Actualmente, a classificação de Cavallier 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.

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

O filo Zygomycota consiste em duas classes, os Zygomycetes e os Trichomycetes. Os zygomycetos 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 (Web 3). Por outro lado, os Trichomycetes são parasitas obrigatórios que vivem no intestino de insectos 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 e tal., 2003).

O 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 e Weber, 2007).

O Filo Blastocladiomycota 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 (web 5; web 7)

Os fungos do filo Neocallimastigomycota são anaeróbicos e podem encontrar-se, principalmente, no sistema digestivo dos grandes mamíferos herbívoros e possivelmente em outros ambientes anaeróbios terrestres e aquáticos (web 6; web 7).

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 (Web 4).

O filo Ascomycota é de longe o maior grupo do reino dos fungos, incluído mais de 32.000 espécies de 3400 géneros, no entanto é assumido que a maioria estará ainda por descobrir. A propriedade 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 e Weber, 2007).

Para finalizar 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. No caso dos géneros *Amanita*, *Boletus* (estudados neste trabalho) crescem num relacionamento mutuamente simbiótico com as raízes das árvores (Webster e Weber, 2007). Todos os fungos estudados neste trabalho pertencem a este filo, e às classes Basidiomycetae e Agaricomycetae. Nos primeiros, o micélio deste fungo está dentro do substrato e a parte visível é o corpo de frutificação (basidiocarpo) a qual se denomina de cogumelo. Após a reprodução sexuada, este grupo forma quatro esporos chamados basidiósporos, sobre o basídio. Estes podem ser encontrados em troncos de árvores, solos húmidos, sobre plantas e outras matérias orgânicas (web 9).

No caso dos Agaricomycetae, caracterizam-se por serem talvez os maiores e mais antigos organismos individuais da Terra. A maioria das espécies são terrestres surgindo numa grande variedade de ambientes onde a maioria funciona como decompositores, especialmente de madeira. Porém, algumas espécies são patogénicas, parasitas e ainda simbióticas (Web 8).

1.1.4. Valor alimentar dos cogumelos

Os cogumelos comestíveis são considerados um alimento de grande valor nutritivo, e valor nutracêutico, no entanto nem todos possuem estas duas qualidades em simultâneo. Podem ser considerados um alimento funcional (Zeisel, 1999).

A palatibilidade é uma das razões pela qual os cogumelos são tão apreciados, sendo esta caracterizada pela cor, textura, sabor e gosto, tendo uma vasta gama de sabores, texturas e odores. Outra das razões é o seu valor nutricional que envolve a análise da composição química e o estudo do perfil de aminoácidos, ácidos gordos, vitaminas, minerais e ácidos nucleicos presentes (Chang e Miles, 2004). Através de estudos constata-se que nutritivamente esta matriz alimentar tem duas vezes mais proteínas que os vegetais frescos, é uma ótima fonte de fibra e minerais, é detentora de um baixo teor em calorias e gordura, e especialmente, não possui colesterol.

Assim, desde muito cedo que os cogumelos são usados como nutracêuticos para combater algumas enfermidades, sendo as mais conhecidas a acção antibiótica e antitumoral (Bononi et al., 1999).

1.2. Nutrientes e nutracêuticos em cogumelos silvestres

Os macrofungos (cogumelos) representam um importante património cultural, isto porque, são usados desde tempos imemoriais como alimentos e medicamentos de acordo com o conhecimento ecológico tradicional transmitido ao longo de gerações, tendo havido povos que os consideravam um “alimento divino”.

Na natureza existem cerca de 25 espécies utilizadas de forma generalizada na alimentação (Bononi et al., 1999). No entanto, apesar da grande variabilidade observada entre as suas espécies, os cogumelos representam uma interessante parcela alimentar que pode contribuir para a formulação de uma dieta bem equilibrada (Manzi et al., 1999).

Na indústria alimentar os cogumelos têm sido avaliados como alimentos altamente saborosos e nutricionais. Na Europa, os cogumelos silvestres são escolhidos para consumo por ser uma boa fonte de proteína digestível, glúcidos, fibras e vitaminas (Barros et al., 2007a; Heleno et al., 2009; Kalač, 2009; Ouzouni et al., 2009). Os macrofungos utilizados tradicionalmente na gastronomia são, principalmente, fungos micorrízicos (possuem uma associação mutualista não patogénica entre fungos do solo e as raízes da planta) em que, através da fotossíntese a planta fornece energia e carbono para a sobrevivência e multiplicação dos fungos, enquanto estes absorvem nutrientes minerais e água do solo, transferindo-os para as raízes da planta) associados ecologicamente e economicamente a árvores importantes, como *Castanea sativa* (Baptista et al., 2010), *Pinus* sp. (Martín-Pinto et al., 2006) e *Quercus* sp. (Garibay-Orijel et al., 2009).

Os cogumelos são consumidos não só pela sua palatibilidade mas também pelo seu valor nutricional, sendo que a palatibilidade pode ser julgada pela cor, textura, gosto e aroma, mas o valor nutricional requer um trabalho mais científico que envolve a análise da composição química em macronutrientes como aminoácidos, ácidos gordos ou açúcares e micronutrientes como vitaminas ou minerais.

Os nutracêuticos estão presentes em matrizes alimentares e são usados com o objectivo de melhorar a saúde. Assim, um nutracêutico pode ser obtido a partir de extracto, micélio ou corpo de frutificação de um cogumelo, podendo ser consumido na

forma de cápsulas ou comprimidos como suplemento alimentar e que tem potencial aplicação terapêutica.

Como a Humanidade tem procurado constantemente novas substâncias que podem melhorar as funções biológicas e, assim, tornar as pessoas mais aptas e mais saudáveis, os cogumelos têm sido alvo de inúmeros estudos. Estima-se que existam cerca de 1800 espécies de cogumelos com potenciais atributos medicinais, no entanto, apenas são conhecidas as propriedades medicinais de cerca de 700 espécies (Chang e Miles, 2004).

Os macrofungos têm uma história de uso tradicional em terapias orientais, mas também em práticas clínicas modernas. Estes acumulam uma variedade de metabolitos bioactivos, como por exemplo, compostos fenólicos, policétidos, terpenos, esteróides e polissacáridos, com propriedades imunomoduladores, cardiovasculares, hepatoprotectoras, anti-fibróticas e anti-inflamatórias, anti-diabéticas, anti-virais, anti-microbianas e anti-tumorais (Lindequist et al., 2005; Poucheret et al, 2006; Zhang et al., 2007; Ferreira et al., 2010).

Em áreas como a indústria alimentar e farmacêutica os cogumelos representam um produto muito importante e valorizado, tendo sido em 2004, o valor económico associado à recolha de cogumelos silvestres comestíveis de 2.000 milhões de dólares (Boa, 2004). Assim, as suas características químicas e biológicas atraem grande interesse, uma vez que, podem ser biorreactores naturais para produção de compostos de interesse humano a usar em aplicações biotecnológicas.

Deste modo, o elevado interesse industrial mundial nesta matriz resultou num aumento colossal do número de produtos que chegam ao mercado nos últimos anos. O efeito medicinal e os benefícios para a saúde destes produtos não devem ser postos em dúvida, contudo, o maior problema associado aos suplementos dietéticos é a sua grande variedade e actual falta de produção e, ainda, protocolos de testes que são necessários para garantir a qualidade do produto. Durante as duas últimas décadas foram efectuadas pesquisas cujos resultados revelam que os cogumelos medicinais têm muito a oferecer ao sistema de cuidados de saúde para o ser humano no século XXI. Nos casos em que os medicamentos modernos podem não fornecer uma solução

completa, a complementação com estes nutracêuticos pode aumentar o sucesso do tratamento (Chang e Miles, 2004).

Assim, e na sequência do trabalho que o nosso grupo de investigação tem vindo a realizar para demonstrar o potencial medicinal dos cogumelos (Barros et al., 2007a; Heleno et al., 2010; Vaz et al., 2010; Vaz et al., 2011), é importante realizar um inventário químico, nutricional e bioactivo dessas espécies.

1.2.1. Macronutrientes

Nos dias de hoje, as doenças relacionadas com a proteína animal têm levantado enorme discussão em torno da questão da alimentação levando os consumidores a uma maior procura de produtos de origem vegetal que substituam a alimentação tradicional, isto porque, o facto dos cogumelos serem extremamente nutritivos faz com que possam ser comparados favoravelmente com carne, ovos e leite, fornecendo ao organismo os componentes fundamentais para o seu crescimento e manutenção. Nessa perspectiva, o consumo de cogumelos silvestres tem vindo a aumentar devido ao seu elevado teor de proteínas. Alguns estudos indicam mesmo uma composição em aminoácidos comparável à encontrada nas fontes de proteína animal (Barros et al., 2007a). Por outro lado, apesar da quantidade de proteína nos cogumelos ser inferior à da maioria das carnes de animais, é bastante superior à de outros alimentos, incluindo leite (Chang e Miles, 2004). Diversos autores descrevem os cogumelos como fontes de aminoácidos essenciais incluindo cisteína, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina. A leucina e a valina (**Figura 3**) são os aminoácidos essenciais mais abundantes, enquanto que a fenilalanina e o triptofano aparecem em quantidades reduzidas. Existe também a presença de aminoácidos não-essenciais, incluindo ácido aspártico, ácido glutâmico, alanina, arginina, asparagina, glicina, glutamina, prolina, serina e tirosina. De entre estes, a glutamina, o ácido glutâmico e o ácido aspártico são, muitas vezes, os maioritários (Léon-Guzmán et al., 1997; Longvah e Deosthale, 1998; Díez et al., 2001; Mdachi et al., 2004; Ribeiro et al., 2008; Kalač, 2009; Ouzouni et al., 2009). A análise foi efectuada por diferentes técnicas incluindo cromatografia de troca iónica acoplada a um analisador automático (Longvah e Deosthale, 1998), reacção 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).

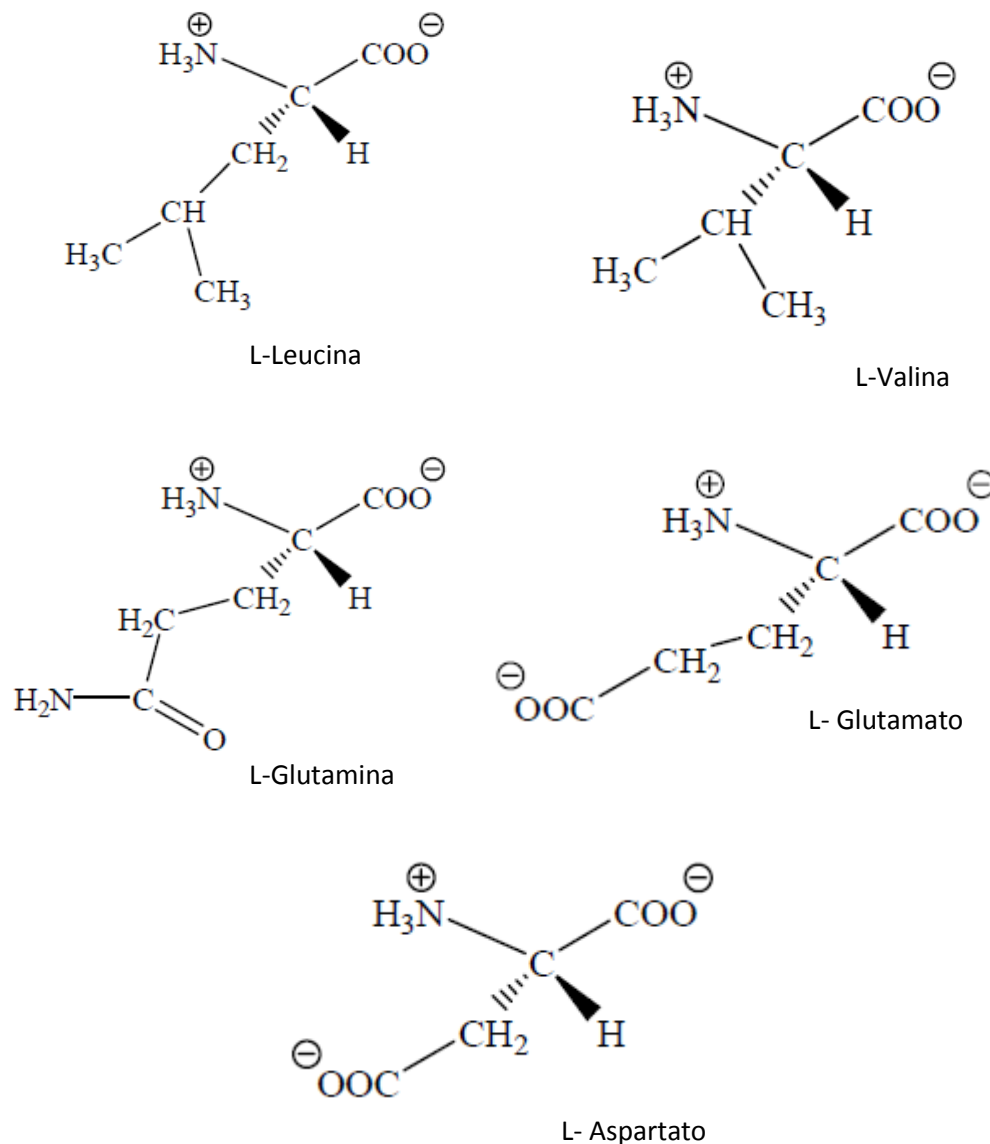


Figura 3. Estrutura química dos aminoácidos mais abundantes em cogumelos silvestres.

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 activas (neurotransmissores). Uma deficiência na produção de aminoácidos não-essenciais ou na ingestão de aminoácidos pode conduzir, directa ou indirectamente, a danos na Saúde, nomeadamente comprometendo a biossíntese de

neurotransmissores, respostas alérgicas e algumas funções sanguíneas (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 efectuados 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).

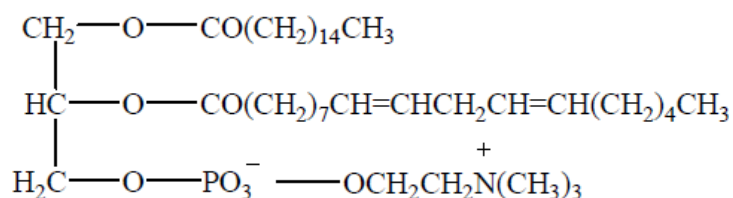


Figura 4. Estrutura química de uma fosfatidilcolina (lecitina).

