

Biomoléculas em cogumelos silvestres do Nordeste de Portugal: função nutricional e medicinal

Ana Raquel Gonçalves Leal

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

Orientado POR:

Isabel Cristina Fernandes Rodrigues Ferreira

Anabela Rodrigues Lourenço Martins

Bragança

2012

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



Agradecimentos

Finalizada mais uma etapa da minha vida não poderia deixar de proferir os meus sinceros agradecimentos a algumas pessoas que por toda a sua cooperação, dedicação e auxílio tornaram possível a realização deste projeto. De modo particular gostaria de agradecer:

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 disponibilidade, interesse, por toda a ajuda que sempre me disponibilizou, por tudo que me ensinou.

À **minha família**, que sem eles nada disto teria sido possível. Agradeço-lhe toda a cooperação, apoio, motivação e por acreditarem sempre no meu trabalho.

Ao **Mário Favas** pela ajuda, amor, apoio incondicional e encorajamento constante.

Ao **Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada (BioChemCore)**, e a todos aqueles que lá trabalham pela constante cooperação, motivação e apoio.

À **Ângela Feitor, Eliana Pereira, Filipa Reis** e ao **Márcio Caroch** que sempre me auxiliaram no laboratório, pela amizade, auxílio e pelos bons momentos proporcionados.

A todos os **meus amigos**, que sempre acreditaram em mim e apoiaram nesta etapa do meu percurso académico.

Por fim, a todas as outras pessoas, que direta ou indiretamente, fizeram parte deste projeto e o tornaram possível.

A todos **MUITO OBRIGADA!**

Índice

Agradecimentos	3
Lista de Figuras:.....	6
Lista de Tabelas:.....	7
Abreviaturas	8
Resumo.....	10
Abstract	11
1. Introdução	13
1.1. Alimentos funcionais e nutracêuticos.....	13
1.1.1 Conceitos gerais	13
1.1.2. Classificação dos alimentos funcionais.....	15
1.2. Os cogumelos como alimentos funcionais e fonte de nutracêuticos	25
1.3. Fungos	26
1.4. Taxonomia e caracterização das amostras estudadas	32
1.5. Objetivos	38
2. Material e métodos.....	40
2.1. Amostras.....	40
2.2. Padrões e reagentes	41
2.3.1 Valor nutricional.....	41
2.3.2 Açúcares.....	42
2.3.3 Ácidos gordos	43
2.4 Compostos bioativos	43
2.4.1 Tocoferóis.....	43
2.4.2 Carotenoides.....	44
2.4.3 Ácidos orgânicos	45
2.4.4 Compostos fenólicos	45
2.5. Atividade antioxidante	46
2.5.1 Preparação dos extratos e considerações gerais	46
2.5.2 Ensaio <i>Folin-Ciocalteu</i>	46
2.5.3 Ensaio do ferricianeto/azul da Prússia	47
2.5.4 Ensaio da atividade captadora de radicais DPPH	48
2.5.5 Ensaio do β -caroteno/linoleato.....	49
2.5.6 Ensaio TBARS	50

2.6. Análise estatística	51
3. Resultados	53
4. Discussão	64
5. Considerações finais	67
6. Bibliografia	69
7. Anexos:	78

Lista de Figuras:

Figura 1. Estruturas químicas de carotenoides	20
Figura 2. Estrutura química de tocoferóis	21
Figura 3. Estrutura da vitamina C	21
Figura 4. Diferenças entre a formação do Basídio e do Asco	28
Figura 5. Partes de um basidioma	29
Figura 6. Fungos parasitas das plantas possuem hifas especializadas – haustório	30
Figura 7. Exemplo de Micorriza: Relações nutritivas entre os fungos e as raízes das plantas	31
Figura 8. <i>Amanita crocea</i>	33
Figura 9. <i>Amanita mairei</i>	33
Figura 10. <i>Boletus regius</i>	34
Figura 11. <i>Boletus porosporus</i>	34
Figura 12. <i>Gyromitra esculenta</i>	35
Figura 13. <i>Helvella lacunosa</i>	36
Figura 14. <i>Russula aurea</i>	37
Figura 15. <i>Russula virescens</i>	37
Figura 16. Redução do DPPH'	48
Figura 17. Reação envolvida no ensaio TBARS	50
Figura 18. Cromatograma individual do perfil de açúcares da espécie <i>Boletus regius</i>	54
Figura 19. Cromatograma individual do perfil de ácidos gordos da espécie <i>Russula aurea</i>	55
Figura 20. Cromatograma individual do perfil de tocoferóis da espécie <i>Boletus regius</i>	57
Figura 21. Cromatograma individual do perfil dos ácidos orgânicos da espécie <i>G.esculenta</i>	58
Figura 22. Espectro de absorção (A) e de massa (B) do derivado 1 da crisina e espectro de massa do derivado 2 da crisina (C) presentes na espécie <i>Boletus regius</i>	60
Figura 23. Ilustração representativa da estrutura da crisina	60

Lista de Tabelas:

Tabela 1. Causas e mecanismos dos efeitos benéficos atribuídos aos probióticos.	17
Tabela 2. Taxonomia das espécies de cogumelos silvestres comestíveis analisadas.	32
Tabela 3. Informação relativa às espécies de cogumelos silvestres comestíveis analisadas.....	40
Tabela 4. Valor nutricional e compostos nutricionais dos cogumelos silvestres comestíveis estudados (valor médio \pm desvio padrão).....	53
Tabela 5. Compostos bioativos dos cogumelos silvestres comestíveis estudados (valor médio \pm desvio padrão)	56
Tabela 6. Propriedades antioxidante <i>in vitro</i> dos cogumelos silvestres comestíveis estudados (valor médio \pm desvio padrão).....	62

Abreviaturas

A[•] - Radical livre

ABS - Absorvância

A_{DPPH} – Absorvância da solução de DPPH

ANOVA - Análise de variância

AOAC - Association of Official Analytical Chemist

A_S – Absorvância da solução que contém a amostra

BHT - Butil-hidroxitolueno (2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol)

DAD – Detetor de díodos

DHA - Ácido docosahehexanóico

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

dw - Massa seca

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

EUA- Estados Unidos da América

EPA - Ácido eicosapentenóico

FAME - Ésteres metílicos de ácidos gordos

FID - Detetor de ionização de chama

fw - Massa fresca

GAE - Equivalentes de ácido gálico

GC - Cromatografia gasosa

GPx – Glutathiona peroxidase

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

LDL – Lipoproteínas de baixa densidade

MDA – Malondialdeído

MS – Espectrometria de massa

MUFA - Ácidos gordos monoinsaturados

m/v - Relação massa/volume

m/z – Relação massa/carga

n^o - Número

nd - Não detetado

PI - Padrão interno

- PUFA** - Ácidos gordos polinsaturados
RI - Índice de refração
ROO[•] - Radical hidroperóxido oxidado
ROOH - Radical hidroperóxido reduzido
ROS – Espécies reativas de oxigénio
rpm - Rotações por minuto
SD - Desvio padrão
SFA - Ácidos gordos saturados
SOD – Superóxido dismutase
TBARS – Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TBA - Ácido tiobarbitúrico
tr - Traços
UFA - Ácidos gordos insaturados
UV - Ultravioleta
VLDL – Lipoproteínas de muito baixa densidade
v/v - Relação volume/volume
w/v - Relação massa/volume

Resumo

A procura de alimentos que tenham a capacidade de melhorar a nossa saúde e reduzir o risco de doenças tem vindo, progressivamente, a ganhar interesse. Os cogumelos podem ser um exemplo desses alimentos, apresentando ainda a vantagem de serem reconhecidos como uma iguaria. Esta característica pode colocar os cogumelos na interface farmacologia- nutrição.

Neste estudo, foram caracterizadas oito espécies de cogumelos em termos nutricionais (proteínas, glúcidos, lípidos, açúcares individuais e ácidos gordos) e de compostos bioativos (tocoferóis, carotenoides, ácidos orgânicos e compostos fenólicos) com propriedades antioxidantes. As propriedades medicinais são frequentemente relacionadas com o potencial antioxidante apresentado pelos extratos de cogumelos.

Boletus regius foi a espécie com maior teor de glúcidos (88,79 g/ 100g dw) e PUFA (56,55 %), compostos bioativos como tocoferóis (736,80 µg/ 100g dw), ácido cítrico (3,32 g/ 100 g dw) e compostos fenólicos (23,49 mg/ 100 g dw), incluindo 2 derivados da crisina, apresentando também elevada atividade antioxidante.

Os compostos bioativos identificados poderão ser usados como nutracêuticos para prevenir doenças crónicas relacionadas com o stresse oxidativo. Além disso, todas as espécies testadas são comestíveis e poderão ser incorporadas diretamente na dieta como alimentos funcionais.

Abstract

The search for foods that might improve health or reduce disease risk, has been progressively gaining interest. Mushroom could be examples of these foods, presenting the additional advantage of being recognized as a delicacy. This feature might place mushrooms in the pharma-nutrition interface.

Herein, eight different mushroom species were characterized in terms of nutrients (proteins, carbohydrates, fat, individual sugars, fatty acids) and bioactive compounds (tocopherols, carotenoids, organic acids and phenolic compounds) with recognized antioxidant properties. The medicinal properties are often related with the antioxidant potential presented by mushroom extracts. *Boletus regius* was the species with the highest levels of carbohydrates (88.79 g/ 100 g dw) and PUFA (56.55%), bioactive compounds such as tocopherols (763.80 µg/100 g dw), citric acid (3.32 g/ 100 g dw) and phenolic compounds (23.49 mg/ 100 g dw), including two chrysin derivatives, presenting also the highest antioxidant activity.

The identified bioactive compounds might be used as nutraceuticals to prevent chronic diseases related with oxidative stress. Furthermore, all tested species are edible, and could be incorporated directly in diet acting as functional foods.

Capítulo I

1. Introdução

1.1. Alimentos funcionais e nutracêuticos

1.1.1 Conceitos gerais

Não existe uma só definição para alimentos funcionais. Segundo Sagarbieri e Pacheco (1999) alimento funcional é “qualquer alimento, natural ou preparado, que contenha uma ou mais substâncias, classificadas como nutrientes ou não nutrientes, capazes de atuar no metabolismo e na fisiologia humana, promovendo efeitos benéficos para a saúde, podendo retardar o desenvolvimento de doenças crônicas e degenerativas e melhorar a saúde e a expectativa de vida das pessoas”.

Um alimento pode então ser considerado funcional se for demonstrado que o mesmo pode afetar benéficamente uma ou mais funções alvo no organismo, além de possuir os adequados efeitos nutricionais, de maneira que seja tanto relevante para o bem-estar e a saúde quanto para a redução do risco de uma doença (Roberfroid, 2002). Estes são alimentos que provêm da oportunidade de combinar produtos comestíveis com moléculas biologicamente ativas, como estratégia para consistentemente corrigir distúrbios metabólicos (Walzem, 2004), resultando em redução dos riscos de doenças e manutenção da saúde (Anjo, 2004).

O termo “alimentos funcionais” foi primeiramente introduzido no Japão em meados dos anos 80 e refere-se aos alimentos processados, contendo ingredientes que auxiliam funções específicas do corpo além de serem nutritivos, sendo estes alimentos definidos como “Alimentos para uso específico de saúde” (*Foods for Specified Health Use-FOSHU*). Estabelece-se que FOSHU são aqueles alimentos que têm efeito específico sobre a saúde devido à sua constituição química.