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 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 e 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 (**Figura 5**). 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 actividades 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).

Assim, o facto dos cogumelos terem uma alta proporção de ácidos gordos insaturados em relação aos saturados, e uma alta percentagem de ácido linoleico, valoriza o seu consumo numa perspectiva de alimento saudável (Chang e Miles, 2004). No entanto, é de salientar que a composição de ácidos gordos nos cogumelos é variável de acordo com a espécie (Yilmaz, 2006).

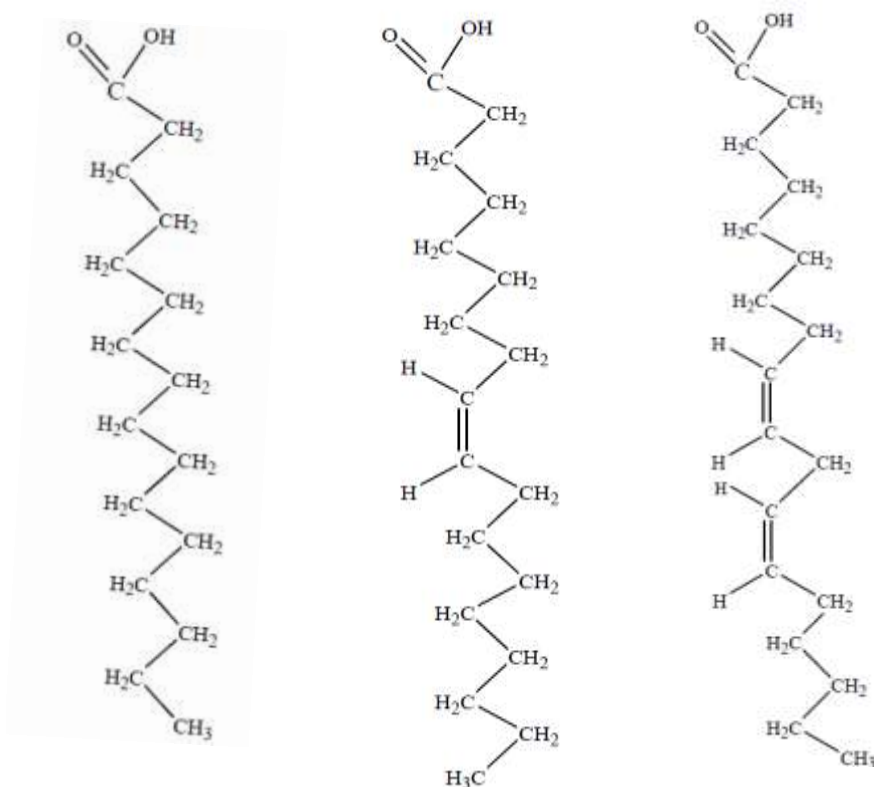


Figura 5. Estrutura química do ácido palmítico (16:0), ácido oleico (18:1 Δ^9) e ácido linoleico (18:2 $\Delta^{9,12}$).

Outros macronutrientes presentes nos cogumelos são os glúcidos. 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 e Miles, 2004). De acordo com vários trabalhos de investigação, o manitol e a trealose (**Figura 6**) são, respectivamente, 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 e Kalač, 2009).

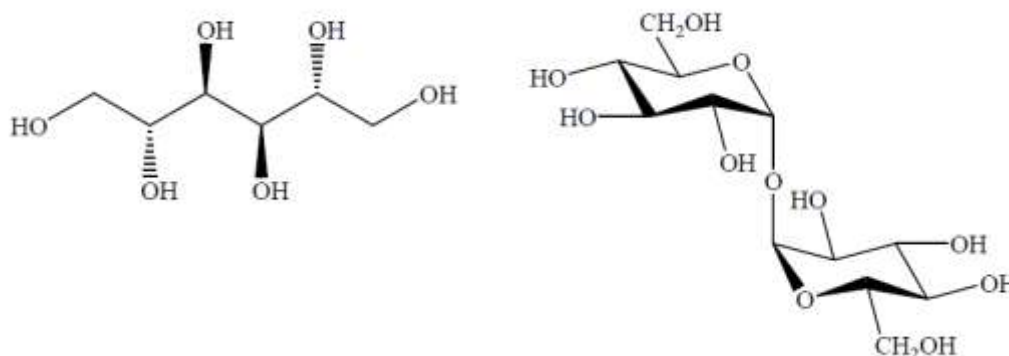


Figura 6. Estrutura química do D-Manitol e da Trealose.

Os álcoois derivados de açúcares, nomeadamente o manitol, garantem o suporte e expansão do corpo frutífero dos cogumelos (Barros et al., 2008b). Realmente, 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).

1.2.2. Micronutrientes

Os micronutrientes, embora sejam consumidos em menores quantidades, também são importantes para uma alimentação equilibrada e saudável. As vitaminas podem ser consideradas como substâncias de natureza orgânica indispensáveis para o crescimento e manutenção da saúde do homem. Não têm acção energética ou plástica

e actuam em doses muito reduzidas, na ordem do miligrama. No que diz respeito aos minerais é importante salientar que desempenham funções específicas e indispensáveis, estando a sua importância relacionada com a sua intervenção como agentes plásticos na formação e manutenção do esqueleto e sobretudo como agentes protectores na regulação do metabolismo de utilização (Ferreira, 1983).

Os cogumelos constituem uma boa fonte de minerais. Os minerais presentes no substrato são adquiridos pelo crescimento de micélio e transferidos para o esporóforo. O mineral que está presente em maior quantidade é o Potássio (K), seguido do Fósforo (P), Sódio (Na), Cálcio (Ca) e Magnésio (Mg), sendo estes considerados os principais constituintes minerais. O cobre (Cu), o zinco (Zn), o ferro (Fe), o manganésio (Mn), e, por fim o Cádmiio (Cd) representam os elementos minerais presentes em menor quantidade. Tendo em conta estudos anteriormente realizados, calcula-se que a concentração dos cinco elementos mais abundantes seja cerca de 56 a 70% do total dos componentes. O potássio (K) é particularmente abundante e responsável por 45% do total de cinzas (Chang e Miles, 2004).

O uso de suplementos vitamínicos e minerais é cada vez mais procurado, sendo que, vários tipos de suplementos são produzidos para crianças, adolescentes, adultos e mulheres grávidas (Kim et al., 2001). Com o objectivo de consumir este tipo de nutrientes numa forma natural, os corpos frutíferos dos macrofungos (cogumelos) são uma opção extremamente viável, tal como é demonstrado neste estudo.

Os cogumelos comestíveis têm sido descritos como uma boa fonte de várias vitaminas, incluindo a tiamina (vitamina B₁), riboflavina (vitamina B₂), niacina, biotina e ácido ascórbico (Chang e Miles, 2004).

O ácido ascórbico, ou como é chamado vulgarmente, vitamina C é um micronutriente abundante nos cogumelos (Yi et al., 2009), sendo uma γ -lactona com um grupo enodiol nos carbonos 2 e 3 como está representado na **Figura 7** (Lehninger et al., 2008). Esta vitamina tem sido considerada por alguns cientistas como uma "universal panacea" devido às suas características bioquímicas e funções gerais farmacológicas, podendo prevenir a ocorrência e desenvolvimento de algumas doenças crónicas, assim como, doenças cardiovasculares, cancro e catarata, actuando como um antioxidante muito eficaz que pode proteger as moléculas indispensáveis

para o organismo dos danos causados pelos radicais livres e espécies reactivas de oxigénio (Yi et al., 2009).

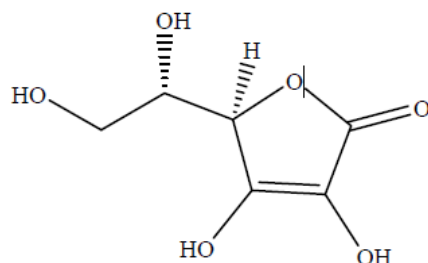


Figura 7. Estrutura química do ácido L-ascórbico.

Outra vitamina de grande relevância na composição nutricional dos cogumelos é a Vitamina E. Esta é uma vitamina lipossolúvel com actividade antioxidante altamente eficaz que quebra a cadeia que protege as membranas celulares contra danos oxidativos (Lo Fiego et al., 2004) e intervém também na actividade anti-tumoral (Mitchel e McCann, 2003). A vitamina E é um termo usado frequentemente para designar uma família de compostos quimicamente relacionados, ou seja, tocoferóis e tocotrienóis. Em estudos anteriores o α -tocoferol foi considerado a forma mais activa da vitamina E em humanos, tendo sido demonstrado que apresentam uma grande actividade biológica, no entanto, estudos mais recentes têm incidido noutras isoformas da vitamina E em relação aos benefícios para a saúde. Devido ao seu papel como captador de radicais livres, a vitamina E também intervém no que diz respeito à protecção do nosso corpo contra anomalias degenerativas, principalmente, cancro e doenças cardiovasculares (Fang et al., 2002). Nos cogumelos foram apenas detectados tocoferóis (**Figura 8**), antioxidantes naturais muito importantes nos alimentos, especialmente naqueles que são ricos em ácidos gordos polinsaturados.

A eficácia desta vitamina como um antioxidante, não depende apenas da sua reactividade em relação a radicais prejudiciais, mas também da natureza relativamente estável do seu radical devido à deslocalização do electrão desemparelhado sobre o anel cromanol (Kagan et al., 2003).

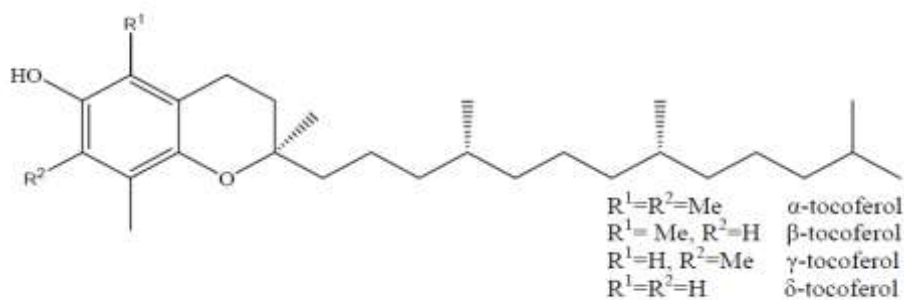
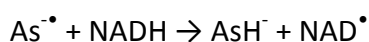
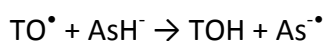


Figura 8 . Estrutura química de tocoferóis.

Assim, as Vitaminas C e E são os principais antioxidantes naturais que estão presentes nos alimentos.

Existem interações cooperativas entre estas duas vitaminas que actuam sinergeticamente na interface membrana-citosol para regenerar a forma de vitamina E oxidada ligada à membrana (Chew, 1995; Nagaoka et al., 2007). Como antioxidante lipofílico, a vitamina E (tocoferóis) pode interagir com componentes lipídicos das membranas celulares ou com lipoproteínas de baixa densidade, protegendo-os de danos oxidativos. Dessa interacção, resulta uma oxidação dos tocoferóis que são transformados em radicais tocoferoxilo reactivos que, por sua vez, podem reagir com lípidos insaturados ($TO^\bullet + LH \rightarrow TOH + L^\bullet$) ou hidroperóxidos lipídicos ($TO^\bullet + LOOH \rightarrow TOH + LOO^\bullet$), iniciando a oxidação lipídica (efeito pró-oxidante). Para evitar este efeito, a vitamina E oxidada pode ser novamente reduzida à sua forma antioxidante por substâncias redutoras em fase aquosa como o ácido ascórbico. 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 efectivamente as células da peroxidação lipídica (Chew, 1995).

A molécula de β -caroteno é um carotenóide pertencente à classe dos terpenos (lípidos simples). Apresenta uma estrutura poliisoprénica com uma longa cadeia de ligações duplas conjugadas responsável pela sua reactividade química e propriedades de absorção de luz. Em cada extremidade, a molécula apresenta um ciclo-hexeno substituído (Lehninger et al., 2008) como está representado na **Figura 9**.

Os carotenóides actuam como antioxidantes interrompendo reacções em cadeia em ambiente lipídico. A presença de várias ligações duplas torna os carotenóides susceptíveis ao ataque dos radicais peróxido (LOO^\bullet), originando produtos inactivos (Chew, 1995). É também relevante referir o facto dos carotenóides parecerem exercer efeitos benéficos na prevenção de doenças nomeadamente cancro, doenças cardiovasculares e osteoporose (Rao e Rao, 2007).

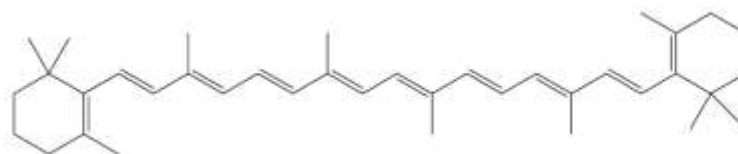


Figura 9. Estrutura química do β -caroteno.

1.2.3. Não-nutrientes

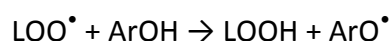
Os macrofungos (cogumelos) são fontes ricas em compostos antioxidantes tais como os não-nutrientes compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonóides) e os micronutrientes tocoferóis e carotenóides já referidos anteriormente (Ferreira et al., 2009).

Entre as substâncias biologicamente activas presentes nos cogumelos, os compostos fenólicos têm atraído muita atenção devido às suas propriedades como excelentes antioxidantes, anti-inflamatórios ou anti-tumorais (Palácios et al., 2011). Estes são compostos aromáticos hidroxilados, detendo um ou mais anéis aromáticos, com um ou mais grupos hidroxilo. Incluem um grande número de subclasses, tais como flavonóides, ácidos fenólicos (derivados do ácido hidroxibenzóico e do ácido

hidroxicinâmico), estilbenos, lignanas, taninos e polifenóis oxidados, exibindo uma grande diversidade de estruturas. Assim, os compostos fenólicos podem actuar como captadores de radicais livres, quelantes de metais ou reguladores de enzimas (Palácios et al., 2011).

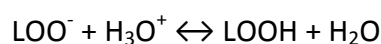
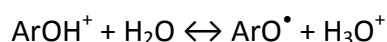
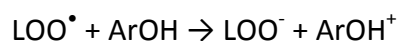
A actividade antioxidante dos ácidos fenólicos (ArOH) parece estar relacionada com os grupos fenólicos através de mecanismos de transferência de:

(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 reacções em cadeia (Wright et al., 2001).

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



A equação global deste processo é idêntica à apresentada no mecanismo anterior (Wright et al., 2001).

A entalpia de dissociação da ligação ArO-H (mecanismo *i*) e o potencial de ionização de ArOH^+ (mecanismo *ii*) são determinantes para a actividade antioxidante. Grupos dadores de electrões no anel benzénico diminuem, normalmente, estes parâmetros (Wright et al., 2001). Efectivamente, as substituições na estrutura da molécula influenciam a sua capacidade de participar no controlo das reacções em cadeia e formar radicais ArO^\bullet (fenoxilo) mais estabilizados, nomeadamente pelo aumento da deslocalização electrónica ou pela formação de ligações de hidrogénio intramoleculares (Cuvelier et al., 1992).

Os flavonóides constituem o sub-grupo mais comum e amplamente distribuído na Natureza (Bravo, 1998). No entanto, há vários estudos que mencionam os ácidos fenólicos como os principais compostos fenólicos em fungos, especialmente em cogumelos (Ferreira et al., 2009). Os compostos fenólicos têm efeitos específicos na saúde, embora sejam compostos não nutritivos (Vaz et al., 2011).

A actividade antioxidante de extractos ricos em compostos fenólicos é geralmente correlacionada com o teor de fenóis totais, quantificados através do ensaio de Folin-Ciocalteu (Palácios et al., 2011). Nos últimos anos tem sido observada a expansão constante do sector de cogumelos no que se refere às suas propriedades medicinais (Chang e Miles, 2004).

Têm sido procuradas potenciais fontes de antioxidantes naturais em diferentes tipos de materiais vegetais, como legumes, frutas, folhas, sementes oleaginosas, cereais, cascas de árvore, raízes, entre outros (Sultana et al., 2007).

Estudos efectuados indicam que alguns cogumelos comestíveis são valiosas fontes de compostos biologicamente activos com potencial para proteger o DNA celular contra danos oxidativos. Tais compostos protectores possuem valor comercial como suplementos alimentares, para compensar efeitos biológicos adversos associados à doença cardíaca coronariana, cancro e doenças neurodegenerativas. Estes também podem facilitar o desenvolvimento de tratamentos para a reparação de danos no DNA celular que ocorre durante certos processos de quimioterapia e radioterapia (Chang e Miles, 2004).

Os compostos bioactivos purificados que derivam de cogumelos medicinais são uma fonte potencialmente importante de novos antioxidantes naturais que influenciam positivamente doenças relacionadas como stresse oxidativo, tal como o cancro (Moradali et al., 2005; Zaidman et al., 2005; Valko et al., 2007; Ferreira et al., 2009).

Deste modo, é de máxima relevância encontrar antioxidantes naturais para utilização na alimentação com o objectivo de retardar a oxidação lipídica ou em aplicações farmacêuticas para doenças crónicas relacionadas com a produção de radicais livres (Prior, 2003).

1.3. Objectivos

O enorme “reservatório” de cogumelos do Nordeste de Portugal deve ser química e nutricionalmente caracterizado com vista a aplicações de práticas sustentáveis em sistemas biotecnológicos e indústrias para o benefício das populações, contribuindo para a conservação genética de macrofungos silvestres.

No presente trabalho aborda-se a composição nutricional de cogumelos silvestres, no que concerne aos seus macronutrientes, micronutrientes e não-nutrientes. Deste modo, foi realizado um inventário químico, nutricional e bioactivo de espécies potencialmente interessantes (e ainda não caracterizadas na literatura) de diferentes habitats (*Castanea sativa*, *Pinus* sp., *Quercus* sp., prados e povoamentos mistos) do Nordeste de Portugal.

Foram estudadas as seguintes espécies de cogumelos: *Boletus armeniacus*, *Clitocybe gibba*, *Hygrophorus chrysodon*, *Lycoperdon umbrinum*, *Suillus variegates*, *Boletus impolitus*, *Clavariadelphus pistillaris*, *Ramaria aurea*, *Agaricus campestris*, *Agaricus comtulus*, *Agaricus lutosus*, *Leucoagaricus leucothites*, *Amanita umbrinolutea*, *Bovista aestivalis*, *Bovista nigrescens*, *Chlorophyllum rhacodes*, *Clavariadelphus truncatus*, *Clitocybe costata*, *Cortinarius praestans*, *Flammulina velutipes*.

O valor nutricional foi obtido após determinação do teor de humidade, proteínas, lípidos, glúcidos e cinzas. A determinação de macronutrientes incluiu a análise de mono e oligossacáridos (açúcares) e ácidos gordos por HPLC/RI e GC/FID, respectivamente.

A análise de micronutrientes incluiu a determinação de tocoferóis por HPLC-fluorescência, ácido ascórbico e carotenóides por técnicas espectrofotométricas.

A análise de não-nutrientes englobou a determinação de fenóis e flavonóides totais.

As propriedades antioxidantes foram também estudadas através do efeito captador de radicais livres, poder redutor e inibição da peroxidação lipídica.

2. Material e métodos

2.1. Amostras

As vinte espécies de cogumelos comestíveis silvestres (*Boletus armeniacus*, *Clitocybe gibba*, *Hygrophorus chrysodon*, *Lycoperdon umbrinum*, *Suillus variegatus*, *Boletus impolitus*, *Clavariadelphus pistillaris*, *Ramaria aurea*, *Agaricus campestris*, *Agaricus comtulus*, *Agaricus lutosus*, *Leucoagaricus leucothites*, *Amanita umbrinolutea*, *Bovista aestivalis*, *Bovista nigrescens*, *Chlorophyllum rhacodes*, *Clavariadelphus truncatus*, *Clitocybe costata*, *Cortinarius praestans*, *Flammulina velutipes*) foram colhidas em Bragança (Nordeste de Portugal) especificamente para a realização deste trabalho.

A escolha das amostras para análise foi feita tendo em conta determinados parâmetros de máxima relevância para este trabalho, tal como o habitat, tendo sido feita a colheita em povoamentos de *Castanea sativa*, *Pinus* sp., *Quercus* sp., prados e povoamentos mistos. Todos os cogumelos foram colhidos nos meses de Outubro e Novembro de 2010.

As informações sobre as mesmas são apresentadas na **Tabela 1**, onde se poderá ter informação sobre a identificação taxonómica, sendo esta efectuada, de acordo com vários autores (Benguría, 1985; Phillips, 1988; Galli, 2001; Frade & Alfonso, 2005; Moreno, 2005).

Exemplares representativos foram depositados no herbário da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança. Todas as espécies 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 analisados.

Espécie	Reino	Divisão	Classe	Ordem	Família	Género	Referência	Ecologia	Data de colheita
<i>Agaricus campestris</i>	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Agaricaceae	Agaricus	(L.)	Saprofita	Outubro 2010
<i>Agaricus comtulus</i>	Fungi	Basidiomycota	Basidiomycetes	Agaricales	Agaricaceae	Agaricus	(Fr.)	Saprofita	Outubro 2010
<i>Agaricus lutosus</i>	Fungi	Basidiomycota	Basidiomycetes	Agaricales	Curculionoidea	Agaricus	(F.H. Møller) F.H. Møller	Saprofita	Novembro 2010
<i>Amanita umbrinolutea</i>	Fungi	Basidiomycota	Basidiomycetes	Agaricales	Amanitaceae	Amanita	(Secr. ex Gillet) Bataille	Micorrizico	Outubro 2010
<i>Boletus armeniacus</i>	Fungi	Basidiomycota	Basidiomycetes	Boletales	Boletaceae	Boletus	(Qué.)	Micorrizico	Novembro 2010
<i>Boletus impolitus</i>	Fungi	Basidiomycota	Basidiomycetes	Boletales	Boletaceae	Boletus	(Fr.)	Micorrizico	Novembro 2010
<i>Bovista aestivalis</i>	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Lycoperdales	Lycoperdaceae	Bovista	(Bonord.) Demoulin	Saprofita	Novembro 2010
<i>Bovista nigrescens</i>	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Lycoperdales	Lycoperdaceae	Bovista	(Pers.)	Saprofita	Novembro 2010
<i>Chlorophyllum rhacodes</i>	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Agaricaceae	Chlorophyllum	(Vittad.)	Saprofita	Outubro 2010
<i>Clavariadelphus pistillaris</i>	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Gomphales	Clavariadelphaceae	Clavariadelphus	(L.) Donk	Micorrizico	Outubro 2010
<i>Clavariadelphus truncatus</i>	Fungi	Basidiomycota	Basidiomycetes	Gomphales	Gomphaceae	Clavariadelphus	(Qué.) Donk	Micorrizico	Novembro 2010
<i>Clitocybe costata</i>	Fungi	Basidiomycota	Basidiomycetes	Agaricales	Tricholomataceae	Clitocybe	(Kühner & Romagn.)	Saprofita	Outubro 2010
<i>Clitocybe gibba</i>	Fungi	Basidiomycota	Basidiomycetes	Agaricales	Tricholomataceae	Clitocybe	(Pers.)	Saprofita	Novembro 2009
<i>Cortinarius praestans</i>	Fungi	Basidiomycota	Basidiomycetes	Agaricales	Cortinariaceae	Cortinarius	(Cordier)	Micorrizico	Outubro 2010
<i>Flammulina velutipes</i>	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Phialacriaceae	Flammulina	(Curt.: Fries) Singer	Saprofita	Novembro 2010
<i>Hygrophorus chrysodon</i>	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Hygrophoraceae	Hygrophorus	(Batsch) Fr.	Saprofita	Novembro 2010
<i>Leucoagaricus leucothites</i>	Fungi	Basidiomycota	Basidiomycetes	Agaricales	Agaricaceae	Leucoagaricus	(Vittadini) Wasser	Saprofita	Outubro 2010
<i>Lycoperdon umbrinum</i>	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Agaricaceae	Lycoperdon	(Pers.)	Saprofita	Outubro 2010
<i>Ramaria aurea</i>	Fungi	Basidiomycota	Basidiomycetes	Phallales	Gomphaceae	Ramaria	(Schaeff.) Qu	Micorrizico	Novembro 2010
<i>Suillus variegatus</i>	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Suillaceae	Suillus	(Sw.) Kuntze	Micorrizico	Outubro 2010

2.2. Padrões e reagentes

Os solventes Acetonitrilo 99,9%, *n*-hexano 95% e acetato de etilo 99,8%, grau HPLC, foram fornecidos pela Fisher Scientific (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 L-ascórbico, os tocoferóis (α -, β -, γ -, e δ -isoformas), os açúcares (D(-)-frutose, D(-)-manitol, D(+)-rafinose penta-hidratada e D(+)-trealose), o trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), o ácido gálico e a (+)-catequina. 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

2.3.1. Avaliação do valor nutricional

As amostras foram analisadas quanto à composição química (humidade, proteínas, lípidos, glúcidos e cinzas) utilizando, para tal, os procedimentos AOAC (AOAC, 1995).

O teor de proteína (N x 4,38) das amostras foi estimado pelo método macro-Kjeldahl; Os lípidos foram determinados pela extração de uma massa conhecida da amostra liofilizada com éter de petróleo, usando um aparelho de Soxhlet; O teor de cinzas foi determinado por incineração a $600 \pm 15^\circ\text{C}$. Os glúcidos foram calculados por diferença e a energia total foi determinada de acordo com a seguinte equação: Energia (kcal) = 4 x (g proteínas + glúcidos g) + 9 x (g lípidos).

2.3.2. Determinação de açúcares livres

Foi adicionado 1 ml do padrão interno PI (rafinose, 25 mg/ml) à amostra liofilizada (1 g) e extraiu-se com 40 ml de etanol 80% a 80 °C durante 1 h e 30. 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 injectado foi de 10 µl.

Os açúcares livres foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de índice de refração (HPLC-RI), de acordo com o procedimento implementado pelo nosso grupo de investigação (Helena et al., 2009). O equipamento era um sistema integrado com uma bomba (Knauer, Smartline 1000), sistema desgaseificador (Smartline manager 5000), amostrador automático (AS-2057 Jasco) e um detector de RI (Knauer, Smartline 2300). Os dados foram analisados usando Clarity 2.4 Software (DataApex). A separação cromatográfica foi conseguida com uma coluna NH2 Eurospher 100-5 (4,6 x 250 mm, 5 mm, Knauer) operando a 30°C (forno Grace 7971). A fase móvel foi água desionizada/acetoneitrilo, 70:30 (v/v) com um fluxo de 1 ml/min.

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 (dw).

2.3.3. Determinação de ácidos gordos

Os ácidos gordos foram determinados por cromatografia gasosa com detecção de ionização de chama (GC-FID)/coluna capilar, de acordo com o procedimento implementado pelo nosso grupo de investigação (Helena et al., 2009).

A massa obtida por extracção em Soxhlet foi misturada com 5 ml de metanol: ácido sulfúrico: tolueno 2:1:1 (v/v/v), durante pelo menos 12 h, num banho a 50 °C a 160 rpm; de seguida, adicionaram-se 3 ml de água desionizada, para obter a separação

das fases. A FAME foi recuperada com 3 ml de éter etílico em agitação no vórtex; fez-se passar o sobrenadante através de uma microcoluna de sulfato de sódio anidro, a fim de eliminar a água; recuperou-se a amostra para um frasco com teflon e filtrou-se com um filtro de nylon 0,2 µm Milipore. O perfil de ácidos gordos foi obtido num GC (DANI 1000) equipado com um injector *split/splitless*, detector de ionização de chama (FID) e uma coluna Macherey Nagel (30 m × 0.32 mm × 0.25 µm). 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. A injeção *split* (1:40) foi realizada a 250 °C. Para cada análise, injectou-se 0,1 µl da amostra. A identificação de ácidos gordos foi feita com base nos tempos de retenção relativos dos picos da FAME e das amostras. Os resultados foram processados usando o software CSW 1.7 (DataApex 1.7) e expressos em percentagem relativa de cada ácido gordo.