No Reino Unido, o Ministério da Agricultura, Pesca e Alimentos (MAFF) define alimento funcional como “um alimento cujo componente incorporado oferece benefício fisiológico e não apenas nutricional”. Esta definição ajuda a distinguir alimentos funcionais de alimentos fortificados com vitaminas e minerais.

Nos Estados Unidos da América os termos alimentos funcionais e nutracêuticos têm sido usados conforme a definição estabelecida. No entanto, a dificuldade encontra-se na regulamentação destes termos, pois deve haver uma diferenciação entre produtos que são vendidos e consumidos como alimentos (funcionais) e aqueles em que um componente, em particular, foi isolado e é vendido na forma de barras, cápsulas, pós, entre outros (nutracêuticos). A separação desses produtos é necessária quando se estabelece limites de consumo (Pimentel et al., 2005).

O gabinete Americano de Contas Gerais (*US General Accounting Office-GAO*) define

alimentos funcionais como alimentos que declaram ter benefícios além da nutrição básica. Contudo, em matéria de legislação, um alimento funcional não tem nenhuma definição reconhecida pela FDC (*Food, Drugs and Cosmetics*). A FDA (*Food and Drug Administration*) regula os alimentos funcionais, baseada no uso que se pretende dar aos produtos, na descrição presente nos rótulos ou nos seus ingredientes. A partir destes critérios a FDA classificou os alimentos funcionais em cinco categorias: alimento, suplementos alimentares, alimento para usos dietéticos especiais, alimento-medicamento ou medicamento (Noonan & Noonan, 2004).

Os alimentos e ingredientes funcionais podem ser classificados de dois modos: quanto à fonte, de origem vegetal ou animal, ou quanto aos benefícios que oferecem, atuando em seis áreas do organismo: no sistema gastrointestinal; no sistema cardiovascular; no metabolismo de substratos; no crescimento, no desenvolvimento e diferenciação celular; no comportamento das funções fisiológicas e como antioxidantes (Souza et al., 2003).

Uma grande variedade de produtos tem sido caracterizada como alimentos funcionais, incluindo componentes que podem afetar inúmeras funções corpóreas, relevantes tanto para o estado de bem-estar e saúde como para a redução do risco de doenças. Esta classe de compostos pertence à nutrição e não à farmacologia, merecendo uma categoria própria, que não inclua suplementos alimentares, mas o seu papel em relação às doenças estará, na maioria dos casos, concentrado mais na redução dos riscos do que na prevenção.

Os alimentos funcionais apresentam as seguintes características:

- a) Devem ser alimentos convencionais e serem consumidos na dieta normal/usual;
- b) Devem ser compostos por componentes naturais, algumas vezes, em elevada concentração ou presentes em alimentos que normalmente não os supririam;
- c) Devem ter efeitos positivos além do valor básico nutritivo, que pode aumentar o bem-estar e a saúde e/ou reduzir o risco de ocorrência de doenças, promovendo benefícios na saúde, para além de aumentar a qualidade de vida, incluindo os desempenhos físico, psicológico e comportamental;
- d) A alegação da propriedade funcional deve ter fundamento científico;
- e) Pode ser um alimento natural ou um alimento no qual um componente tenha sido removido;
- g) Pode ser um alimento onde a natureza de um ou mais componentes tenha sido modificada;
- h) Pode ser um alimento no qual a bioatividade de um ou mais componentes tenha sido modificada (Roberfroid, 2002).

Por sua vez, o nutracêutico é um alimento ou parte de um alimento que proporciona benefícios médicos e de saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento da doença. Tais produtos podem abranger desde os nutrientes isolados, suplementos dietéticos na forma de cápsulas e até aos

alimentos processados tais como cereais, sopas e bebidas (Kwak & Jukes, 2001a; Andlauer & Fürst, 2002; Hungenholtz & Smid, 2002; Roberfroid, 2002). Vários nutracêuticos podem ser produzidos através de métodos fermentativos com o uso de microrganismos considerados seguros ou GRAS (*Generally Recognized as Safe*). Os nutracêuticos podem ser classificados como fibras dietéticas, ácidos gordos polinsaturados, proteínas, péptidos, aminoácidos ou cetoácidos, minerais, vitaminas antioxidantes e outros antioxidantes (Andlauer & Fürst, 2002).

O alvo dos nutracêuticos é significativamente diferente dos alimentos funcionais, por várias razões:

a) Enquanto a prevenção e o tratamento de doenças (apelo médico) são relevantes para os nutracêuticos, apenas a redução do risco da doença, e não a prevenção e tratamento da doença estão envolvidos com os alimentos funcionais;

b) Enquanto os nutracêuticos incluem suplementos dietéticos e outros tipos de alimentos, os alimentos funcionais devem estar na forma de um alimento comum (Kwak & Jukes, 2001b).

Kruger & Mann (2003) definem os ingredientes funcionais como um grupo de compostos que apresentam benefícios para a saúde, tais como, os carotenoides e flavonoides encontrados em frutos e vegetais, os glucosinolatos encontrados nas plantas da família das crucíferas, os ácidos gordos polinsaturados presentes em óleos vegetais e óleo de peixe. Estes ingredientes podem ser consumidos juntamente com os alimentos dos quais são provenientes, sendo estes alimentos considerados funcionais, ou individualmente, como nutracêuticos. Devem ter um perfil de segurança adequado, trazendo confiança ao consumo humano. Não devem apresentar risco de toxicidade ou os efeitos adversos característicos dos fármacos convencionais (Bagchi et al., 2004).

1.1.2. Classificação dos alimentos funcionais

Não existe apenas uma classificação para os alimentos funcionais. Podemos no entanto, assumir algumas das sugestões já existentes como possíveis classificações. Uma dessas possibilidades é a seguinte:

- Alimentos naturais que contêm, em quantidades apropriadas, compostos promotores de benefícios para a saúde;
- Alimentos processados que tenham sofrido algum tipo de modificação, como por exemplo, redução de gordura;
- Novos alimentos enriquecidos com ingredientes funcionais, produzidos por biotecnologia ou

métodos diferenciados, como por exemplo leite enriquecido com $\Omega 3$, margarina com esteróis de soja entre outros.

Como já mencionado anteriormente, os alimentos funcionais devem ser sempre consumidos na dieta normal e devem aumentar o bem-estar e a saúde e/ou reduzir o risco de ocorrência de doenças, além do seu valor nutritivo básico.

Probióticos e prebióticos

Os probióticos são microrganismos vivos que podem ser agregados como suplementos na dieta, afetando de forma benéfica o desenvolvimento da flora microbiana no intestino. São também conhecidos como bioterapêuticos, bioprotetores e bioprotetores e são utilizados para prevenir as infecções entéricas e gastrointestinais (Reig & Anesto, 2002). A definição internacional atualmente aceita é a que refere que os probióticos são microrganismos vivos, administrados em quantidades adequadas, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro (Saad, 2006).

“Os benefícios à saúde do hospedeiro atribuídos à ingestão de culturas probióticas são: controle da microbiota intestinal, estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos, promoção da resistência gastrintestinal à colonização por patógenos, diminuição da concentração dos ácidos acético e láctico e outros compostos antimicrobianos, promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose, estimulação do sistema imune, alívio da constipação e aumento da absorção de minerais e vitaminas” (Saad, 2006). A tabela 1 relaciona as causas e mecanismos dos efeitos benéficos atribuídos aos probióticos.

Tabela 1. Causas e mecanismos dos efeitos benéficos atribuídos aos probióticos (Kalantzopoulos, 1997; Holzapfel & Schillinger, 2002; Kaur, et al., 2002).

Efeito benéfico	Possíveis causas e mecanismos
Melhor digestibilidade	Degradação parcial das proteínas, lipídios e glúcidos;
Melhor valor nutritivo	Níveis elevados das vitaminas do complexo B e de alguns aminoácidos essenciais como metionina, lisina e triptofano;
Melhor utilização da lactose	Níveis reduzidos de lactose no produto e maior disponibilidade de lactose;
Ação antagónica contra agentes patogénicos entéricos	Distúrbios tais como diarreia, colites mucosa e ulcerosa, diverticulite e colite antibiótica são controlados pela acidez; Inibidores microbianos e inibição da adesão e ativação de patógenos;
Colonização do intestino	Sobrevivência ao ácido gástrico, resistência à lisozima e à tensão superficial do intestino, adesão ao epitélio intestinal, multiplicação no trato gastrointestinal, modulação imunitária;
Ação anti-carcinogénica	Conversão de potenciais pré-carcinogénicos em compostos menos perniciosos; Estimulação do sistema imunitário;
Ação hipocolesterolémica	Produção de inibidores da síntese do colesterol; Utilização do colesterol por assimilação e precipitação como sais biliares desconjugados;
Modulação imunitária	Melhor produção de macrófagos, estimulação da produção de células supressoras;

Segundo Salminen et al. (1998), os critérios para a seleção de probióticos dizem respeito ao género a que os microrganismos pertencem (origem, definição, caracterização, espécies seguras), a sua estabilidade e segurança (atividade e viabilidade nos produtos, aderência e potencial invasivo, bem como resistência ao baixo pH, aos sucos gástrico, biliar e pancreático, à capacidade de colonização) e aos aspetos funcionais e fisiológicos (aderência ao epitélio intestinal, antagonismo aos patógenos, estimulação ou supressão da resposta imunológica, estimulação às bactérias benéficas).

Os prebióticos são oligossacáridos não digeríveis, porém fermentáveis cuja função é mudar a atividade e a composição da microbiota intestinal com o intuito de promover a saúde do hospedeiro. As fibras dietéticas e os oligossacáridos não digeríveis são os principais substratos de crescimento dos microrganismos dos intestinos. Os prebióticos estimulam o crescimento dos grupos endógenos de população microbiana, tais como as Bifidobactérias e os Lactobacilos, que são descritos como benéficos para a saúde humana (Blaut, 2002). Os prebióticos mais eficientes irão reduzir a atividade de organismos potencialmente patogénicos (Roberfroid, 2002).

Para que uma substância (ou grupo de substâncias) possa ser definida como tal, deve cumprir os seguintes requisitos: ser de origem vegetal; formar parte de um conjunto heterogéneo de moléculas complexas; não ser digerida por enzimas digestivas; ser parcialmente fermentada por uma colónia de bactérias e ser osmoticamente ativa (Rodríguez, et al., 2003).

Um produto em que estão combinados um probiótico e um prebiótico é denominado simbiótico. A interação entre o probiótico e o prebiótico *in vivo* pode ser favorecida por uma adaptação do probiótico ao substrato prebiótico anterior ao consumo. Isto pode, em alguns casos, resultar numa vantagem competitiva para o probiótico, se ele for consumido juntamente com o prebiótico (Saad, 2006).

Alguns efeitos atribuídos aos prebióticos são: a modulação de funções fisiológicas chaves, como a absorção de cálcio, o metabolismo lipídico, a modulação da composição da microbiota intestinal, a qual exerce um papel primordial na fisiologia intestinal e a redução do risco de cancro de colón (Roberfroid, 2002).

Alimentos sulfurados e azotados

Os alimentos sulfurados e azotados são compostos orgânicos usados na proteção contra a carcinogénese e mutagénese, sendo ativadores de enzimas na desintoxicação do fígado (Anjo, 2004).

Esses compostos inibem a mutação do ADN, que predispõe para algumas formas de cancro (Souza et al., 2003).

Vitaminas antioxidantes

A oxidação nos sistemas biológicos ocorre devido à ação dos radicais livres no organismo. Estas moléculas têm um eletrão isolado, livre para se ligar a qualquer outro eletrão, e por isso são extremamente reativas. Estas podem ser geradas por fontes endógenas ou exógenas. As fontes endógenas, originam-se em processos biológicos que normalmente ocorrem no organismo, tais

como: presença de metais de transição no interior da célula e de sistemas de transporte de eletrões. Esta geração de radicais livres envolve vários organelos celulares, como mitocôndrias, lisossomas, peroxissomas, núcleo, retículo endoplasmático e membranas. As fontes exógenas geradoras de radicais livres incluem tabaco, poluição do ar, solventes orgânicos, anestésicos, pesticidas e radiações (Soares, 2002).

“As lesões causadas pelos radicais livres nas células podem ser prevenidas ou reduzidas por meio da atividade de antioxidantes, sendo estes encontrados em muitos alimentos. Os antioxidantes podem agir diretamente na neutralização da ação dos radicais livres ou participar indiretamente de sistemas enzimáticos com essa função. Nos antioxidantes estão a vitamina C, a glutatona, o ácido úrico, a vitamina E e os carotenoides” (Shami & Moreira, 2004).

Os carotenoides estão presentes em alimentos com pigmentação amarela, laranja ou vermelha. Os seus principais representantes são os carotenos, precursores da vitamina A e o licopeno. As xantofilas são sintetizadas a partir dos carotenos, por meio de reações de hidroxilação e epoxidação. O β -caroteno e o licopeno são exemplos de carotenos, enquanto a luteína e a zeaxantina são xantofilas. Dos mais de 600 carotenoides conhecidos, aproximadamente 50 são precursores da vitamina A.

Entre os carotenoides, o β -caroteno é o mais abundante em alimentos e o que apresenta a maior atividade de vitamina A. Tanto os carotenoides precursores de vitamina A como os não precursores, como a luteína, a zeaxantina e o licopeno, parecem apresentar ação protetora contra o cancro, sendo que os possíveis mecanismos de proteção são por intermédio da captação de radicais livres, modulação do metabolismo do carcinoma, inibição da proliferação celular, aumento da diferenciação celular via retinoides, estimulação da comunicação entre as células e aumento da resposta imune.

O β -caroteno é um potente antioxidante com ação protetora contra doenças cardiovasculares. A oxidação das LDL (lipoproteínas de baixa densidade) é um fator crucial para o desenvolvimento da aterosclerose e o β -caroteno atua inibindo o processo de oxidação da lipoproteína.

Segundo Stahl & Sies (2003), os carotenoides fazem parte do sistema de defesa antioxidante em humanos e animais. Devido à sua estrutura atuam protegendo as estruturas lipídicas da oxidação ou por captação de radicais livres gerados no processo foto-oxidativo. A Figura 1 apresenta estruturas de carotenoides.

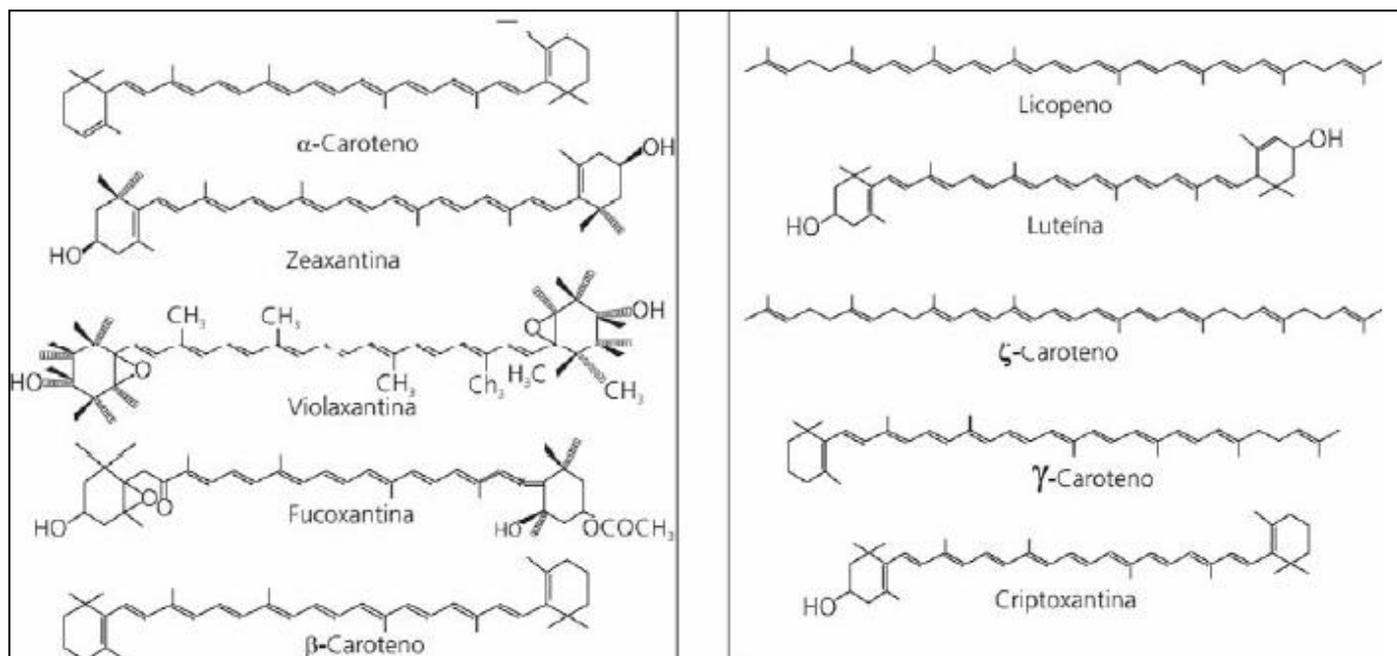


Figura 1. Estruturas químicas de carotenoides (Ambrósio et al., 2006).

A vitamina E é a principal vitamina antioxidante transportada na corrente sanguínea pela fase lipídica das partículas de lipoproteínas. Junto com o β -caroteno e outros antioxidantes naturais, chamados ubiquinonas, a vitamina E protege os lípidos da peroxidação. A ingestão de vitamina E em quantidades acima das recomendações correntes pode reduzir o risco de doenças cardiovasculares, melhorar a condição imune e modular condições degenerativas importantes associadas com o envelhecimento (Souza et al., 2003).

A vitamina E é um componente dos óleos vegetais encontrada na natureza em quatro formas diferentes α , β , γ e δ -tocoferol, sendo o α -tocoferol a forma antioxidante amplamente distribuída nos tecidos e no plasma. A vitamina E encontra-se em grande quantidade nos lípidos, e evidências recentes sugerem que essa vitamina impede ou minimiza os danos provocados pelos radicais livres associados com doenças específicas, incluindo o cancro, artrite, catarata e o envelhecimento. A vitamina E tem a capacidade de impedir a propagação das reações em cadeia induzidas pelos radicais livres nas membranas biológicas. Os danos oxidativos podem ser inibidos pela ação antioxidante dessa vitamina, juntamente com a glutathione, a vitamina C e os carotenoides, constituindo um dos principais mecanismos da defesa endógena do organismo (Bianchi & Antunes, 1999). A Figura 2 apresenta a estrutura química de tocoferóis.

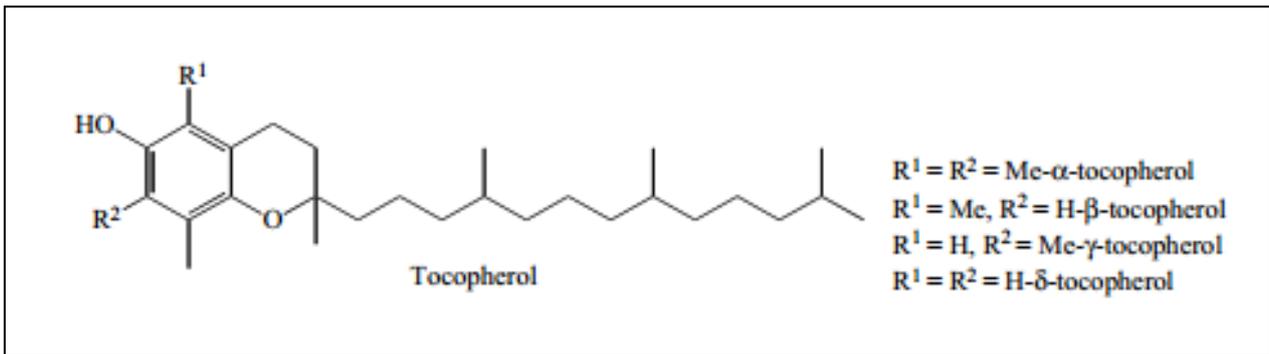


Figura 2. Estrutura química de tocoferóis (Ferreira et al.,2009)

A vitamina C (ácido ascórbico) é, geralmente, consumida em grandes doses pelos seres humanos, sendo adicionada a muitos produtos alimentares para inibir a formação de metabolitos nitrosos carcinogénicos. Os benefícios obtidos na utilização terapêutica da vitamina C em ensaios biológicos com animais incluem o efeito protetor contra os danos causados pela exposição às radiações e medicamentos. Os estudos epidemiológicos também atribuem a essa vitamina um possível papel de proteção no desenvolvimento de tumores nos seres humanos. Contudo, a recomendação de suplementação dessa vitamina deve ser avaliada especificamente para cada caso, pois existem muitos componentes orgânicos e inorgânicos nas células que podem modular a atividade da vitamina C, afetando sua ação antioxidante (Bianchi & Antunes, 1999). A Figura 3 apresenta a estrutura química da vitamina C.

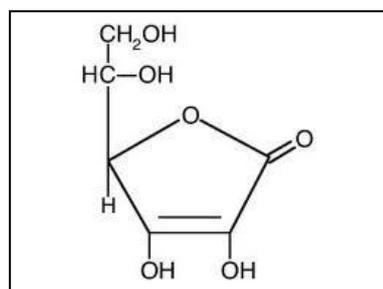


Figura 3. Estrutura da vitamina C (Web 1).

Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos caracterizam-se por possuir um grupo funcional hidroxilo (OH) ligado a um anel benzénico. Existe uma grande variedade de compostos fenólicos; a partir da molécula simples de fenol podem obter-se substâncias com diferentes níveis de complexidade, que podem ser classificadas em várias famílias e grupos. Naturalmente, nem todas estas substâncias são isoláveis ou identificáveis nos tecidos vegetais. São vários os critérios disponíveis para classificação de compostos fenólicos, porém a forma mais simples, didática e a mais utilizada são: fenóis simples, fenóis compostos e os flavonoides, que são a família mais vasta de compostos fenólicos naturais e estão amplamente distribuídos nos tecidos vegetais.

Os compostos fenólicos são, pois, uma ampla classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana. Estes compostos possuem uma série de propriedades farmacológicas que os fazem atuar sobre os sistemas biológicos (Lopes et al., 2003), por exemplo, como antioxidantes. A dieta mediterrânica, rica em frutos frescos e vegetais, tem sido associada à baixa incidência de doenças cardiovasculares e cancro, principalmente devido à elevada proporção de compostos bioativos como vitaminas, flavonoides e outros polifenóis (Benavente-García et al., 1999).