2.4. Determinação de micronutrientes

2.4.1. Determinação de tocoferóis

Foram adicionados às amostras liofilizadas, antes de proceder à extracção, 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 (2,0 µg/ml; 250 µl). As amostras, cuja massa aproximada foi de 500 mg, foram homogeneizadas com 4 ml de metanol num vórtex durante 1 minuto. Posteriormente, adicionaram-se 4 ml de hexano e homogeneizou-se novamente no vórtex durante 1 min. Seguidamente, adicionaram-se 2ml de uma solução de NaCl, homogeneizando-se a mistura durante 1 min, centrifugou-se (centrífuga refrigerada Centurion K24OR- 2003, 5 min, 4000g) e o sobrenadante foi transferido para um frasco, tendo a amostra sido extraída mais duas vezes com hexano. Os extractos foram levados à secura utilizando uma corrente de azoto,

dissolvidos em 1ml de hexano, desidratados com sulfato de sódio anidro, filtrados através de um filtro (0,22 µm), transferidos para frascos ambar e analisados no HPLC.

O teor de tocoferóis foi determinado seguindo um procedimento implementado pelo nosso grupo de investigação (Helena et al., 2010). A análise foi realizada no sistema de HPLC descrito anteriormente, conectado a um detector 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, Japão) a 30 °C. A fase móvel utilizada foi uma mistura de *n*-hexano e acetato de etilo (70:30, v/v) com um fluxo de 1 ml/min. O volume de amostra injectado foi de 20 µl.

Os compostos foram identificados por comparação cromatográfica com padrões e a quantificação foi baseada na resposta do sinal de fluorescência, usando o método do padrão interno. Os resultados foram expressos em µg por 100 g de massa seca (dw).

2.4.2. Determinação do teor de ácido ascórbico

O ácido ascórbico foi determinado através de um procedimento implementado pelo nosso grupo de investigação (Grangeia et al., 2011) A amostra liofilizada (150 mg) foi extraída com ácido metafosfórico (1%, 5 ml) durante 20 min à temperatura ambiente e filtrada através de um papel de filtro Whatman n.º 4. O filtrado (0,5 ml) foi misturado com 2,6-dicloro-indofenol (4,5 ml) e, após 15 min, mediu-se a absorvância a 515 nm (Espectrofotómetro AnalytikJena). O teor de ácido ascórbico foi calculado 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 (dw).

2.4.3. Determinação do teor de carotenóides

O β-caroteno e o licopeno foram determinados seguindo um procedimento implementado pelo nosso grupo de investigação (Grangeia et al., 2011). A amostra liofilizada (150 mg) foi extraída com 5 ml de acetona-hexano (4:6) durante 1 min e

filtrada através de papel de filtro Whatman n.º 4. A absorvância do filtrado foi medida a 453, 505, 645 e 663 nm.

A quantidade dos mesmos foi calculada de acordo com as seguintes equações: β -caroteno (mg/100 ml) = $0.216 \times A_{663} - 1.220 \times A_{645} - 0.304 \times A_{505} + 0.452 \times A_{453}$; Licopeno (mg/100 ml) = $-0.0458 \times A_{663} + 0.204 \times A_{645} - 0.304 \times A_{505} + 0.452 \times A_{453}$, e convertida em mg por 100 g de massa seca (dw).

2.5. Determinação de não-nutrientes e avaliação das propriedades antioxidantes

2.5.1. Extracção das amostras

As amostras (1,5 g de massa seca) foram extraídas com 50 ml de metanol a 25 °C, 150 rpm, durante 1 h e filtradas através de papel Whatman n.º 4. O resíduo foi então re-extraído com mais 50 ml de metanol. Os extractos metanólicos foram combinados e evaporados a 35 °C sob pressão reduzida, re-dissolvidos em metanol numa concentração final de 50 mg/ml e armazenados a 4 °C. Posteriormente, foram preparadas várias concentrações dos extractos metanólicos a partir da solução inicial (50mg/ml): 20, 10, 15, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 e 0.15625 mg/ml.

2.5.2. Determinação do teor de fenóis

Os fenóis totais foram determinados pelo ensaio de Folin-Ciocalteu de acordo com Wolf et al., 2003. A solução de extracto (0,5 ml) foi misturada com Folin-Ciocalteu (2,5 ml, previamente diluído com água 1:10, v/v) e carbonato de sódio (75 g/l, 2 ml). Os tubos foram agitados no vórtex durante 15 seg e deixou-se repousar por 30 min a 40 °C para o desenvolvimento de cor. A absorvância foi medida a 765 nm. Utilizou-se ácido gálico para obter curva padrão ($9.4 \times 10^{-3} - 0.15$ mg/ml) e os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico (GAE) por g de extracto.

2.5.3. Determinação do teor de flavonóides

Para a quantificação de flavonóides, o extracto da amostra (2,5 mg/ml ou 5 mg/ml; 0,5 ml) foi misturado com água destilada (2 ml) e com solução de NaNO₂ (5%, 0,15 ml). Após 6 min, adicionou-se a solução de AlCl₃ (10%, 0,15 ml) e deixou-se repousar por mais 6 minutos. Posteriormente, adicionou-se solução de NaOH (4%, 2 ml) e água destilada até um volume final de 5 ml. A mistura foi devidamente agitada e deixada em repouso durante 15 min (Jia et al., 1999). A intensidade da cor rosa foi avaliada por determinação da absorvância de 510 nm. Utilizou-se (+)-catequina para calcular a curva padrão (1.5×10⁻²-1.0 mM) e os resultados foram expressos em mg de equivalentes de (+)-catequina (CE) por grama de extracto.

2.5.4. Avaliação da actividade captadora de radicais DPPH

Esta metodologia foi realizada num Leitor de microplacas (Bio-Tek ELX800). A mistura de reacção em cada um dos 96 poços consistia em: soluções dos extractos com diferentes concentrações (30 µl) e solução metanólica de DPPH (6 x 10⁻⁵ mol/l; 270 µl). A mistura foi deixada em repouso durante 60 min no escuro para a estabilização dos valores de absorvância, sendo a redução do radical DPPH avaliada pela medição da absorvância a 515 nm. A actividade captadora de radicais livres (RSA) foi calculada usando a equação: % RSA = [(A_{DPPH}-A_S) / A_{DPPH}] x 100, onde A_S é a absorvância da solução na presença de extracto numa determinada concentração e A_{DPPH} é a absorvância da solução de DPPH. A concentração de extracto correspondente a 50% de actividade captadora de radicais (EC₅₀) foi calculada a partir da representação gráfica da percentagem de RSA em função da concentração do extracto. Utilizou-se trolox como padrão.

Fundamento teórico: O DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) é um radical de azoto

estável, disponível comercialmente e que tem uma cor púrpura intensa, que reage com compostos que podem doar um átomo de hidrogénio. Este método baseia-se na captação do DPPH[•] através da adição de uma espécie ou um radical antioxidante que descolora a solução de DPPH, **Figura 10** (Antolovich et al., 2002; Amarowicz et al., 2004).

Forma-se a correspondente hidrazina que apresenta uma cor amarela pálido, com diminuição da absorvância a 517 nm.

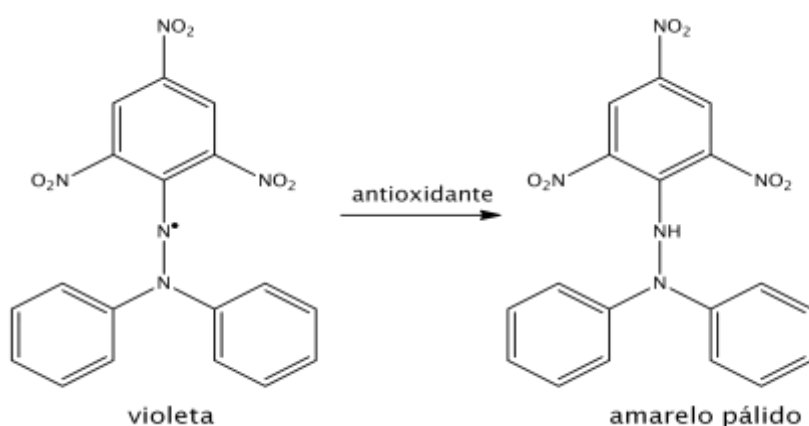


Figura 10. Redução do DPPH[•].

A actividade captadora de radicais (RSA) é calculada como percentagem da descoloração da solução de DPPH.

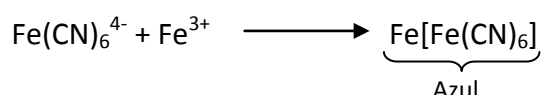
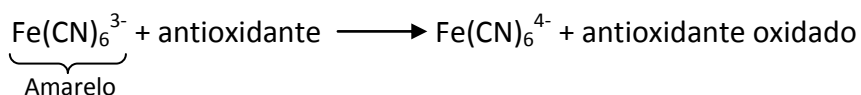
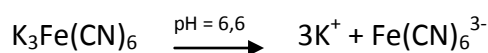
2.5.5. Avaliação do poder redutor

Esta metodologia foi realizada utilizando o Leitor de Microplacas anteriormente descrito. As soluções de extracto com diferentes concentrações (0,5 ml) foram misturadas com tampão fosfato de sódio (200 mmol/l; pH 6,6; 0,5 ml) e ferricianeto de potássio (1% w/v; 0,5 ml). A mistura foi incubada a 50 °C durante 20 min, tendo sido de seguida adicionado ácido tricloroacético (10% w/v; 0,5 ml). A mistura (0,8 ml) foi colocada em microplacas 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.

A concentração de extracto que fornece 0,5 de absorvância (EC_{50} - 50% do valor máximo de absorvância em que se aplica a Lei de Lambert-Beer) foi calculada a partir da representação gráfica da absorvância a 690 nm em função da concentração do extracto. Utilizou-se trolox como padrão.

Fundamento teórico: Este ensaio mede a capacidade dos antioxidantes para reduzir o complexo Fe(III)/ferricianeto $[FeCl_3/K_3Fe(CN)_6]$ a Fe(II), forma ferrosa (Berker, 2007). Assim, dependendo do poder redutor dos compostos, a cor amarela da solução do ensaio altera-se para diferentes tons de verde ou azul, e pode ser medida espectrofotometricamente, a 700 nm.

A química dos ensaios baseados no ferro pode ser resumida pelas seguintes equações:

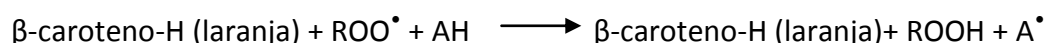


2.5.6. Avaliação da inibição da descoloração do β -caroteno

Preparou-se uma solução de β -caroteno por dissolução de β -caroteno (2 mg) em clorofórmio (10 ml). Pipetaram-se dois mililitros dessa solução para um balão de fundo redondo. Após remoção do clorofórmio a 40 °C sob vácuo, procedeu-se á adição de ácido linoleico (40 mg), emulsificante Tween 80 (400 mg) e água destilada (100 ml) agitando vigorosamente. Transferiram-se as alíquotas (4,8 ml) da emulsão anterior para tubos de ensaio contendo as soluções de extracto com diferentes concentrações (0,2 ml).

Os tubos foram agitados e incubados a 50 °C em banho-maria. Imediatamente após a adição da emulsão a cada tubo, mediu-se a absorvância a 470 nm no tempo zero. A inibição da descoloração do β -caroteno foi calculada utilizando a seguinte equação: (conteúdo de β -caroteno após 2 h de ensaio/conteúdo inicial de β -caroteno) \times 100. A concentração de extracto que origina 50% de actividade antioxidante (EC_{50}) foi calculada por interpolação a partir do gráfico de percentagem da inibição da descoloração do β -caroteno em função da concentração de extracto. Utilizou-se trolox como padrão.

Fundamento teórico: O ensaio de descoloração do β -caroteno baseia-se em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do β -caroteno e avalia a actividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico; a absorvância é medida a 470 nm. O mecanismo de reacção envolve a descoloração dos carotenóides através da oxidação induzida pelo calor. Essa descoloração pode ser inibida ou diminuída pela adição de antioxidantes contidos na amostra (Amarowicz et al., 2004; Kaur et al., 2006):



2.6. Análise estatística

Para cada uma das espécies foram utilizadas três amostras e todos os ensaios foram realizados em triplicado. Os resultados foram expressos em valores médios \pm desvio padrão (SD). Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste HSD de Tukey com $\alpha = 0,05$. Este tratamento foi realizado utilizando o programa SPSS v. 16,0.

3. Resultados obtidos

Os resultados relativos à composição em macronutrientes e valor energético das amostras de cogumelos silvestres comestíveis são apresentados na **Tabela 2**. O teor em água varia entre 16 g/100g de massa seca na espécie *Bovista nigrescens* e 92 g/100g de massa seca na espécie *Hygrophorus chrysodon*. Os glúcidos, calculados por diferença conhecendo o valor de proteínas e lípidos, são os macronutrientes mais abundantes e os níveis mais altos correspondem à espécie *Ramaria aurea* (77 g/100 g de massa seca).

As espécies *Lycoperdon umbrinum* (33 g/100 g de massa seca) e *Bovista aestivalis* (32 g/100 g de massa seca) apresentam os teores mais elevados de cinzas, sem diferenças estatisticamente significativas entre elas ($p < 0,05$). Por outro lado, estas duas espécies apresentam os valores mais baixos de lípidos ($< 0,2$ g/100g de massa seca) e de valor energético (< 274 kcal/100 de massa seca). Os valores mais altos de proteína encontram-se na espécie de *Agaricus lutosus* (23 g/100 g de massa seca). A espécie *Bovista nigrescens* apresenta a maior contribuição energética (405 kcal/100g de massa seca).

Relativamente à composição em, açúcares, os maioritários são manitol e trealose (**Tabela 2**). A frutose só foi encontrada nas espécies micorrízicas, facto já comprovado pelo nosso grupo de investigação em trabalhos anteriores (Grangeia et al., 2011). A espécie com maior concentração de açúcares totais é *Cortinarius praestans* (61 g/100 g de massa seca), que apresenta também a maior concentração de trealose (60 g/100 g de massa seca).

Tabela 2. Composição em macronutrientes e valor energético das espécies de cogumelos silvestres comestíveis.