O potencial antioxidante de um composto é determinado pela reatividade dele como um doador de eletrões ou hidrogénio, pela capacidade de deslocar ou estabilizar um eletrão desemparelhado, pela reatividade com outro antioxidante e com oxigénio molecular. Outros efeitos fisiológicos da ação de compostos antioxidantes incluem a sua atuação como anticancerígenos e antimutagénicos sempre considerando que estes problemas podem ocorrer por ação de radicais livres.

A formação de radicais livres está associada com o normal metabolismo de células aeróbias. O consumo de oxigénio inerente à multiplicação celular leva a geração de uma série de radicais livres. A interação destas espécies com moléculas de natureza lipídica em excesso produz novos radicais: hidroperóxidos e diferentes peróxidos. Estes grupos de radicais podem interagir com os sistemas biológicos de formas citotóxicas. Com respeito a isto, flavonóides e outros fenóis têm sido reportados por possuírem atividade antioxidante contra os radicais livres, a qual está associada às propriedades redox dos grupos hidroxilo (Benavente-García et al., 1999).

Antioxidantes fenólicos funcionam como captadores de radicais e, algumas vezes, como quelantes de metais agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias (Soares, 2002).

Ácidos gordos polinsaturados

Os ácidos gordos polinsaturados (PUFA), destacando as séries n3 e 6, são encontrados em peixes de água fria (salmão, atum, sardinha, bacalhau), óleos vegetais, sementes de linhaça, nozes e alguns tipos de vegetais. Um ácido gordo é chamado de n3 quando a primeira dupla ligação está localizada no carbono 3 a partir do radical metilo (CH₃), e n6 quando a dupla ligação está no sexto carbono da cadeia a partir do mesmo radical.

Os principais ácidos gordos da família n3 são o α -linolénico (C18:3 – 18 carbonos e 3 insaturações), o eicosapentanoico-EPA (C20:5 – 20 carbonos e 5 insaturações) e o docasahexanoico-DHA (C22:6 – 22 carbonos e 6 insaturações). Os ácidos gordos da família n6 mais importantes são o linoleico (C18:2 – dezoito carbonos e 2 insaturações) e o araquidónico (C20:4 – 20 carbonos e 4 insaturações) (Pimentel et al., 2005).

Os ácidos gordos de cadeia longa da família n3 (EPA e DHA) são sintetizados nos seres humanos a partir do ácido linolénico. Este ácido gordo é também o precursor primordial das prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos com atividade anti-inflamatória, anticoagulante, vasodilatadora e antiagregante (Rodríguez et al., 2003; Pimentel et al., 2005). Os ácidos gordos n3 são também indispensáveis para os recém-nascidos por representarem um terço da estrutura de lípidos no cérebro; carências destas substâncias podem ocasionar redução da produção de enzimas relacionadas com as funções de aprendizagem. O suprimento adequado de DHA na alimentação dos bebés é fundamental para o desenvolvimento da retina.

Considera-se que os ácidos gordos saturados induzem a hipercolesterolemia enquanto que os PUFA apresentam efeito de redução da hipercolesterolemia (Lin He & Fernandez, 1998; Erkkilä et al., 1999). Há várias explicações acerca dos mecanismos pelos quais os ácidos gordos afetam as concentrações do colesterol plasmático, tais como mudanças na composição das lipoproteínas, na produção de LDL e VLDL (lipoproteínas de muito baixa densidade) pelo fígado e na atividade dos recetores de LDL.

Além de seu papel nutricional na dieta, os ácidos gordos n3 podem ajudar a prevenir ou tratar uma variedade de doenças, incluindo doenças do coração, cancro, artrite, depressão e Alzheimer entre outros. Os ácidos gordos n3 devem ser consumidos numa proporção equilibrada com os ácidos gordos n6. Os nutricionistas acreditam que uma proporção ideal seria de aproximadamente de 5:1 de n6 para n3.

O ácido linoleico, presente no óleo de girassol, pertencente ao grupo dos ácidos gordos n6, é transformado pelo organismo humano no ácido araquidónico e em outros ácidos gordos polinsaturados. Os n6 derivados do ácido linoleico exercem um importante papel fisiológico:

participam da estrutura de membranas celulares, influenciando a viscosidade sanguínea, permeabilidade dos vasos, ação antiagregadora, pressão arterial, reação inflamatória e funções plaquetárias.

Fibras (Oligossacáridos)

A fibra dietética é uma substância indisponível como fonte de energia, pois não é passível de hidrólise pelas enzimas do intestino humano e que pode ser fermentada por algumas bactérias. A maior parte das substâncias classificadas como fibras são polissacáridos não amiláceos (Pimentel, et al., 2005).

Podem classificar-se as fibras em dois grupos, segundo o papel que cumprem nos vegetais:

- a) Polissacáridos estruturais: estão relacionados com a estrutura da parede celular e incluem celulose, hemiceluloses, pectinas, gomas e mucilagens segregadas pelas células;
- b) Polissacáridos não estruturais (Salinas, 2002).

Outra classificação possível diferencia as fibras como fibras solúveis e insolúveis. As fibras solúveis são as pectinas e hemiceluloses. Estas tendem a formar géis em contato com água, aumentando a viscosidade dos alimentos parcialmente digeridos no estômago (Pimentel et al., 2005). As fibras solúveis diminuem a absorção de ácidos biliares e têm atividades hipocolesterolémicas. Quanto ao metabolismo lipídico, parecem diminuir os níveis de triglicéridos, colesterol e reduzir a insulinemia (Rodríguez et al., 2003).

As fibras insolúveis permanecem intactas através de todo o trato gastrointestinal e compreendem a lenhina, a celulose e algumas hemiceluloses (Pimentel et al., 2005). Como funções funcionais da fibra insolúvel estão:

- a) O incremento do bolo fecal e o estímulo da motilidade intestinal;
- b) A maior necessidade de mastigação, relevantes na sociedade moderna vítimas da ingestão compulsiva e da obesidade;
- c) O aumento da excreção de ácidos biliares e propriedades antioxidantes e hipocolesterolémicas (Rodríguez et al., 2003).

Segundo Anjo (2004), os efeitos do uso das fibras são a redução dos níveis de colesterol sanguíneo e diminuição dos riscos de desenvolvimento de cancro, decorrentes de três fatores: capacidade de retenção de substâncias tóxicas ingeridas ou produzidas no trato gastrointestinal

durante processos digestivos; redução do tempo do trânsito intestinal, promovendo uma rápida eliminação do bolo fecal, com redução do tempo de contato do tecido intestinal com substâncias mutagénicas e carcinogénicas e formação de substâncias protetoras pela fermentação bacteriana dos compostos de alimentação.

1.2. Os cogumelos como alimentos funcionais e fonte de nutracêuticos

Diplock et al. (1999) define alimento funcional como, um alimento que melhora a saúde e o bem-estar, e/ou que reduz o risco de doença através da sua intervenção benéfica ao nível das funções do corpo humano. Um alimento funcional é, ou pode ser, semelhante em aparência, a um alimento convencional. É consumido como parte de uma dieta normal e já foi demonstrado que, além das funções nutricionais básicas, este tem efeitos benéficos ao nível psicológico e/ou reduz o risco de doenças crónicas (Walji & Boon, 2008; Falguera et al., 2012). Estes alimentos representam por isso, uma das mais interessantes áreas de investigação e inovação na indústria alimentar (Jones & Jew, 2007; Sirò et al., 2008). Na Europa, a venda destes alimentos tem aumentado significativamente sendo que, a Alemanha, a França, o Reino Unido e a Holanda representam os países mais importantes dentro deste mercado. Contudo, muitos outros mercados europeus estão a experimentar altas taxas de crescimento no que diz respeito à comercialização destes alimentos (Annunziata & Vecchio, 2011).

Tradicionalmente, os produtos farmacêuticos têm sido usados no tratamento de doenças crónicas ou para aliviar os seus sintomas. A nutrição por outro lado, têm como objetivo fundamental prevenir estas doenças fornecendo ao corpo um equilíbrio ideal de macro e micronutrientes fundamental para uma boa saúde.

Devido ao conhecimento emergente acerca destas doenças, os medicamentos são cada vez mais usados para diminuir os fatores de risco e assim, prevenir doenças crónicas. Contudo, a aparência dos alimentos funcionais e suplementos alimentares no mercado ainda torna mais turva a distinção entre farmacologia e nutrição (Eussen et al., 2011).

Os cogumelos podem estar na interface farmacologia-nutrição pois, desde os tempos mais antigos que os cogumelos têm sido consumidos por humanos não apenas como parte de uma dieta normal mas, também como uma iguaria devido ao seu sabor e aroma altamente desejável. Além disso, as suas propriedades nutricionais e medicinais têm sido reconhecidas ao longo dos tempos (Mattila et al., 2000).

Os cogumelos têm um grande teor de proteínas (incluindo todos os aminoácidos essenciais) e um baixo conteúdo de lípidos. Contêm também quantidades relativamente elevadas de glúcidos e fibras e quantidades significativas de vitaminas nomeadamente tiamina, riboflavina, ácido ascórbico

e vitamina D2, bem como sais minerais (Kalač, 2009). Para além do seu valor nutricional, alguns cogumelos têm um valor medicinal sendo que, já foram referenciados anteriormente os seus efeitos antitumorais, antivirais e hipolipidémicos (Lindequist et al., 2005; Poucheret et al., 2006; Ferreira et al., 2010).

Embora os alimentos funcionais estejam atualmente em voga, a maioria das pessoas não tem certezas relativamente aos seus benefícios. O consumo destes alimentos pode oferecer uma oportunidade de reduzir os fatores de risco para a saúde e o risco de doenças, tanto em monoterapia como em combinação com outras drogas de prescrição. Por exemplo, sob stresse, o nosso organismo produz mais espécies reativas de oxigénio (ROS) (p.ex. radicais aniões superóxido, radicais hidroxilo e peróxido de hidrogénio) do que antioxidantes enzimáticos (p.ex. superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (Gpx) e catalase e não enzimáticos (p.ex. glutatona). Este desequilíbrio leva a danos celulares e a problemas de saúde (Ferreira et al., 2009; Krishnaiah et al., 2011). Neste contexto, alimentos com antioxidantes podem reduzir o stresse oxidativo nas células e serem portanto, úteis no tratamento de muitas doenças humanas incluindo o cancro, doenças cardiovasculares e doenças inflamatórias.

O grupo de investigação onde se desenvolveu este trabalho tem estado dedicado nestes últimos anos ao estudo de cogumelos silvestres do Nordeste de Portugal, considerando que estes alimentos podem ser incluídos na interface farmacológica-nutricional (Barros et al., 2008; Vaz et al., 2010; Grangeia et al., 2011; Pereira et al., 2012; Vaz et al., 2012). Nessa perspetiva, o presente trabalho caracteriza pela primeira vez oito espécies de cogumelos silvestres comestíveis em termos de composição nutricional e de compostos bioativos sobretudo com propriedades antioxidantes.

1.3. Fungos

Reino Fungi

O Reino Fungi é um grande grupo de organismos eucariotas que inclui micro-organismos como leveduras e bolores e fungos macroscópicos como os cogumelos. Tem um enorme número de espécies com alguns autores a estimarem mais de 300.000 espécies, entre aquelas que são conhecidas e as que ainda não foram estudadas mas, estão classificadas. Estão formalmente descritas cerca de 100 000 espécies de fungos, mas a biodiversidade global do reino dos fungos, com base em observações da relação entre o número de espécies de fungos e o número de espécies de plantas em ambientes selecionados, estima-se em 1,5 milhões de espécies (Hawksworth, 2006).

Os fungos são classificados num reino separado e, uma grande diferença destes organismos

é o facto de as suas células terem paredes celulares e, estas, ao contrário das de células vegetais, que são constituídas por celulose, conterem, glicanos e quitina, sendo os únicos organismos que combinam estas duas moléculas estruturais na sua parede celular.

Os fungos produzem vários metabolitos secundários que são estruturalmente semelhantes ou idênticos aos produzidos pelas plantas. As enzimas de plantas e fungos que produzem estes compostos diferem nas suas características e sequência de aminoácidos, o que está de acordo com as origens e evolução separadas de fungos e plantas (Keller et al. 2005).

Atualmente, após um entendimento da maior parte da comunidade micologista mundial e recorrendo às aplicações da biologia molecular determinou-se que o reino Fungi fosse dividido em 7 filos (Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Neocallimastigomycota e Microsporidia) 10 subfilos, 35 classes, 12 subclasses e 129 ordens. O filo Microsporidia, que contém fungos parasitas de animais e protistas, foi introduzido por Hibbett, que referiu serem ainda necessários mais estudos para se poder confirmar se devem ter um filo próprio (Hibbett et al., 2007).

Filos Basidiomycota e Ascomycota

Ascomycota e Basidiomycota são os filos que constituem o sub-reino Dikarya do reino Fungi e, os filos cujos organismos formam carpóforos, esporóforos ou cogumelos. No Filo Ascomycota estão inseridos os fungos que produzem os seus esporos (ascósporos) em esporângios específicos chamados ascos. É um grupo monofilético de cerca de 32.000 espécies, ao qual pertencem inclusive a maioria das formas anamórficas, leveduras e formas liquenizadas. Este grupo engloba também a maioria dos fungos patogénicos para as plantas.

Na maioria das espécies, os ascos estão contidos numa estrutura chamada de ascoma. Cada asco produz oito ascósporos (ou um múltiplo de 8), que resultam de uma meiose seguida de uma mitose, embora ascos com 4 esporos sejam característicos de algumas espécies.

A maioria dos ascomicota possui sistema somático filamentososo, ou seja, são constituídos por hifas, formadas por filamentos longos e ramificados que, em conjunto com outras hifas formam o micélio. As hifas são tipicamente constituídas por uma parede tubular contendo quitina e β -glicanos e são divididas por septos regulares, dotados de poros simples. Septos sem poros podem ser formados na base de estruturas reprodutivas, para isolar porções velhas do micélio ou partes lesionadas, para evitar a perda de citoplasma no caso de haver algum dano ou rutura da membrana celular. Muitas das células são perfuradas centralmente, o que permite que o citoplasma e os núcleos circulem pelas hifas, embora a maioria das células possua um único núcleo.

Basidiomycota é o filo que engloba as espécies que produzem esporos numa estrutura em forma de bastão chamada basídio. No mundo estima-se que o grupo dos Basidiomycota tenha cerca de 30.000 espécies, correspondendo a 37% do número descrito dos fungos verdadeiros (Kirk et al., 2001). Os fungos deste filo podem ser encontrados tanto nas formas miceliais, quanto leveduriformes, sendo a primeira a sua forma dominante. (Alexopoulos et al., 1996).

A reprodução dos Basidiomycota pode ocorrer de duas formas, assexuada e sexuada. A forma assexuada pode consistir na fragmentação do micélio, gemulação em espécies unicelulares ou produção de vários esporos assexuais. O início da fase sexuada dá-se pela fusão entre células haplóides compatíveis, tornando-se células dicarióticas (e não diplóides). Esse micélio dicariótico dá origem aos basídios, onde, na formação desses esporos, ocorre a união dos núcleos (Alexopoulos et al., 1996; Swann & Hibbett, 2007).

Outra característica interessante destes fungos é os seus basidiósporos. Ao contrário dos ascósporos nos Ascomycota, os basidiósporos são exógenos e encontrados normalmente, em número de quatro por basídio, (figura 4).

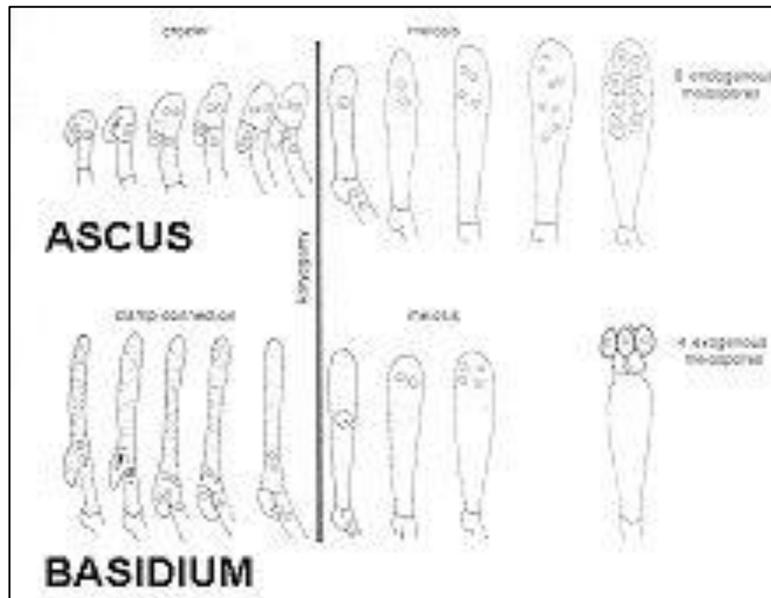


Figura 4. Diferenças entre a formação do Basídio e do Asco (Web 2).

Os Basidiomycota podem apresentar um micélio visível, responsável pela reprodução do grupo, onde são armazenados os basídios. Tal conjunto é chamado de basidioma, carpóforo, esporóforo (cogumelo).



Figura 5. Partes de um basidioma (Web 3).

Todos os fungos que apresentarem essa estrutura pertencem a esse grupo, mas, a ausência desse caráter não o exclui do mesmo, podendo pertencer a classes que não possuem basidiomas. Outros ainda podem apresentar diferentes formas, como gelatinosas, carnosas, secas, coriáceas, entre outras (Alexopoulos & Beneke, 1962).

Ecologia

Não devemos esquecer que os fungos, pelo facto de carecerem de clorofila e de pigmentos foto ou químio sintéticos, têm de se relacionar com outros seres vivos para sobreviverem procurando nutrientes orgânicos. Os fungos devem obter o carbono necessário para constituir os seus tecidos a partir de substâncias orgânicas vivas ou mortas.

As principais formas de vida destes seres vivos levam-nos a dividi-los em três grandes grupos: fungos saprófitas, fungos parasitas e fungos simbióticos.

Um fungo saprófita é aquele que se alimenta de matéria orgânica morta ou em decomposição. São estes fungos que decompõem os cadáveres, folhas mortas, fezes e outros materiais orgânicos, reciclando assim elementos químicos como o carbono, azoto, fósforo, sob a forma de compostos minerais utilizáveis por outros seres vivos.

Além deste género de tarefa também decompõem material orgânico utilizável pelo homem, o que causa prejuízos. São os mais frequentes em determinados ecossistemas e intervêm na mineralização dos restos vegetais para que possa depois formar parte do húmus. Segundo a natureza da substância

na qual vivem os fungos, estes dividem-se em: fimícolas ou coprófilos (vivem nos excrementos e às vezes precisam de substratos em fermentação e temperaturas altas para frutificarem), humícolas (vive em restos vegetais em decomposição, húmus), lenhícolas (vivem em madeira morta, ramos, cepos, entre outros), terrícolas (vivem na terra sem vegetação e sem húmus sendo, frequentes nos taludes e nas margens dos caminhos), práticolas (vivem na erva, e este facto torna difícil saber se são saprófitas ou micorrízicos), folículas (vivem sobre folhas desenvolvendo o micélio no interior delas), pirófilas (vivem em terrenos que tenham sido queimados) e por fim, cortícolas (vivem sobre as cascas das árvores de folha caduca e também nas corníferas).

Os fungos parasitas vivem ou colonizam animais, vegetais, ou até outros fungos, aos que provocam, doenças, a morte ou simplesmente vivem aproveitando-se deles. Os fungos constituem 90% dos parasitas vegetais e podem chegar a destruir 15% da produção vegetal mundial pois, estes produzem grande número de enzimas, toxinas e antibióticos, tornando-se capazes de vencer as defesas das células dos organismos que atacam. Podemos falar de três tipos de fungos parasitas: fungos que parasitam as árvores, fungos que parasitam os animais e fungos que parasitam outros fungos.

Às vezes a divisão entre fungos saprófitas e parasitas não está muito clara pois, alguns dos fungos encontrados na natureza não podem ser classificados especificamente numa destas categorias sendo por esse motivo designados de fungos sapro-parasitas. Estes fungos sapro-parasitas inicialmente são fungos parasitas mas, logo depois transformam-se em saprófitas (Rodríguez, 2012).

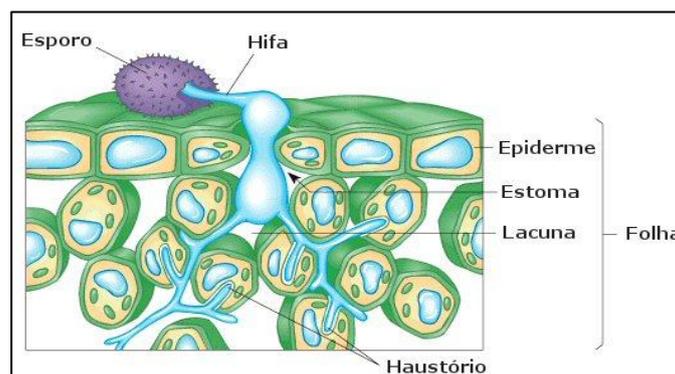


Figura 6. Fungos parasitas das plantas possuem hifas especializadas – haustório (Web 4).

No caso dos cogumelos estudados, estes são todos fungos simbióticos ou micorrízicos, ou seja, são fungos cujo micélio se alimenta estabelecendo uma relação de cooperação recíproca com as plantas. A relação entre os fungos e a raiz das plantas constitui um tipo especial de simbiose chamada micorriza ou simbiose micorrízica. Nesta simbiose micorrízica o fungo obtém o açúcar das

raízes das plantas. Não obstante, permite à planta, através da união do micélio com as raízes, aumentar o aparelho radical.

As micorrizas podem definir-se como uma simbiose mutualista entre os fungos e as raízes das plantas superiores. Como consequência desta simbiose, a planta fornece ao fungo o carbono que tem a sua origem na fotossíntese e, por outro lado, o fungo ajuda a planta a absorver os nutrientes minerais do solo. As hifas que crescem na raiz possuem uma função muito importante no transporte de iões de fosfato à planta.