	Água (g/100 g fw)	Cinzas (g/100 g dw)	Proteínas (g/100 dw)	Lípidos (g/100 g dw)	Glúcidos (g/100 g dw)	Energia (kcal/100 g dw)	Frutose (g/100 g dw)	Manitol (g/100 g dw)	Trealose (g/100 g dw)	Açúcares totais (g/100 g dw)
<i>Boletus armeniacus</i>	71,50 ± 0,43	12,09 ± 0,35 h	18,25 ± 0,06 edf	1,56 ± 0,42 ih	68,10 ± 0,51 cd	359,45 ± 0,52de	10,46 ± 0,91 a	23,56 ± 2,43 c	5,62 ± 0,35 fe	39,64 ± 1,17 c
<i>Clitocybe gibba</i>	72,66 ± 0,99	20,68 ± 0,15 f	14,59 ± 0,27 k	4,29 ± 0,00 b	60,45 ± 0,23 gh	338,74 ± 0,42 f	nd	0,63 ± 0,02 h	1,04 ± 0,11 jk	1,67 ± 0,08 ji
<i>Hygrophorus chrysodon</i>	92,09 ± 1,01	26,91 ± 1,99 cb	15,11 ± 0,18 kji	3,48 ± 0,09 cd	54,51 ± 1,28 kj	309,74 ± 5,97 hi	nd	nd	7,27 ± 1,40 e	7,27 ± 1,40 hg
<i>Lycoperdon umbrinum</i>	71,98 ± 0,32	33,14 ± 1,06 a	14,53 ± 0,07 k	0,37 ± 0,00 k	51,96 ± 0,70 kl	269,29 ± 3,00 l	nd	0,28 ± 0,04 h	0,18 ± 0,11 jk	1,46 ± 0,07 ji
<i>Suillus variegates</i>	90,77 ± 0,76	15,36 ± 2,10 g	17,57 ± 0,56 egf	3,31 ± 0,49 cd	63,76 ± 2,17 ef	355,12 ± 4,19 e	nd	nd	4,85 ± 0,28 fgh	4,85 ± 0,28 hi
<i>Boletus impolitus</i>	88,90 ± 1,45	24,43 ± 0,84 ed	16,01 ± 0,02 hji	2,94 ± 0,33 ed	56,63 ± 0,84 ij	316,98 ± 1,21 hg	0,31 ± 0,01 e	8,08 ± 0,08 g	1,84 ± 0,05 ji	10,23 ± 0,02 g
<i>Clavariadelphus pistillaris</i>	84,22 ± 1,78	20,77 ± 0,86 f	16,27 ± 0,24 hji	0,59 ± 0,07 kj	62,37 ± 0,48 gf	319,88 ± 2,67 g	0,93 ± 0,22 c	24,43 ± 3,25 c	nd	25,36 ± 3,47 d
<i>Ramaria aurea</i>	88,52 ± 0,12	5,68 ± 0,74 j	14,60 ± 0,10 k	2,26 ± 0,05 gf	77,47 ± 0,61 a	388,58 ± 1,93 b	1,53 ± 0,02 b	15,11 ± 0,30 ef	0,95 ± 0,11 jk	17,59 ± 0,21 fe
<i>Agaricus campestris</i>	88,17 ± 0,44	23,16 ± 0,00 e	18,57 ± 0,00 ed	0,11 ± 0,00 k	58,16 ± 0,00 ih	307,91 ± 0,00 ji	nd	16,94 ± 2,71 ed	3,62 ± 0,33 gh	20,56 ± 3,03 e
<i>Agaricus comtulus</i>	87,94 ± 0,77	28,14 ± 0,18 cb	21,29 ± 0,83 b	0,46 ± 0,00 kj	50,11 ± 0,89 ml	289,74 ± 0,52 k	nd	15,39 ± 0,73 edf	3,60 ± 0,06 gh	18,99 ± 0,78 fe
<i>Agaricus lutosus</i>	87,04 ± 2,01	25,96 ± 2,64 cd	23,24 ± 0,44 a	1,10 ± 0,04 ij	49,71 ± 1,72 ml	301,67 ± 7,31 ji	nd	16,42 ± 0,62 edf	3,35 ± 0,19 ih	19,77 ± 0,43 fe
<i>Leucoagaricus leucothites</i>	85,29 ± 1,00	26,46 ± 0,01 cd	20,51 ± 0,47 cb	1,10 ± 0,15 ij	51,93 ± 0,53 kl	299,64 ± 0,57 j	nd	13,33 ± 2,77 f	3,21 ± 0,70 ih	16,54 ± 3,47 f
<i>Amanita umbrinolutea</i>	73,60 ± 0,17	28,86 ± 0,00 cb	16,78 ± 0,00 hgi	6,77 ± 0,00 a	47,59 ± 0,00 m	318,41 ± 0,00 hg	nd	31,83 ± 0,69 b	10,06 ± 0,58 d	41,89 ± 1,27 cb
<i>Bovista aestivalis</i>	23,23 ± 0,93	31,86 ± 0,20 a	15,59 ± 1,23 ji	0,18 ± 0,02 k	52,37 ± 1,31 kl	273,44 ± 0,49 l	nd	nd	0,38 ± 0,08 k	0,38 ± 0,08 j
<i>Bovista nigrescens</i>	16,41 ± 0,18	3,24 ± 0,17 k	20,94 ± 0,31 b	3,64 ± 0,96 cb	72,18 ± 0,76 b	405,24 ± 3,88 a	nd	0,93 ± 0,01 h	5,09 ± 0,29 fg	6,02 ± 0,30 h
<i>Chlorophyllum rhacodes</i>	88,28 ± 0,33	12,10 ± 0,31 h	19,32 ± 0,04 cd	3,29 ± 0,33 cd	65,29 ± 0,48 ed	368,03 ± 0,30 dc	nd	18,43 ± 0,45 d	25,57 ± 0,38 b	44,00 ± 0,07 b
<i>Clavariadelphus truncatus</i>	90,97 ± 1,29	12,86 ± 0,33 h	15,98 ± 0,15 ji	1,54 ± 0,25 ih	69,62 ± 0,37 cb	356,26 ± 0,02 e	0,40 ± 0,04 e	43,34 ± 2,76 a	nd	43,74 ± 2,79 b
<i>Clitocybe costata</i>	76,92 ± 2,11	10,87 ± 1,36 ih	17,27 ± 0,25 hgf	1,50 ± 0,00 ih	70,36 ± 1,10 cb	364,02 ± 3,84 dce	nd	15,53 ± 0,85 edf	10,99 ± 0,54 d	26,65 ± 1,40 d
<i>Cortinarius praestans</i>	89,16 ± 0,19	18,89 ± 0,01 f	14,56 ± 0,24 k	2,58 ± 0,28 ef	63,98 ± 0,22 ef	337,34 ± 1,00 f	nd	0,37 ± 0,01 h	60,51 ± 2,31 a	60,88 ± 2,30 a
<i>Flammulina velutipes</i>	90,68 ± 0,58	9,42 ± 0,66 i	17,89 ± 0,02 egf	1,84 ± 0,14 gh	70,85 ± 0,36 cb	371,53 ± 2,36 c	nd	5,98 ± 1,19 g	15,08 ± 1,60 c	24,61 ± 3,05 d

nd- não detectado. Em cada coluna, letras diferentes correspondem a diferenças significativas entre as espécies ($p < 0.05$).

Os resultados relativos à composição individual dos principais ácidos gordos das espécies de cogumelos silvestres estudadas, bem como as percentagens totais de ácidos gordos saturados (SFA), ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) e ácidos gordos polinsaturados (PUFA) são apresentados na **Tabela 3**. Foi detectada uma totalidade de vinte e sete ácidos gordos como se pode visualizar no cromatograma apresentado na **Figura 11**.

O ácido gordo maioritário em todas as espécies é o ácido linoleico (C18:2n6) (contribuindo para a prevalência de PUFA), excepto para as espécies *Hygrophorus chrysodon*, *Suillus variegatus*, *Clavariadelphus pistillaris*, *Ramaria aurea*, *Amanita umbrinolutea*, *Clavariadelphus truncatus* e *Clitocybe costata* onde o ácido oleico (C18:1n9) é o ácido gordo predominante, contribuindo para a prevalência de MUFA nestas espécies. As espécies estudadas revelam também a presença de ácido palmítico (C16:0) como um dos maioritários. *Agaricus comtulus*, *Agaricus lutosus*, *Leucoagaricus leucothites* e *Chlorophyllum rhacodes* apresentam os maiores níveis de ácidos gordos polinsaturados (72-75%), enquanto que, *Hygrophorus chrysodon* apresenta os maiores níveis de PUFA (63%).

Tabela 3. Principais ácidos gordos encontrados nas espécies de cogumelos silvestres comestíveis.

	C16:0	C18:0	C18:1n9	C18:2n6	SFA	MUFA	PUFA
<i>Boletus armeniacus</i>	15,68 ± 0,34 ef	2,92 ± 0,20 g	27,61 ± 0,42 f	48,95 ± 0,06 f	21,01 ± 0,27 gh	29,67 ± 0,36 f	49,32 ± 0,09 e
<i>Clitocybe gibba</i>	13,81 ± 0,16 g	7,89 ± 0,03 a	4,91 ± 0,18 lk	64,45 ± 0,15 c	27,82 ± 0,14 d	6,16 ± 0,10 ml	66,02 ± 0,24 c
<i>Hygrophorus chrysodon</i>	25,95 ± 0,61 a	3,88 ± 0,01 e	57,26 ± 0,57 a	1,23 ± 0,06 m	35,32 ± 0,67 c	63,05 ± 0,55 a	1,63 ± 0,13 k
<i>Lycoperdon umbrinum</i>	19,92 ± 0,12 c	7,14 ± 0,5 b	22,83 ± 0,33 g	29,36 ± 0,11 j	42,48 ± 0,49 a	24,79 ± 0,77 g	32,74 ± 0,19 h
<i>Suillus variegates</i>	12,71 ± 0,29 hgi	3,47 ± 0,08 f	42,00 ± 0,26 d	37,44 ± 0,13 h	18,09 ± 0,29 j	44,24 ± 0,16 d	37,67 ± 0,12 g
<i>Boletus impolitus</i>	16,77 ± 0,40 d	1,10 ± 0,16 l	14,21 ± 1,45 ji	60,95 ± 1,10 d	23,19 ± 0,41 f	15,48 ± 1,42 j	61,33 ± 1,01 d
<i>Clavariadelphus pistillaris</i>	16,76 ± 0,81 d	3,99 ± 0,07 ed	49,11 ± 0,23 b	24,74 ± 0,82 k	24,86 ± 0,84 e	50,11 ± 0,02 c	25,03 ± 0,86 i
<i>Ramaria aurea</i>	7,32 ± 0,04 k	4,07 ± 0,09 ed	56,92 ± 0,49 a	25,60 ± 0,17 k	15,27 ± 0,23 k	58,47 ± 0,40 b	26,26 ± 0,17 i
<i>Agaricus campestris</i>	12,48 ± 0,01 hi	2,73 ± 0,01 g	6,09 ± 0,01 k	68,97 ± 0,07 b	20,91 ± 0,05 gh	9,05 ± 0,03 k	70,04 ± 0,02 b
<i>Agaricus comtulus</i>	12,98 ± 0,35 hgi	2,66 ± 0,03 g	3,50 ± 0,01 l	72,88 ± 0,57 a	22,04 ± 0,63 gf	4,42 ± 0,04 m	73,55 ± 0,59 a
<i>Agaricus lutosus</i>	12,03 ± 0,01 i	2,26 ± 0,22 h	6,11 ± 0,85 k	74,40 ± 0,19 a	18,49 ± 0,53 ij	6,63 ± 0,83 l	74,88 ± 0,30 a
<i>Leucoagaricus leucothites</i>	12,16 ± 0,20 i	1,81 ± 0,11 ij	6,27 ± 0,39 k	74,72 ± 1,32 a	18,00 ± 0,84 j	6,74 ± 0,43 l	75,25 ± 1,27 a
<i>Amanita umbrinolutea</i>	15,10 ± 0,13 f	3,87 ± 0,01 e	58,82 ± 0,08 a	18,81 ± 0,02 l	21,18 ± 0,10 gh	59,82 ± 0,12 b	19,00 ± 0,02 j
<i>Bovista aestivalis</i>	21,43 ± 1,70 b	4,32 ± 0,24 d	12,63 ± 0,13 j	41,51 ± 3,75 g	41,80 ± 2,72 a	15,53 ± 1,20 j	42,68 ± 3,92 f
<i>Bovista nigrescens</i>	17,39 ± 0,07 d	4,19 ± 0,26 ed	21,01 ± 0,24 h	38,28 ± 0,17 h	37,78 ± 0,47 b	23,16 ± 0,26 hg	39,06 ± 0,21 g
<i>Chlorophyllum rhacodes</i>	16,35 ± 0,31 ed	1,59 ± 0,03 kj	5,68 ± 0,06 k	72,61 ± 0,51 a	20,11 ± 0,35 ih	6,91 ± 0,02 l	72,98 ± 0,36 a
<i>Clavariadelphus truncatus</i>	14,80 ± 0,18 f	2,11 ± 0,01 ih	47,26 ± 0,02 c	29,77 ± 0,12 j	21,43 ± 0,06 gh	48,31 ± 0,07 c	30,26 ± 0,02 h
<i>Clitocybe costata</i>	12,76 ± 0,07 hgi	5,99 ± 0,18 c	37,27 ± 0,20 e	34,68 ± 0,92 i	22,34 ± 0,41 gf	38,02 ± 0,31 e	39,64 ± 0,87 g
<i>Cortinarius praestans</i>	13,44 ± 0,03 hg	1,78 ± 0,41 j	20,76 ± 3,04 h	59,95 ± 3,33 d	17,93 ± 0,67 j	21,49 ± 3,09 h	60,59 ± 3,76 d
<i>Flammulina velutipes</i>	10,31 ± 0,39 j	1,38 ± 0,08 kl	15,08 ± 0,47 i	56,33 ± 0,14 e	14,36 ± 0,34 k	17,56 ± 0,51 i	68,08 ± 0,17 cb

Ácido palmítico (C16:0); Ácido esteárico (C18:0); Ácido oleico (C18:1n9c); Ácido linoleico (C18:2n6c); SFA- ácidos gordos saturados; MUFA- ácidos gordos monoinsaturados; PUFA- ácidos gordos polinsaturados. Os resultados estão expressos em percentagem. A diferença para 100% corresponde a outros 23 ácidos gordos menos abundantes (dados não mostrados). Em cada coluna, letras diferentes significam diferenças significativas entre as espécies ($p < 0,05$).