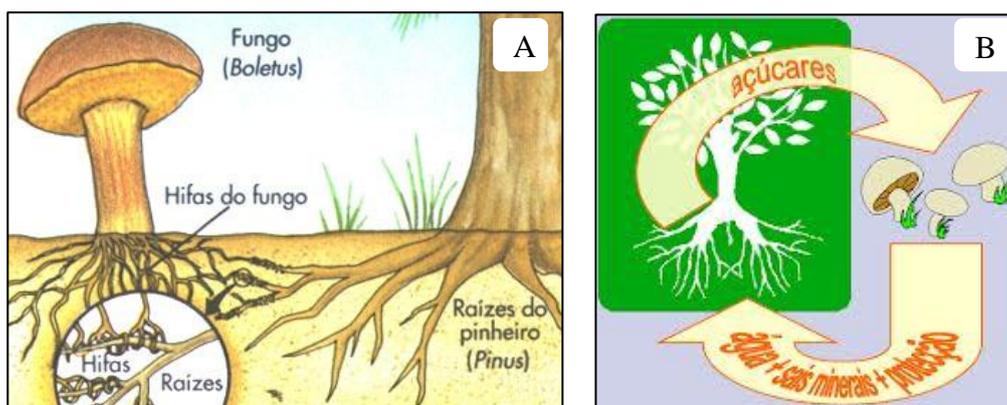


Figura 7. Exemplo de Micorriza:(A); Relações nutritivas entre os fungos e as raízes das plantas: (B); (web 5- (A); Web 6- (B)).

Habitat

O *habitat* dos cogumelos é bastante diversificado, pois, de facto, cada cogumelo tem condições diferentes, que estão também relacionadas com o seu modo de nutrição e também com as características ambientais do local. Desta forma, podemos encontrar espécies mais generalizadas, que se encontram em qualquer ecossistema e outras que só aparecem em locais mais restritos. Frequentemente, cada espécie de cogumelos está ligada a uma espécie ou a um grupo de árvores bem determinado, formando uma unidade com o seu meio.

Além dos bosques, os cogumelos formam-se praticamente em todos os *habitats*, como pastos, prados, pântano, dunas de areia, regiões glaciares alpinas, margens de estradas, parques e jardins.

1.4. Taxonomia e caracterização das amostras estudadas

Tabela 2. Taxonomia das espécies de cogumelos silvestres comestíveis analisadas.

Espécie	Reino	Filo	Classe	Ordem	Família	Género	Referência
<i>Amanita crocea</i>	Fungi	Basidiomycota	Basidiomycetes	Agaricales	Amanitaceae	Amanita	(Quél. in Bourd.)
<i>Amanita mairei</i>	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Amanitaceae	Amanita	Foley
<i>Boletus regius</i>	Fungi	Basidiomycota	Basidiomycetes	Boletales	Boletaceae	Boletus	Krbh
<i>Boletus porosporus</i>	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Boletales	Boletaceae	Boletus	(Imler ex Bon)
<i>Gyromitra esculenta</i>	Fungi	Ascomycota	Pezizomycetes	Pezizales	Discinaceae	Gyromitra	(Pers. ex Pers.) Fr.
<i>Helvella lacunosa</i>	Fungi	Ascomycota	Pezizomycetes	Pezizales	Helvellaceae	Helvella	(Afzel.)
<i>Russula aurea</i>	Fungi	Basidiomycota	Agaricomycetes	Russulales	Russulaceae	Russula	Pers.
<i>Russula virescens</i>	Fungi	Basidiomycota	Basidiomycetes	Russulales	Russulaceae	Russula	(Schaeff.) Fr.

Amanita crocea

Esta espécie tem como características morfológicas: chapéu de 4-12cm, cor de laranja, amarelo ou açafroada. Ao princípio cónico obtuso, depois aberto quase plano mas, sempre com um mamelão central e a margem apresenta estrias. As lâminas são brancas ou cor creme, e as bordas às vezes finamente dentadas, ventradas, livres e serradas. O pé de 0-15 x 1-2cm, engrossado na base, branco e coberto por uma série de escamas em zig-zag. A sua carne é branca e frágil e os esporos são globulosos, lisos e não amiloides, adquirindo uma cor branca quando em conjunto (Rodríguez, 2012).

Relativamente ao seu *habitat* estes crescem debaixo de árvores planifólias e coníferas especialmente em solos ácidos. Encontram-se frequentemente entre o verão e o outono e apresentam um cheiro inapreciável e sabor fúngico. Já foi referenciada em diferentes zonas da América do Norte e também da Europa (Polónia, Reino Unido, Espanha).

Este é considerado comestível mas, após cozedura (Rodríguez, 2012).



Figura 8. *Amanita crocea* (Web 7).

Amanita mairei

Chapéu de 6-10 cm de diâmetro, assume inicialmente um forma convexa, posteriormente plano-convexo e na sua maturidade fica plano. A sua cutícula varia de cor, cinza mais ou menos escuro, coberta por restos brancos da volva. As lâminas são ventrudas, separadas, de brancas a grisalhas. O pé é cilíndrico, um pouco mais largo na base, com uma superfície lisa e finamente escamosa, branco grisalho. A carne é escassa, branca, apresenta um sabor doce e um odor agradável (Gerhardt et al. 2000; Marcote et al., 2008).

Esta espécie não é muito frequente, frutifica na primavera e no outono, cresce em bosques formando pequenos grupos, e também entre estevas (*Cistus ladanifer*).

É um cogumelo comestível mas, é recomendado que seja previamente cozinhada.



Figura 9. *Amanita mairei* (Web 8).

Boletus regius

Apresenta um chapéu de 6-15 cm, no princípio esférico ficando depois aplanado, possui uma cor rosada sobre um fundo rosado pálido, a cutícula apresenta pequenas escamas ou pelos, que geralmente fende. Ostenta tubos e poros de cor amarelo vivo que na sua maturidade escurecem obtendo um tom castanho-esverdeado. O seu pé de 5-15 x 2-6 cm, claviforme e possui um retículo amarelo, A sua carne é amarela com alguma esfumação rosada sob a cutícula e no contacto com o ar mancha-se debilmente de azul e apresenta um cheiro agradável e sabor a avelã. Os esporos são fusiformes (10-15 x 4-6 µm), e tomam um tom pardo-violáceo quando se encontram agrupados.

Esta espécie prefere ambientes quentes surgindo nos finais da primavera e verão. Na

América do Norte, esta espécie geralmente frutifica de agosto a novembro, embora também apareça entre maio e junho. Na América do Norte esta espécie distribui-se pelos estados da Califórnia, Oregon e Washington, onde a sua ocorrência varia bastante. É raro na Europa, e aparece na Lista Vermelha Regional de vários países (Koune, 2001). A espécie também foi registada na China (Chiu, 1948).

É um cogumelo com boa comestibilidade.



Figura 10. *Boletus regius* (Web 9).

Boletus porosporus

O seu chapéu apresenta algumas fissuras e quando totalmente expandido pode atingir até 8 centímetros de diâmetro, possui uma coloração que varia do bege ao castanho. O seu pé é geralmente oliváceo, mais amarelo no ápice, e apresenta contusões castanhas. A carne é amarelo-limão pálido ou amarelo na parte superior, e amarelo no ápice da haste. Os tubos são de 13 a 20 centímetros de comprimento, amarelo limão, inicialmente, mais tarde oliváceo. Os poros (0,2-0,5 mm de diâmetro) são angulares, amarelo-limão, e escurecem mais tarde.

Boletus porosporus aparece ocasionalmente no outono, e cresce individualmente ou em pequenos grupos em bosques mistos de espécies decíduas, particularmente de carvalho. Esta espécie é comum nas zonas temperadas do norte, mas um pouco raro na Europa.

Trata-se de um cogumelo comestível mas, não é muito apreciado quando cozinhado pois, adquire uma textura demasiado mole (Rodríguez, 2012).



Figura 11. *Boletus porosporus* (Web 10).

Gyromitra esculenta

Chapéu tem 6-12 cm de diâmetro e 5-15 (12) cm de altura, é globoso, inchado, irregular, formado por numerosas pregas que lhe conferem um aspeto cerebriforme, apresenta uma cor castanho escuro ou castanho avermelhado, branco na partir inferior onde se une com o pé, e branco na parte interna. O seu pé é curto (2-6 x 1-3 cm), cilíndrico, enrugado, oco, branco, pruinoso e com vários sulcos na base. A sua carna é delgada, frágil, branca ou acinzentada, é inodoro e o seu sabor ténue. Relativamente aos esporos estes são elipsoidais de 15-21 x 7-10 µm.

Gyromitra esculenta desenvolve-se em solos arenosos de floresta temperada de coníferas (sobretudo debaixo de pinheiros (*Pinus* spp.)). O período de apanha estende-se de abril a julho, antes daquele de outras espécies, e o fungo pode até surgir quando a neve derrete. Pode ser abundante em algumas áreas e raro noutras. É mais comumente encontrado em locais onde o solo foi perturbado, como em covas, zonas desmatadas, zonas de escorrência, e bermas de estrada.

Apesar de ser mais abundante nos bosques de coníferas montanos e setentrionais como a Serra Nevada e a Cordilheira das Cascatas no noroeste da América do Norte, esta espécie é encontrada um pouco por todo o continente americano, e para sul até ao México. É também comum na Europa Central, menos abundante a leste, e mais em áreas de montanha que em terras baixas. Está registada a sua ocorrência na Irlanda do Norte, na província de Uşak na Turquia Ocidental (Türkoglu et al., 2008), e na província de Antalya na costa sul da Turquia (Gezer, 2000).

Trata-se de uma espécie controversa pois, é uma espécie comestível apresentando também algumas restrições ao seu consumo. *Gyromitra esculenta* trata-se de um petisco popular na Escandinávia, Europa de Leste, e na região dos Grandes Lagos da América do Norte. Apesar de popular em alguns distritos dos Pireneus orientais, a sua venda é proibida em Espanha. Pode ser vendido fresco na Finlândia, mas tem de ser acompanhado de avisos e instruções sobre a sua correta preparação. Na culinária da Finlândia é consumido em omeletes, sopas, ou salteado.



Figura 12. *Gyromitra esculenta* (Web 11).

Helvella lacunosa

Chapéu trilobado ou em forma de sela de montar, de 2-3 cm de altura, himénio liso e de cor negra, face interna lisa, vincos de cor branco cinzento. O pé de 5 x 2cm cilíndrico, fistuloso, branco, mais escuro na parte superior, com sulcos muito profundos. A sua carne é frágil, esbranquiçada ou acinzentada, o seu odor e sabor não são muito apreciados. Os seus esporos (ascósporos) elipsoidais de 15-20 x 10-11 µm, lisos, com uma grossa gota central e outras mais pequenas.

Surge frequentemente na primavera, outono e inverno. Aparece nos bosques de coníferas e de folhosas, podendo aparecer solitária ou em grupos. Esta espécie é comum no oeste da América do Norte e também é encontrada na Europa (Arora, 1986), no Japão (Nagao, 2002), e na China.

Normalmente surgem no final do verão e no outono, embora tenha sido registada no inverno na Califórnia e também já foi relatada a sua ocorrência em áreas queimadas (Phillips, 2006).

É uma espécie comestível mas, é aconselhável prévia cocção.



Figura 13. *Helvella lacunosa* (Web 12).

Russula aurea

Chapéu de 5-10 cm, de globoso convexo a plano convexo com a presença de uma depressão no centro. Cutícula rugosa, dificilmente separável, com uma cor avermelhado ou vermelho-alaranjado, sendo mais escuro no centro. A margem pode ser um pouco encurvada ou plana, e na sua maturidade torna-se achatada. O seu pé (3-8 x 1,5-3 cm) é cilíndrico, oco, e quando atinge a maturidade torna-se cavernoso, frágil, branco podendo apresentar posteriormente, tonalidades amarelo-limão. A sua carne é sólida, branca e amarelo-limão debaixo da cutícula. Os esporos são amplamente elipsoidais a subglobosos, de 7-10 x 6-8 µm e quando se encontram em conjunto tomam uma cor amarelo-claro. O seu odor não é muito apreciado mas, em contrapartida possui um sabor doce.