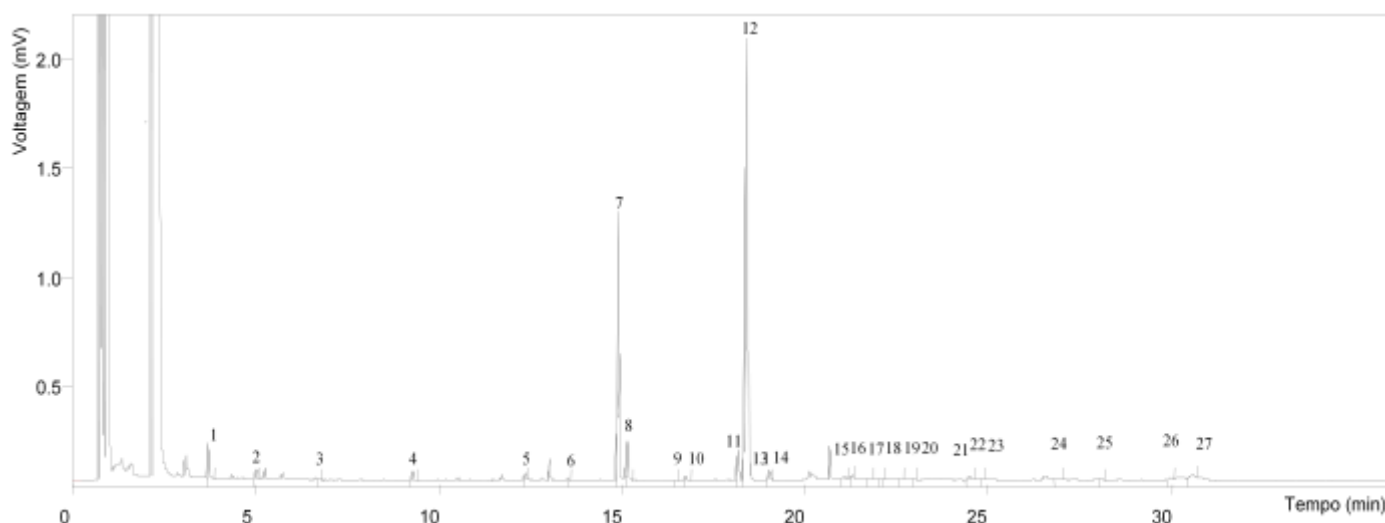


Figura 11. Cromatograma individual de ácidos gordos de *Hygrophorus chrysodon* : 1- Caproic acid (C6:0); 2- Caprylic acid (C8:0); 3- Capric acid (C10:0); 4- Lauric acid (C12:0); 5- Myristic acid (C14:0); 6- Pentadecanoic acid (C15:0); 7- Palmitic acid (C16:0); 8- Palmitoleic acid (C16:1); 9- Heptadecanoic acid (C17:0); 10 - cis-10-Heptadecenoic acid (C17:1); 11-Stearic acid (C18:0); 12- Oleic acid (C18:1n9c); 13- Linoleic acid (C18:2n6c); 14- α -Linolenic acid (C18:3n3); 15-Arachidic acid (C20:0); 16-Eicosenoic acid (C20:1c); 17- cis-11,14-Eicosadienoic acid (C20:2c); 18- cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid (C20:3n6); 19- Arachidonic acid (C20:4n6); 20- cis-11, 14, 17-Eicosatrienoic acid and Heneicosanoic acid (C20:3n3+C21:0); 21- cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid (C20:5n3); 22- Behenic acid (C22:0); 23- (C22:1n9); 24- Tricosanoic acid (C23:0); 25- (C22:6n3); 26-Lignoceric acid (C24:0); 27- (C24:1).

Os resultados da composição em micronutrientes (vitaminas e carotenóides) são apresentados na **Tabela 4**. Não se encontrou ácido ascórbico nas espécies *Boletus armeniacus*, *Lycoperdon umbrinum*, *Agaricus comtulus*, *Bovista aestivalis*, *Bovista nigrescens*, *Chlorophyllum rhacodes* e *Clitocybe costata*. No entanto, nas outras espécies de cogumelos é mais abundante do que os tocoferóis. As espécies com maior concentração de ácido ascórbico são *Agaricus lutosus* e *Hygrophorus chrysodon* que apresentam um valor de ≈ 30 mg/100 g de massa seca.

A espécie *Lycoperdon umbrinum* apresenta a maior concentração de tocoferóis (1666 $\mu\text{g}/100$ g de massa seca) com os níveis mais elevados de α -tocoferol (1474 $\mu\text{g}/100$ g de massa seca) e β -tocoferol (101 $\mu\text{g}/100$ g de massa seca). A espécie *Suillus variegatus* revelou uma relevante concentração de γ -tocoferol (1437 $\mu\text{g}/100$ g de massa seca).

Os carotenóides encontram-se em baixas quantidades nas espécies estudadas. No entanto, os níveis mais elevados de β -caroteno e licopeno observam-se em *Agaricus campestris* e *Ramaria aurea*, respectivamente (< 1mg/100 g de massa seca).

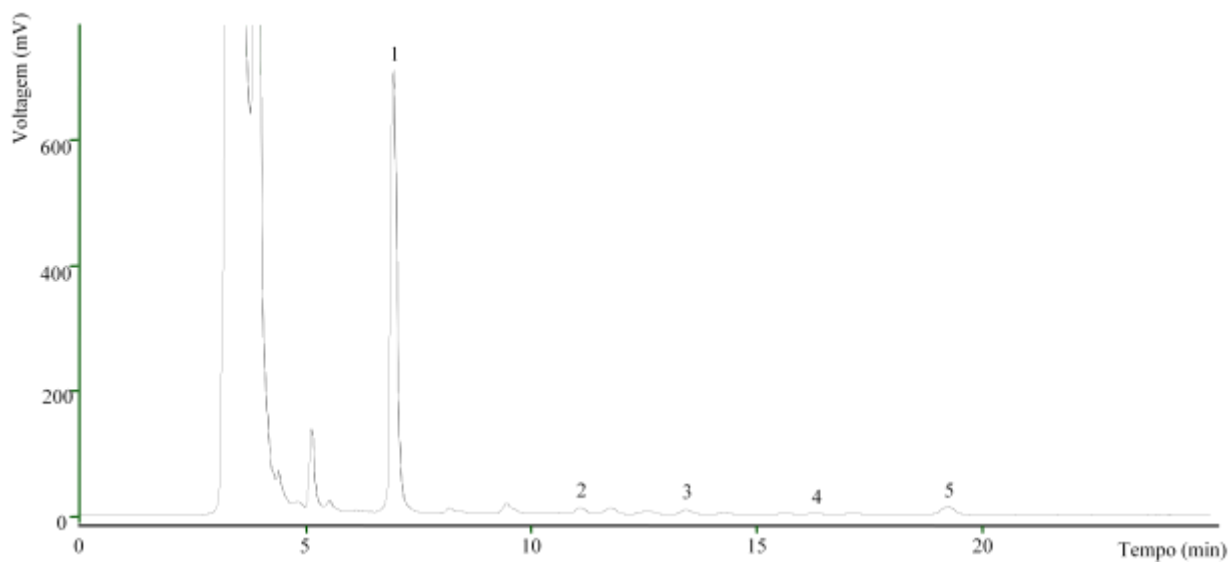


Figura 12. Cromatograma individual de tocoferóis de *Lycoperdon umbrinum* : 1- α -tocoferol; 2- β -tocoferol; 3- δ -tocoferol; 4- γ -tocoferol; 5- Tocol (PI).

Tabela 4. Composição em micronutrientes das espécies de cogumelos silvestres comestíveis.

	α -tocoferol	β -tocoferol	γ -tocoferol	δ -tocoferol	Tocoferóis totais ($\mu\text{g}/100 \text{ g dw}$)	Ácido ascórbico ($\text{mg}/100 \text{ g dw}$)	β -caroteno ($\text{mg}/100 \text{ g dw}$)	Licopeno ($\text{mg}/100 \text{ g dw}$)
<i>Boletus armeniacus</i>	4,70 \pm 0,71 c	27,10 \pm 2,97 dce	32,70 \pm 0,14 ed	2,50 \pm 0,14 igh	67,00 \pm 3,96 gfh	nd	0,15 \pm 0,00 k	nd
<i>Clitocybe gibba</i>	23,86 \pm 2,81 c	nd	189,55 \pm 9,61 b	nd	213,41 \pm 12,42d	19,47 \pm 1,62 d	nd	0,09 \pm 0,00 d
<i>Hygrophorus chrysodon</i>	3,80 \pm 0,85 c	5,30 \pm 0,70 i	Nd	7,79 \pm 1,98 fgh	16,89 \pm 2,13 i	33,16 \pm 0,57 a	0,43 \pm 0,01d	nd
<i>Lycoperdon umbrinum</i>	1474,15 \pm 4,45 a	100,86 \pm 1,09 a	68,12 \pm 0,42 c	22,68 \pm 4,89 dc	1665,81 \pm 10,85a	nd	0,17 \pm 0,00 j	nd
<i>Suillus variegatus</i>	13,47 \pm 2,42 c	nd	1436,65 \pm 39,95a	4,15 \pm 0,62 igh	1454,27 \pm 36,91b	6,39 \pm 0,22 f	nd	0,27 \pm 0,00 c
<i>Boletus impolitus</i>	4,60 \pm 0,28 c	7,10 \pm 1,27 ih	62,87 \pm 2,66 c	2,40 \pm 0,57 ih	76,97 \pm 16,64 gf	1,99 \pm 0,54 h	0,29 \pm 0,01 g	nd
<i>Clavariadelphus pistillaris</i>	3,70 \pm 0,84 c	19,69 \pm 1,32 gfe	Nd	5,30 \pm 1,27 igh	28,69 \pm 3,43 ih	3,45 \pm 0,20 g	0,08 \pm 0,00 m	0,04 \pm 0,00 g
<i>Ramaria aurea</i>	6,20 \pm 0,28 c	97,28 \pm 0,17 a	26,10 \pm 2,68 edf	4,90 \pm 1,84 igh	134,48 \pm 0,95e	0,66 \pm 0,07 i	nd	0,51 \pm 0,00 a
<i>Agaricus campestris</i>	6,49 \pm 0,59 c	25,61 \pm 0,89 dce	33,95 \pm 4,15ed	28,40 \pm 0,13 c	94,45 \pm 3,99 f	18,74 \pm 1,09 d	0,60 \pm 0,00 a	nd
<i>Agaricus comtulus</i>	7,60 \pm 1,15 c	61,30 \pm 3,49 b	25,69 \pm 2,83edf	65,84 \pm 1,81 a	160,43 \pm 5,62 e	nd	0,59 \pm 0,01 b	nd
<i>Agaricus lutosus</i>	1,18 \pm 0,06 c	15,04 \pm 1,14 gf	11,30 \pm 0,70 egf	39,84 \pm 0,84 b	67,36 \pm 0,46 gfh	32,18 \pm 0,20 a	nd	0,44 \pm 0,00 b
<i>Leucoagaricus leucothites</i>	2,60 \pm 0,51 c	nd	4,90 \pm 0,60 eg	23,80 \pm 1,61dc	31,30 \pm 7,71 ih	18,87 \pm 0,26 d	0,40 \pm 0,01e	nd
<i>Amanita umbrinolutea</i>	6,04 \pm 1,02 c	26,78 \pm 0,88 dce	Nd	7,26 \pm 0,03 figh	40,08 \pm 0,11 gih	22,73 \pm 1,91 c	0,56 \pm 0,00 c	nd
<i>Bovista aestivalis</i>	2,09 \pm 0,14 c	1,80 \pm 0,28 i	36,08 \pm 0,02 d	0,15 \pm 0,00i	40,12 \pm 0,40 gih	nd	0,05 \pm 0,00 n	nd
<i>Bovista nigrescens</i>	0,70 \pm 0,71 c	19,90 \pm 2,13 gfe	Nd	nd	20,60 \pm 1,42 i	nd	0,21 \pm 0,00 i	nd
<i>Chlorophyllum rhacodes</i>	2,03 \pm 0,76 c	13,74 \pm 3,17 gh	Nd	13,30 \pm 0,95fe	29,07 \pm 3,36 ih	nd	0,15 \pm 0,00 k	nd
<i>Clavariadelphus truncatus</i>	21,93 \pm 2,64 c	3,79 \pm 0,02 i	33,78 \pm 2,27 ed	11,06 \pm 1,03fg	70,56 \pm 5,96 gf	7,14 \pm 0,13 f	0,11 \pm 0,01 l	0,07 \pm 0,00 e
<i>Clitocybe costata</i>	480,66 \pm 22,45 b	31,77 \pm 9,86 c	Nd	nd	512,43 \pm 62,32 c	nd	0,07 \pm 0,00 m	0,03 \pm 0,00 h
<i>Cortinarius praestans</i>	2,63 \pm 0,11 c	21,73 \pm 0,74dfe	24,76 \pm 6,89 edf	4,85 \pm 1,27 igh	53,97 \pm 8,99 gih	9,06 \pm 1,33 e	0,26 \pm 0,00 h	0,06 \pm 0,00 f
<i>Flammulina velutipes</i>	12,52 \pm 0,44 c	28,39 \pm 1,03dc	Nd	20,31 \pm 0,77de	61,22 \pm 5,24 gfh	23,87 \pm 0,38 b	0,34 \pm 0,00 f	0,02 \pm 0,00 i

nd- não detectado. Em cada coluna, letras diferentes significam diferenças significativas entre as espécies ($p < 0.05$).

A composição em não-nutrientes e actividade antioxidante avaliada *in vitro* dos cogumelos silvestres é apresentada na **Tabela 5**.

A espécie *Suillus variegatus* apresenta os melhores resultados em todos os ensaios de actividade antioxidante (actividade captadora de radicais DPPH, poder redutor e inibição da descoloração do β -caroteno), com valores de $EC_{50} \leq 1$ mg/ml. Isto está de acordo com seus níveis mais elevados de fenóis (58mg GAE/g de extracto) e flavonóides (33 mg CE/g de extracto). Pelo contrário, a espécie *Hygrophorus chrysodon* revela as menores propriedade antioxidantes (valores de EC_{50} que variam de 6 a 20 mg/ml), assim como também, a menor quantidade de fenóis (5 GAE mg/g de extracto) e concentrações de flavonóides (2 CE mg/g de extracto).