Esta espécie frutifica no final do verão e início de outono e preferencialmente tem como habitat bosques com predominância de árvores de folhosas e coníferas.

Russula aurea é uma espécie que pode ser encontrada na América e na Europa sendo rara na Grã-Bretanha. Já foi registada também, em regiões perto do Mar Negro, a leste da Turquia (Yagiz et al., 2006; Sesli, 2007).



Figura 14. *Russula aurea* (Web 13).

Russula virescens

Esta espécie apresenta um chapéu de 5-15 cm, de hemisférico plano e finalmente deprimido. Cutícula medianamente separável, seca, às vezes totalmente branca ou verde-azeitona, na maturidade possui pequenas placas farinhosas mais escuras. As lâminas são bastante apertadas, arqueadas e livres, de tonalidades brancas e creme. O pé de 4-9cm é cilíndrico, atenuado na base, cheio e esponjoso, é branco e pruina na parte superior. A carne é espessa, compacta e firme, tem sabor doce e um cheiro frutado. Os esporos são ovóides (6-10 x 5-7 μm), com pequenas verrugas, amiloides e em conjunto apresentam uma cor branca.

As frutificações da espécie *Russula virescens* podem ser encontradas tanto em florestas caducifólias como em florestas mistas, formando relações simbióticas com uma grande variedade de árvores (Smith et al., 1997), incluindo castanheiros e carvalhos (*Quercus*) e estes corpos de frutificação podem aparecer isoladamente ou em grupos. Na Grã-Bretanha e na Europa, a frutificação ocorre principalmente durante os meses de verão e até ao início do outono (Jordan, 2004). Além de a Grã-Bretanha e na Europa, *Russula virescens* também foi colhido na Malásia (Walting & SuSee, 1998), Coreia (Lee et al., 1986), e na China (Peng et al., 2003).



Figura 15. *Russula virescens* (Web 14).

1.5. Objetivos

No presente trabalho aborda-se a composição em nutrientes e em compostos bioativos de cogumelos silvestres, ainda não caracterizadas na literatura, provenientes do Nordeste de Portugal.

Foram estudadas as seguintes espécies de cogumelos: *Amanita crocea*, *Amanita mairei*, *Boletus porosporus*, *Boletus regius*, *Gyromitra esculenta*, *Helvella lacunosa*, *Russula aurea* e *Russula virescens*.

O valor nutricional foi obtido após determinação da humidade, proteínas, lípidos, glúcidos e cinzas. Os nutrientes analisados foram mono e oligossacáridos (açúcares) e ácidos gordos por HPLC/RI e GC/FID, respetivamente.

Os compostos bioativos analisados foram: os tocoferóis por HPLC-fluorescência; os carotenoides por técnicas espectrofotométricas, os ácidos orgânicos por HPLC-DAD e os compostos fenólicos por HPLC-DAD/MS. As propriedades antioxidantes foram também estudadas através do efeito captador de radicais livres, poder redutor e inibição da peroxidação lipídica.

Capítulo II

2. Material e métodos

2.1. Amostras

Oito espécies de cogumelos silvestres comestíveis (*Amanita crocea*, *Amanita mairei*, *Boletus porosporus*, *Boletus regius*, *Gyromitra esculenta*, *Helvella lacunosa*, *Russula aurea* e *Russula virescens*) foram colhidas em Bragança (Nordeste de Portugal) em diferentes *habitats* (*Castanea sativa*, *Quercus sp.*, *Pinus sp.* e povoamentos mistos), durante a primavera de 2011. Mais informação sobre as espécies mencionadas é disponibilizada na Tabela 1. Recolheram-se três a dez exemplares de cada uma das espécies mencionadas, no estado de maturidade recomendado para consumo.

A identificação taxonómica foi feita de acordo com vários autores (Benguría, 1985; Frade & Alfonso, 2005; Moreno, 2005) e depositaram-se exemplares representativos das diferentes espécies no herbanário da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança. Os restantes exemplares foram liofilizados (FreeZone 4.5, Labconco, Kansas, EUA), reduzidos a pó (20 mesh) e conservados a -20°C até para análise posterior.

Tabela 3. Informação relativa às espécies de cogumelos silvestres comestíveis analisadas.

Nome científico	Habitat	Ecologia	Data de colheita
<i>Amanita crocea</i> (Quél. in Bourd.) Singer ex Singer	Povoamento misto	Micorrízico	maio 2011
<i>Amanita mairei</i> (Foley)	Quercus sp.	Micorrízico	junho 2011
<i>Boletus porosporus</i> (Imler ex Bon & G. Moreno)	<i>Castanea sativa</i>	Micorrízico	setembro 2011
<i>Boletus regius</i> (Krombh.)	Quercus sp.	Micorrízico	maio 2011
<i>Gyromitra esculenta</i> (Pers. ex Pers.) Fr.	Pinus sp.	Micorrízico	abril 2011
<i>Helvella lacunosa</i> (Afzel.)	Povoamento misto	Micorrízico	abril 2011
<i>Russula aurea</i> Pers.	Quercus sp.	Micorrízico	maio 2011
<i>Russula virescens</i> (Schaeff.) Fr.	Quercus sp.	Micorrízico	junho 2011

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 na Sigma (St. Louis, MO, EUA), assim como outros isómeros individuais de ácidos gordos, os padrões de açúcares (D-(-)-frutose, D-(+)-manitol e D-(+)-trealose), de tocoferóis (α -, β -, γ - e δ -isoformas), de ácidos orgânicos (ácido cítrico, ácido málico, ácido oxálico, ácido fumárico, ácido quínico), de compostos fenólicos (crisina, ácido *p*-cumárico, ácido *p*-hidroxibenzóico e ácido protocatéquico), o ácido cinâmico e o trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico). A solução de tocol racémico (50 mg/mL) foi adquirida na Matreya (Chalfont, PA, EUA). O 2-2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) foi obtido na Alfa Aesar (Ward Hill, MA, EUA). Todos os outros produtos químicos foram adquiridos a partir de fontes comuns e eram de grau analítico. A água foi tratada recorrendo a um sistema de purificação de água Mili-Q (TGI Pure Water Systems, EUA).

2.3. Compostos nutricionais

2.3.1 Valor nutricional

A composição proximal das amostras (humidade, proteínas, lípidos, glúcidos e cinzas) foi analisada segundo procedimentos AOAC (AOAC, 1995).

A humidade foi determinada através da diferença entre a massa das amostras frescas e a massa correspondente após secagem. Os resultados foram expressos em mg por 100 g de massa fresca.

O teor de proteínas que as amostras continham foi estimado pelo método macro-Kjeldahl por conversão do azoto total utilizando o fator de correção $N \times 4,38$; os resultados foram expressos em mg por 100 g de massa seca.

Os lípidos foram determinados pela extração de uma massa de amostra conhecida com éter de petróleo, recorrendo a um aparelho de Soxhlet. O solvente orgânico (éter de petróleo) extraiu os lípidos que foram quantificados através da determinação da massa do resíduo que restou após a eliminação do solvente e os resultados foram expressos em g por 100 g de massa seca.

O teor de cinzas foi determinado através da incineração em mufla das amostras (massa conhecida) a $600 \pm 15^\circ\text{C}$. As amostras foram colocadas em cadinhos, previamente calcinados e pesados, os quais permaneceram na mufla até à incineração total da matéria orgânica. A quantidade

de cinzas foi obtida pela diferença de massa inicial e a massa após a incineração e os resultados foram expressos em g por 100 g de massa seca.

Os glúcidos foram calculados por diferença: $100 - (\text{g proteínas} + \text{g lípidos} + \text{g cinzas})$. Os resultados foram expressos em g por 100 g de massa seca.

A contribuição energética das amostras foi calculada de acordo com a seguinte equação: Energia (kcal): $4 \times (\text{g proteínas} + \text{g glúcidos}) + 9 \times (\text{g lípidos})$. Os resultados foram expressos em kcal por 100g de massa seca.

2.3.2 Açúcares

Os açúcares livres foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI), de acordo com o procedimento otimizado por Heleno et al. (2009) e implementado no Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada.

Às amostras liofilizadas (1 g) foi adicionado 1 mL de padrão interno (rafinose, 25 mg/mL) e posteriormente procedeu-se à extração com 40 mL de etanol 80% a 80°C durante 1h30min. De seguida, procedeu-se à filtração e evaporação do etanol (evaporador rotativo Büchi K-210) e o sobrenadante obtido foi lavado três vezes sucessivas com 10 mL de éter etílico. Após concentração a 40°C, o resíduo sólido foi redissolvido em água para um volume final de 5 mL, filtrado (papel de filtro de 0,22 μm da Whatman) para *vials* âmbar e analisado por HPLC-RI; o volume de amostra injetado foi de 10 μL .

O aparelho de HPLC usado integrava uma bomba (Knauer, Smartline System 1000), sistema desgaseificador (Smartline manager 5000), amostrador automático (As-2057 Jasco) e um detetor de índice de refração (Knauer Smartline 2300).

Os resultados obtidos foram analisados segundo o *software* Clarity 2,4 (DataApex). A separação cromatográfica foi conseguida com uma coluna Eurospher 100-5 NH₂ (4,6 \times 250 mm, 5 mm, Knauer) operando a 30°C (forno Grace 7971). A fase móvel usada foi água desionizada/acetoneitrilo, 70:30 (v/v) com um fluxo de 1 mL/min.

Os compostos foram identificados por comparação dos tempos de retenção relativos aos picos das amostras e dos padrões. A quantificação foi baseada no método do padrão interno e, usando também as curvas de calibração obtidas a partir dos padrões comerciais de cada composto. Os resultados foram expressos em g por 100 g de massa seca (dw).

2.3.3 Ácidos gordos

Os ácidos gordos foram determinados, após um procedimento de transesterificação, por cromatografia gasosa com deteção de ionização em chama (GC-FID), de acordo com um procedimento anteriormente descrito (Pereira et al., 2012) e implementado no Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada.

As amostras liofilizadas foram transferidas (massa conhecida) para cartuchos de Soxhlet e extraídas, com éter de petróleo durante pelo menos 7h. Depois de evaporar o solvente, os resíduos obtidos foram submetidos a um processo de derivatização com 5 mL de metanol:ácido sulfúrico:tolueno, 2:1:1 (v/v/v), durante pelo menos 12h, num banho a 50°C e a 160rpm. De seguida adicionaram-se 3 mL de água desionizada, para obter a separação das fases. A mistura dos ésteres metílicos de ácidos gordos foi recuperada com 3 mL de éter etílico em agitação no vórtex e a água foi eliminada com sulfato de sódio anidro.

A amostra foi recuperada para um *vial* com teflon e filtrou-se (filtro de nylon de 0,2 µm Milipore). O perfil dos ácidos gordos foi obtido num GC (DANI 1000) equipado com um injetor *split/splitless*, um detetor de ionização de chama (FID) e uma coluna Macherey Ngel (30 m × 0,32 mm × 0,25 µm). A rampa de temperaturas do forno foi a seguinte: a temperatura inicial da coluna foi de 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 análise injetou-se 0,1 µL de amostra.

Os ácidos gordos foram identificados com base no tempo de retenção relativos aos picos das amostras e dos padrões. Os resultados foram processados recorrendo ao *software* CSW 1,7 (DataApex 1,7) e expressos em percentagem relativa de cada ácido gordo.