Além da espécie *Suillus variegatus*, proveniente de um habitat de *Pinus* sp., outros cogumelos apresentam também elevada actividade antioxidante e crescente com o aumento da concentração de extracto (**Figura 13**): *Boletus armeniacus* (proveniente de habitat de *Castanea sativa*), *Clavariadelphus pistillaris* (proveniente de habitat de *Quercus* sp.), *Agaricus lutosus* (proveniente de prados) e *Bovista aestivalis* (proveniente de povoamentos mistos).

Tabela 5. Composição em não-nutrientes e propriedades antioxidantes in vitro (valores de EC50) das espécies de cogumelos silvestres comestíveis.

	Fenóis (mg GAE/g extract)	Flavonóides (mg CE/g extract)	Actividade captadora de DPPH (mg/ml)	Poder redutor (mg/ml)	Inibição da descoloração do β - caroteno (mg/ml)
<i>Boletus armeniacus</i>	44,66±1,65 c	8,59 ± 0,28 d	1,74 ± 0,10 kl	0,63 ± 0,02 lk	0,77 ± 0,09 h
<i>Clitocybe gibba</i>	25,26 ± 1,15 ed	3,56 ± 0,79 ih	10,61 ± 1,08 cb	1,46 ± 0,27 g	4,00 ± 0,51 cb
<i>Hygrophorus chrysodon</i>	4,58 ± 1,12 j	1,78 ± 0,08 i	20,02 ± 1,27 a	7,82 ± 0,03 a	5,95 ± 0,50 a
<i>Lycoperdon umbrinum</i>	27,02 ± 0,17 d	3,82 ± 0,24 ihg	3,45 ± 0,09 hg	1,27 ± 0,06 ih	3,24 ± 0,70 cd
<i>Suillus variegatus</i>	58,14 ± 4,51 a	33,00 ± 4,98 a	0,86 ± 0,02 m	0,52 ± 0,01 l	1,00 ± 0,15 h
<i>Boletus impolitus</i>	15,50 ± 0,53 g	3,72 ± 0,22 ih	5,81 ± 0,17 ed	2,04 ± 0,01 e	2,04 ± 0,44 f
<i>Clavariadelphus pistillaris</i>	48,10 ± 0,76 cb	18,61 ± 0,85 b	1,30 ± 0,07 ml	0,70 ± 0,00 k	1,94 ± 0,02 fg
<i>Ramaria aurea</i>	8,46 ± 0,41 ji	2,44 ± 0,46 i	3,70 ± 0,11 g	0,99 ± 0,02 j	2,46 ± 0,40 fde
<i>Agaricus campestris</i>	20,94 ± 4,98 ef	5,59 ± 0,29 ehgf	5,48 ± 0,08 ed	2,70 ± 0,23 c	4,59 ± 1,30 b
<i>Agaricus comtulus</i>	24,13 ± 7,98 ed	3,76 ± 0,94 ihg	2,22 ± 0,05 kji	1,29 ± 0,01 ih	1,08 ± 0,05 hg
<i>Agaricus lutosus</i>	46,56 ± 4,16 cb	7,67 ± 0,90 ed	2,54 ± 0,44 kji	0,91 ± 0,02 j	0,90 ± 0,10 h
<i>Leucoagaricus leucothites</i>	15,75 ± 1,98 g	2,43 ± 0,69 i	11,33 ± 1,05 b	3,28 ± 0,05 b	1,00 ± 0,21 h
<i>Amanita umbrinolutea</i>	9,22 ± 0,16 hji	6,54 ± 0,25 edf	10,02 ± 0,34 c	2,71 ± 0,04 c	3,69 ± 0,70 c
<i>Bovista aestivalis</i>	50,91 ± 1,97 b	8,51 ± 0,43 d	2,05 ± 0,10 kjl	0,51 ± 0,01 l	0,61 ± 0,02 h
<i>Bovista nigrescens</i>	26,50 ± 1,18 d	14,10 ± 0,70 c	4,62 ± 0,44 f	1,21 ± 0,02 i	1,91 ± 0,22 fg
<i>Chlorophyllum rhacodes</i>	22,77 ± 5,26 edf	2,63 ± 0,13 i	5,32 ± 0,06 ef	2,22 ± 0,01 d	2,33 ± 0,41 fe
<i>Clavariadelphus truncatus</i>	7,66 ± 1,37 j	5,82 ± 0,36 egf	2,74 ± 0,04 hji	1,33 ± 0,05 h	2,35 ± 0,20 fde
<i>Clitocybe costata</i>	13,71 ± 1,30 hg	4,80 ± 0,35 hgf	10,56 ± 0,55 cb	1,66 ± 0,01 f	3,22 ± 0,60 cd
<i>Cortinarius praestans</i>	17,81 ± 0,83 gf	5,46 ± 0,52 hgf	3,04 ± 0,08 hgi	1,70 ± 0,01 f	2,04 ± 0,44 f
<i>Flammulina velutipes</i>	12,98 ± 0,32 hgi	2,46 ± 0,20 i	6,19 ± 0,17 d	1,94 ± 0,01 e	1,12 ± 0,23 hg

Em cada coluna, letras diferentes significam diferenças significativas entre as espécies ($p < 0.05$)

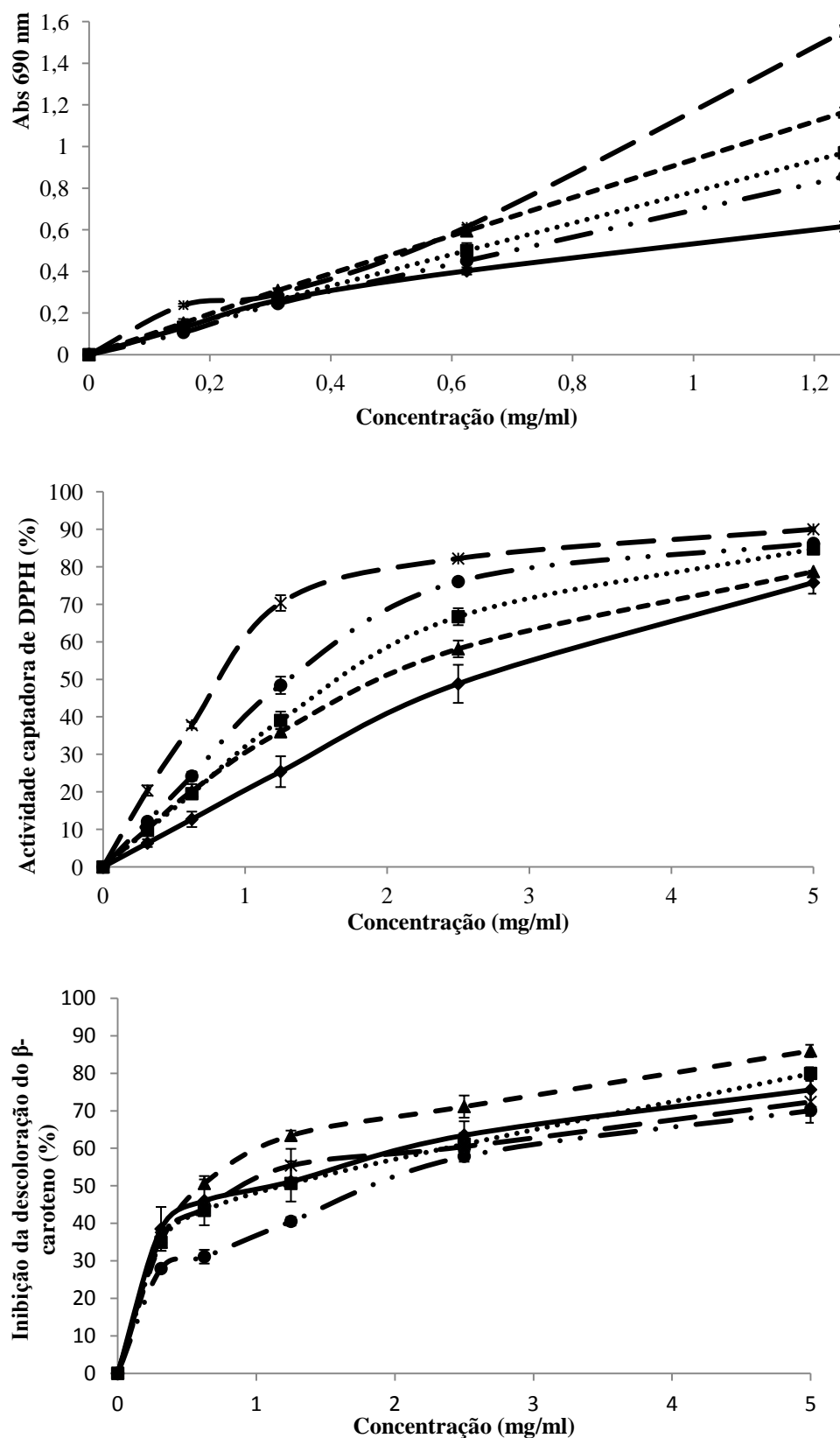


Figura 13. Actividade captadora de radicais DPPH, poder redutor e inibição da descoloração do β -caroteno de cinco espécies provenientes de diferentes habitats: \blacktriangle *Boletus armeniacus*, \bullet *Clavariadelphus pistillaris*, \blacksquare *Agaricus lutosus*, \square *Bovista aestivalis* e \ast *Suillus variegatus*.

4. Discussão dos resultados

Os cogumelos são muito apreciados não só pelo seu sabor e aroma únicos, mas também pelas suas propriedades químicas e nutricionais (Kalač, 2009). As espécies silvestres provenientes de diferentes habitats aqui estudadas têm elevados teores em água, proteínas e glúcidos, em contraste com baixos níveis de lípidos, que os tornam adequados para incorporar em dietas pouco calóricas. Estes resultados estão de acordo com diversos estudos anteriores do nosso grupo (Barros et al., 2007a; Barros et al., 2007c; Barros et al., 2008b; Heleno et al., 2009; Grangeia et al., 2011) e de outros grupos (Ouzouni et al., 2009; Kalač, 2009) de investigação.

A composição aproximada de amostras de *Agaricus campestris* e *Flammulina velutipes* provenientes da Croácia foi descrita recentemente por Beluhan e Ranogajec (2011). Apesar de um contributo energético semelhante, as amostras de Portugal por nós estudadas, revelaram menor teor de proteínas e lípidos, mas maior concentração de cinzas e glúcidos. Os resultados observados podem ser devido às diferenças no estado de maturidade das amostras provenientes de Portugal e da Croácia. De facto, já foi demonstrado pelo nosso grupo de investigação um aumento dos níveis de proteínas e uma diminuição da concentração de glúcidos com o aumento do estado de maturidade do carpóforo (Barros et al., 2007c). O manitol e a trealose foram os açúcares maioritários encontrados nas espécies estudadas. Beluhan e Ranogajec (2011) descreveram também a presença de manose e glucose em amostras de *Agaricus campestris* e *Flammulina velutipes* da Croácia. No entanto, nós não conseguimos encontrar esses açúcares nas nossas amostras, como pode ser observado na **Figura 14** para o exemplo de *Agaricus campestris*.

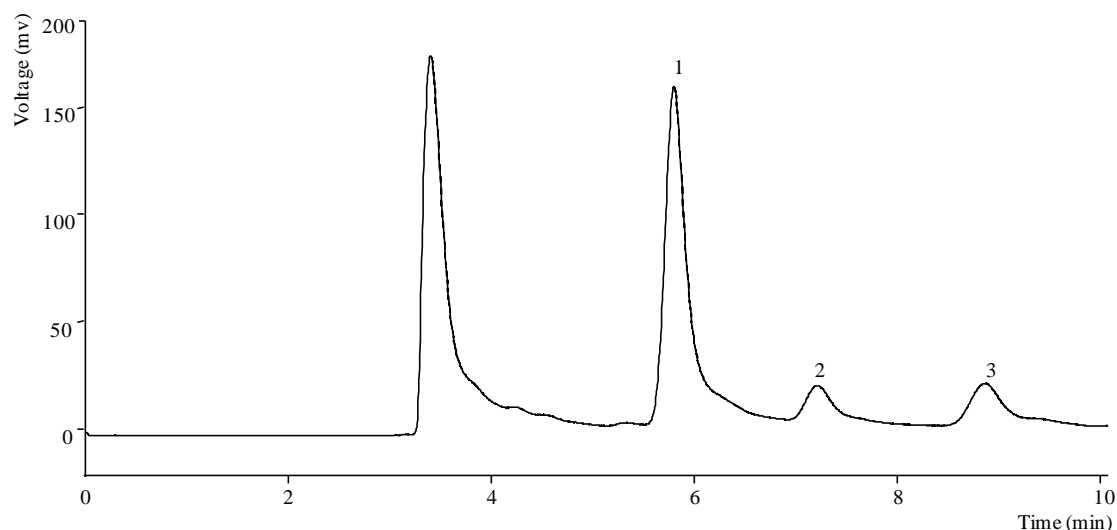


Figura 14. Cromatograma individual de açúcares de *Agaricus campestris*: 1-manitol; 2-trealose; 3-rafinose (IS).

Os álcoois derivados de açúcares, principalmente o manitol, são responsáveis pela sustentação e expansão dos corpos de frutificação dos cogumelos (Barros et al., 2008b). Na verdade, os açúcares são fundamentais no metabolismo energético celular e também podem ser usados na síntese de polissacáridos de reserva ou de estrutura (Lehninger et al., 2008). Os açúcares são apenas uma pequena parte dos glúcidos totais, uma vez que os cogumelos silvestres são ricos em polissacáridos, nomeadamente glicogénio e β -glucanas (Kalač, 2009).

No que diz respeito aos ácidos gordos, os maioritariamente encontrados nas espécies de cogumelos silvestres estudadas foram os ácidos linoleico e oleico, que são comuns em organismos eucarióticos, como os fungos. Já o ácido palmítico é comum a diferentes organismos. O ácido linoleico é um ácido gordo essencial para os mamíferos e, portanto, poderia ser fornecido na dieta através de cogumelos. É precursor do ácido araquidónico e da biossíntese de prostaglandinas, que desempenham actividades fisiológicas importantes (Lehninger et al., 2008). O ácido linoleico também é precursor de oct-1-en-3-ol, conhecido como "álcool dos fungos", o principal componente aromático em fungos (Maga, 1981). Tal como já comprovado pelo nosso e por outros grupos de investigação, os valores de UFA foram superiores aos valores de SFA (Yilmaz et al., 2006; Kalač, 2009; Heleno et al., 2009; Ouzouni et al., 2009; Grangeia et al., 2011; Lee et al., 2011). Em particular, os UFA ácidos oleico e linoleico também foram

descritos como maioritários em amostras de *Agaricus campestris* da Turquia (Yilmaz et al., 2006) e de *Flammulina velutipes* da Coreia (Lee et al., 2011). Tal como foi observado para as amostras de *Agaricus campestris* e *Flammulina velutipes* estudados neste trabalho, esses autores também observaram maior quantidade de ácido linoleico do que de ácido oleico.

Além dos macronutrientes, os cogumelos silvestres estudados, também apresentam micronutrientes importantes (por exemplo, tocoferóis, ácido ascórbico e carotenóides) e não-nutrientes (por exemplo, fenóis) com propriedades bioactivas, nomeadamente potencial antioxidante. Essas moléculas parecem desempenhar um papel protector em doenças relacionadas com o stresse oxidativo, como cancro e doenças cardiovasculares (Ferreira et al., 2009). De facto, as espécies estudadas, sobretudo *Suillus variegatus* (proveniente de um habitat de *Pinus* sp.), *Boletus armeniacus* (proveniente de um habitat de *Castanea sativa*), *Clavariadelphus pistillaris* (proveniente de um habitat de *Quercus* sp.), *Agaricus lutosus* (proveniente de prados) e *Bovista aestivalis* (proveniente de povoamentos mistos), demonstram capacidade de captar radicais livres, como DPPH, elevado poder redutor e capacidade de inibir a peroxidação lipídica num sistema de β -caroteno linoleato, após a neutralização do radical livre linoleato e outros radicais livres formados no sistema que atacam os modelos insaturados de β -caroteno.

Tanto quanto sabemos, o potencial antioxidante de dezanove das vinte espécies estudadas ainda não tinha sido avaliado. A única excepção refere-se a uma amostra de *Flammulina velutipes* (extractos hidrofílicos) proveniente do Japão (Bao et al., 2010). O potencial medicinal deste cogumelo foi já descrito devido às propriedades anti-tumorais de vários dos seus compostos: proteína flamulina, polissacáridos galactomanoglucanas e riboglucanas, isoflavona genisteína e selénio (Ferreira et al., 2010).

Assim, a composição nutricional e nutracêutica destes cogumelos silvestres torna-os espécies com um valor considerável do ponto de vista alimentar e medicinal.

5. Considerações finais

Neste trabalho realizou-se um inventário químico, nutricional e bioactivo de potencial interesse de vinte espécies silvestres (ainda não caracterizadas anteriormente na literatura) de diferentes habitats (*Castanea sativa*, *Pinus* sp., *Quercus* sp., prados e povoamentos mistos) do nordeste de Portugal: *Boletus armeniacus*, *Clitocybe gibba*, *Hygrophorus chrysodon*, *Lycoperdon umbrinum*, *Suillus variegates*, *Boletus impolitus*, *Clavariadelphus pistillaris*, *Ramaria aurea*, *Agaricus campestris*, *Agaricus comtulus*, *Agaricus lutosus*, *Leucoagaricus leucothites*, *Amanita umbrinolutea*, *Bovista aestivalis*, *Bovista nigrescens*, *Chlorophyllum rhacodes*, *Clavariadelphus truncatus*, *Clitocybe costata*, *Cortinarius praestans*, *Flammulina velutipes*.

O estudo realizado permitiu concluir que os cogumelos silvestres referidos são alimentos nutricionalmente equilibrados (elevadas concentrações de glúcidos e proteínas e baixas concentrações de lípidos). Com base no seu potencial antioxidante e compostos bioactivos (vitaminas, carotenóides e fenóis), podem ter aplicações na prevenção de doenças relacionadas com radicais livres e stresse oxidativo.

Este tipo de estudo contribui para a caracterização química e nutricional de espécies silvestres, disponibilizando e disseminando um inventário a fim de promover o consumo de espécies silvestres comestíveis e a conservação dos seus *habitats*. Além disso, sendo uma fonte importante de antioxidantes, as espécies silvestres podem ser usados na dieta como nutracêuticos e/ou alimentos funcionais, contribuindo para a manutenção e promoção da saúde, longevidade e qualidade de vida.

Os resultados desta dissertação foram divulgados nos documentos em anexo:

Anexo I - Publicação em revista internacional

Anexo II – Comunicações em congressos

6. Referências bibliográficas

- Alencar, Y.B., Ríos-Velásquez, C., Lichtwardt, R.W., & Hamada, N. (2003). Trichomycetes (Zygomycota) in the Digestive tract of Arthropods in Amazonas, Brazil. *Mem inst Oswaldo Cruz*, 98(6), 799-810.
- Alessio, C.L. (1985). *Boletus Dill. ex L. Fungi Europaei*. Vol. 2. Libreria Editrice Giovanna Biella, Saronno.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., & Blackwell, M. 1996. *Introductory Mycology*. John Wiley and Sons editors, 4th ed., New York, USA, 868.
- Amarowicz R., Pegg R.B., Rahimi-Moghaddam P., Barl B., & Weil J.A. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84, 551-562.
- Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., McDonald S., & Robards K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127, 183–198.
- AOAC (1995). *Official methods of analysis* (16th Ed.). Arlington VA, USA: Association of Official Analytical Chemists.
- Bao, H.N.D, Ochiai, Y., & Ohshima, T. (2010). Antioxidative activities of hydrophilic extracts prepared from the fruiting body and spent culture medium of *Flammulina velutipes*. *Bioresource Technology*, 101, 6248–6255.
- Baptista, P., Martins, A., Tavares, R.M., & Lino-Neto, T. (2010). Diversity and fruiting pattern of macrofungi associated with chestnut (*Castanea sativa*) in the Trás-os-Montes region (Northeast Portugal). *Fungal Ecology*, 3, 9-19.

- 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.
- Beluhan, S., & Ranogajec, A. (2011). Chemical composition and non-volatile components of Croatian wild edible mushrooms. *Food Chemistry*, *124*, 1076-1082.
- Benguría, R.L. (1985). *Mil Setas Ibericas*. Diputacion De Vizcaya.
- Berker K.I, Güçlü K., Tor I., & Apak R. (2007). Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline,

- batho*-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, 72, 1157-1165.
- Boa, E. (2004). Los hongos silvestres comestibles; Perspectiva global de su uso e importancia para la población. FAO, Rome.
- Bononi, V. L., Capelari, M., Maziero, R., & Trufem, S. F. B. (1999). *Cultivo de cogumelos comestíveis*. 2ª edição. Icone editora, Portugal.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56, 317 – 333.
- Bushra, S., Farooq, A., & Roman P., (2007). Antioxidant potential of corncob extracts for stabilization of corn oil subjected to microwave heating. *Food Chemistry*, 104, 997-1005.
- 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.
- Chew B.P. (1995). Antioxidant vitamins affect food animal immunity and health. *The Journal of Nutrition*, 125, 1804S-1808S.
- Cuvelier M.-E., Richard H., & Berset C. (1992). Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: Structure-activity relationship. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56, 324-325.
- 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.

Frade, B.L., & Alfonso, A.T. (2005). Guía de Campo de los Hongos de la Península

Ibérica. Celarayn Editorial, León.

Galli, R. (2001). Le Amanite. Edinatura, Milano.

García, M., Quinterio, R., & López, A. (2000). Biotecnología alimentaria. Limusa,

México.

Garibay-Orijel, R., Córdova, J., Cifuentes, J., Valenzuela, R., Estrada-Torres, A., & Kong,

A. (2009). Integrating wild mushrooms use into a model of sustainable management for indigenous community forests. *Forest Ecology and Management*, 258, 122-131.

Grangeia, C., Heleno, S.A. Barros, L., Martins, A., & Ferreira, I.C.F.R. (2011). Effects of trophism on nutritional and nutraceutical potential of wild edible mushrooms.

Food Research International, 44, 1029-1035.

Griffin, D.H. (1994). Fungal Physiology. Wiley-Liss, 2nd ed., New York, 485.

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.
- Hensley K., Benaksas E.J., Bolli R., Comp P., Grammas P., Hamdheydari L., Mou S., Pye Q.N., Stoddard M.F., Wallis G., Williamson K.S., West M., Wechter W.J., & Floyd R.A. (2004). New perspectives on vitamin E: γ -tocopherol and carboxyethylhydroxychroman metabolites in biology and medicine. *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 1-15.
- Isildak, Ö., Turkekul, I., Elmastas, M., & Tuzen, M. (2004). Analysis of heavy metals in some wild-grow edible mushrooms from the middle black sea region, Turkey. *Food Chemistry*, 86, 547-552.
- James, T.Y., Kauff, F., Schoch, C. et al. (2006a). Reconstructing the early evolution of the fungi using a six gene phylogeny. *Nat*, 443, 818-822.
- James, T.Y., Letcher, P.M., Longcore, J.E., Mozley-Standridge, S.E., Porter, D., Powell, M.J., Griffith, G.W., & Vilgalys, R. (2006b). A molecular phylogeny of the flagellated Fungi (Chytridiomycota) and a proposal for a new phylum (Blastocladiomycota). *Mycologia*, 98, 860-871.
- Jia, Z., Tang, M., & Wu, J. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64, 555-559.
- 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.
- Kamal-Eldin A., & Appelqvist L.Å. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31, 671-701.
- 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.
- Kaur IP, & Geetha T. (2006). Screening Methods for Antioxidants-A Review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 6, 305-312
- Kim, S.H., Han, J.H., & Keen, C.L. (2001). Vitamin and Mineral Supplement use by healthy teenagers in Korea: Motivating factors and Dietary Consequences. *Nutrition*, 17, 373-380.
- Lee, K.J., Yun, I.J., Kim, K.H., Lim, S.H., Ham, H.J., Eum W.S., & Joo, J.H. (2011). Amino acid and fatty acid compositions of *Agrocybe chaxingu*, an edible mushroom. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 175-178.
- 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.
- Lindequist, U., Niedermeyer, T.H.J., & Jülich, W.-D. (2005). The pharmacological potential of mushrooms. *eCAM*, *2*, 285-299.
- Lo Fiego, D.P., Santoro, P., Macchioni, P., Mazzoni, D., Piattoni, F., Tassone, F., & De Leonibus, E. (2004). The effect of dietary supplementation of vitamins C and E on the α -tocopherol content of muscles, liver and kidney, on the stability of lipids, and on certain meat quality parameters of the *longissimus dorsi* of rabbits. *Meat Science*, *67*, 319-327
- 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.
- Manzi, P., Gambelli, L., Marconi, S., Vivanti, V., & Pizzoferrato, L. (1999). Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. *Food Chemistry*, *65*, 477-482.
- Martín-Pinto, P., Vaquerizo, H., Peñalver, F., Olaizola, J., & Oria-de-Rueda, J.A. (2006). Early effects of a wildfire on the diversity and production of fungal communities in Mediterranean vegetation types dominated by *Cistus ladanifer* and *Pinus pinaster* in Spain. *Forest Ecology and Management*, *225*, 296-305.
- Martins, X.F. (2004). Cogumelos – Património Natural Transmontano. João Azevedo Editor, Portugal, Vol 1, 19-101

- 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., Lin, H.-C., & Chen, C.-C. (2001). Non-volatile components of several medicinal mushrooms. *Food Research international*, *34*, 521-526.
- 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.
- Moradali, M.-F., Mostafavi, H., Ghods, S., & Hedjaroude, G.-A. (2007). Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). *International Immunopharmacology*, *7*, 701-724.
- Moreno, A.C. (2005). Setas y Hongos de La Rioja II. Fundación Caja Rioja, Logroño.
- 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.
- 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.

- Phillips, R. (1988). *Mushrooms and other fungi of Great Britain & Europe*. Macmillan, Oxford.
- Poucheret, P., Fons, F., & Rapior, S. (2006). Biological and pharmacological activity of higher fungi: 20-Year retrospective analysis. *Mycologie*, *27*, 311-333.
- 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. Bioquímica, Organização Molecular da Vida. Lidel, (2008).
- 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.

- Sarmee, R., Dell, B., Lumyong, P., Izumori, K., & Lumyong, S. (2003). Nutritive value of popular wild edible mushrooms from northern Thailand. *Food Chemistry*, *82*, 527-532.
- Sultana, B., Anwar, F., & Przybylski, R. (2007). Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana* Lam. trees. *Food Chemistry*, *104*, 1106-1114.
- 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.
- Vaz, J.A., Barros, L., Martins, A., Morais, J.S., Vasconcelos, M.H., & Ferreira, I.C.F.R. (2011). Phenolic profile of seventeen Portuguese wild mushrooms. *LWT- Food Science and Technology*, *44*, 343-346.
- Vaz, J.A., Heleno, S.A., Martins, A., Almeida, G.M., Vasconcelos, M.H., & Ferreira I.C.F.R. (2010). Wild mushrooms *Clitocybe alexandri* and *Lepista inversa*: *In vitro* antioxidant activity and growth inhibition of human tumour cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, *48*, 2881-2884.
- Voet D., Voet J.G. *Biochemistry*. John Wiley & Son, 3rd edition, 2004. 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.
- Webster, J., & Weber, R.W.S. 2007. *Introduction to Fungi*, 3rd Edition. Cambridge University Press, United Kingdom.

- Wolfe, K., Wu, X., & Liu, R.H. (2003). Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 609-614.
- 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.
- Zaidman, B.-Z., Yassin, M., Mahajana, J., & Wasser, S.P. (2005). Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67, 453-468.
- Zhang, M., Cui, S.W., Cheung, P.C.K., & Wang, Q. (2007). Antitumor polysaccharides from mushrooms: A review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 4-19.
- 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., Turkekul, 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.
- Zeisel, S.H. (1999). Regulation of "nutraceuticals". *Science*, 285, 1853-1855.

WEBSITES

web 1: <http://www.infoescola.com/biologia/reino-fungi-fungos-cogumelos/>

web 2: <http://pt.wikipedia.org/wiki/fungi>

Web 3: [http://www.infipedia.pt/\\$zigomycetos](http://www.infipedia.pt/$zigomycetos)

web 4: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Glomeromycota>

web 5: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Blastocladiomycota>

web 6: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Neocallimastigomycota>

web 7: <http://pt.scribd.com/doc/62432240/5/Filo-Blastocladiomycota>

web 8: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Agaricomycetes>

web 9: <http://www.infoescola.com/biologia/classe-basidiomycetes->

[basidiomicetos/](http://www.infoescola.com/biologia/classe-basidiomycetes-basidiomicetos/)

Anexos