2.4 Compostos bioativos

2.4.1 Tocoferóis

Os tocoferóis presentes nas amostras foram determinados de acordo com o procedimento otimizado por Barros et al. (2008) e Heleno et al. (2010), e implementado no Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada.

Antes de se proceder à extração, adicionou-se às amostras 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 liofilizadas (~500 mg) foram homogeneizadas com 4 mL de metanol

num vórtex durante 1min. De seguida, adicionaram-se 4 mL de hexano procedendo-se, posteriormente, a nova homogeneização no vórtex (1 min). Posteriormente, adicionou-se ainda 2 mL de uma solução aquosa saturada de cloreto de sódio, homogeneizou-se no vórtex (1 min), centrifugou-se (centrifuga refrigerada Centurion K240R-2003, 5 min, 4000g) e transferiu-se o sobrenadante para um frasco rodeado de gelo e protegido da luz. As amostras foram re-extraídas mais duas vezes com hexano. Os extratos foram levados à secura recorrendo a uma corrente de azoto, re-dissolvidos em 1 mL de hexano, desidratados com sulfato de sódio anidro, filtrados (filtro de 0,22 μ m), transferidos para *vials* âmbar e analisados por HPLC-fluorescência.

O sistema de HPLC, anteriormente descrito, encontrava-se acoplado a um detetor de fluorescência (FP-2020, Jasco) programado para excitação a 290 nm e emissão a 330 nm. A separação cromatográfica foi feita com uma coluna de poliamida II (250 \times 4,6 mm) de fase normal (YMC Waters) 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 da amostra injetado foi de 20 μ L.

A identificação dos compostos foi feita por comparação cromatográfica dos tempos de retenção das amostras e dos padrões. Para a sua quantificação recorreu-se ao método do padrão interno (tocol), sendo este método baseado na resposta do sinal de fluorescência, e às curvas de calibração obtidas dos padrões comerciais de cada composto. Os resultados foram expressos em μ g por 100 g de amostra seca (dw).

2.4.2 Carotenoides

Os carotenoides β -caroteno e licopeno foram determinados seguindo um procedimento anteriormente descrito por Grangeia et al. (2011). As amostras liofilizadas (500 mg) foram vigorosamente agitadas em 10 mL de uma mistura de acetona:*n*-hexano (4:6, v/v) durante 1 min e, posteriormente filtradas através de papel de filtro Whatman nº4. A absorvância do filtrado foi medida a diferentes comprimentos de onda sendo eles: 453, 505, 645 e 663 nm (espectofotómetro Analytikjena 200). O teor de β -caroteno e licopeno foi calculado de acordo com as seguintes equações:

$$\beta\text{-caroteno (mg/100 mL)} = 0,21 \times A_{663} - 1,220 \times A_{645} - 0,304 \times A_{505} + 0,452 \times A_{453}$$

$$\text{Licopeno (mg/100 mL)} = -0,0458 \times A_{663} + 0,204 \times A_{645} - 0,304 \times A_{505} + 0,452 \times A_{453}$$

e posteriormente convertidos em mg por 100 g de massa seca.

2.4.3 Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos foram determinados seguindo o procedimento otimizado por Barros et al. (2012) e implementado no Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada.

As amostras liofilizadas (2 g) foram extraídas, com agitação, em 25 mL de ácido *meta*-fosfórico (25°C a 150 rpm) durante 45 min e, posteriormente, filtradas (papel de filtro Whatman nº 4 e, antes da análise em filtros de nylon de 0,2 µm).

A análise foi realizada por cromatografia líquida ultra rápida (UFLC; Shimadzu série 20A) acoplada a um detetor de fotodíodos (PDA).

A separação cromatográfica foi efetuada numa coluna C18 SphereClone (Phenomenex) em fase reversa (5 µm, 250 mm × 4.6 mm i.d) a 35 °C. A fase móvel utilizada foi ácido sulfúrico 3,6 mM com um fluxo de 0,8 mL/min. A deteção foi feita por PDA, usando 215 nm e 245 nm (para o ácido ascórbico) como comprimentos de onda preferenciais.

Os ácidos orgânicos presentes foram quantificados por comparação da área dos picos registados a 215 nm com as curvas de calibração obtidas a partir de padrões comerciais de cada composto. Os resultados foram expressos em mg por 100 g de massa seca (dw).

2.4.4 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos foram analisados de acordo com o procedimento descrito por Barros et al. (2009) e Vaz et al. (2011) e implementado pelo Grupo de Investigação em Polifenóis da Faculdade de Farmácia de Salamanca.

As amostras liofilizadas (1 g) foram extraídas com 30 mL de metanol:água 80:20 (v/v) à temperatura ambiente e agitação a 150 rpm durante 1h. Seguiu-se um passo de filtração (papel de filtro Whatman nº4) e o resíduo foi re-extraído duas vezes com porções adicionais de 30 mL de metanol:água 80:20 (v/v). Os extratos combinados foram evaporados a 35°C para remover o metanol. A fase aquosa foi liofilizada, re-dissolvida numa solução de metanol 20% (solução de concentração final igual a 5 mg/mL) e filtrada (filtro de 0,22 µm).

Os compostos fenólicos foram determinados por HPLC (Hewlett- Packard 1100, Agilent Technologies). Realizou-se uma deteção dupla *online* num detetor de díodos (DAD) a 280 nm e 370 nm como comprimentos de onda preferenciais, e no espectrómetro de massa (API 3200 Qtrap, Applied Biosystems) conectado ao sistema de HPLC.

Os compostos fenólicos presentes nas amostras foram caracterizados de acordo com o seu espectro UV, espectro de massa e tempo de retenção, em comparação com padrões quando disponíveis.

Para a análise quantitativa foram preparadas curvas de calibração de diferentes padrões. Os resultados foram expressos em mg por 100 g de massa seca (dw).

2.5. Atividade antioxidante

2.5.1 Preparação dos extratos e considerações gerais

As amostras liofilizadas (1 g) foram submetidas a uma extração sólido-líquido por agitação com 40 mL de metanol (25°C, a 150 rpm durante 1h) e posteriormente, filtradas (papel de filtro Whatman nº4). O resíduo obtido foi re-extraído com uma porção adicional de metanol. Os extratos metanólicos combinados foram evaporados a pressão reduzida e re-dissolvidos em metanol a fim de obter uma concentração final de 20 mg/mL (solução *stock*). Foram efetuadas diluições sucessivas a partir da solução *stock*, com o objetivo de obter soluções de diferentes concentrações (10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,15625 mg/mL) a fim de as submeter a testes *in vitro* (Grangeia et al., 2011; Pereira et al., 2012) para avaliar as suas propriedades antioxidantes.

As concentrações de extrato que fornecem 50% da atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância (EC₅₀) foram calculadas a partir dos gráficos das percentagens da atividade antioxidante (ensaios de DPPH, β-Caroteno/linoleato e TBARS) ou da absorvância a 690 nm (ensaio do poder redutor) em função da concentração do extrato. O padrão utilizado foi o trolox.

2.5.2 Ensaio *Folin-Ciocalteu*

Uma das soluções dos extratos (5 mg/mL) foi misturada com o reagente *Folin-Ciocalteu* (5 mL previamente diluído em água, 1:10, v/v) e carbonato de sódio (75 g/L, 4mL). Os tubos foram agitados no vórtex durante 15 s e deixou-se repousar durante 30 min a 40°C para o desenvolvimento da cor. A absorvância foi medida a 765 nm.

O ácido gálico foi usado para obtenção da curva padrão (0,0094-0,15 mg/mL) e a redução do reagente *Folin-Ciocalteu* pelas amostras foi expressa em mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por g de extrato.

2.5.2.1 Fundamento teórico:

O método colorimétrico *Folin-Ciocalteu* é um dos métodos de avaliação da quantidade de fenóis totais presentes numa amostra. Este é um teste amplamente usado em investigação, porém não é isento de interferências e, na realidade, não é específico para fenóis (Kellie et al., 2002) sendo também considerado um ensaio indicador do poder redutor e, portanto, da atividade antioxidante.

Isto deve-se ao facto do reagente conter uma mistura de ácido fosfotúngstico e ácido fosfomolibdico que reage tanto com compostos fenólicos como com compostos não-fenólicos (aminoácidos e açúcares), levando muitas vezes a falsos positivos e a uma sobreavaliação de compostos fenólicos.

Os fenóis determinados por este método são expressos em equivalentes de ácido gálico (Oliveira et al., 2008). Quimicamente, ambos os ácidos que constituem o reagente de *Folin-Ciocalteu* são oxidados em meio alcalino, formando O_2 , que posteriormente reage com o molibdato dando origem a óxido de molibdénio (MoO^{4+}), composto este que possui uma absorvância bastante elevada ao comprimento de onda de 750 nm (Molyneux, 2004).

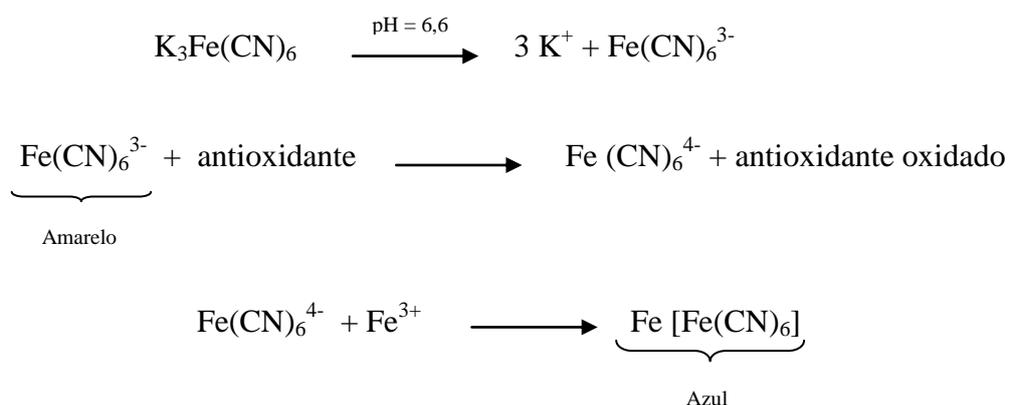
2.5.3 Ensaio do ferricianeto/azul da Prússia

As soluções de extrato com diferentes concentrações (0,5 mL) foram misturadas em 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 e, de seguida, adicionou-se ácido tricloroacético (10% w/v; 0,5mL). A mistura (0,8 mL) foi colocada em microplacas de 48 poços, assim como água desionizada (0,8 mL) e cloreto de ferro (0,1% w/v; 0,16 mL). Posteriormente, a absorvância foi lida a 690 nm num leitor de microplacas ELX800 (Biotek, Instruments Inc). O poder redutor foi obtido através das absorvâncias lidas.

2.5.3.1 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 espectralmente.

A química destes ensaios pode ser resumida nas seguintes equações:



2.5.4 Ensaio da atividade captadora de radicais DPPH

Esta metodologia foi realizada recorrendo ao leitor de microplacas mencionado anteriormente, mas em microplacas de 96 poços. A mistura de reação em cada um dos poços consistia em: soluções dos extratos com diferentes concentrações (30 μL) e solução metanólica contendo radicais DPPH (6×10^{-5} mol/L, 270 μL).

A mistura foi mantida em repouso e ao abrigo da luz durante 60 min, para a estabilização dos valores de absorvância, sendo avaliada posteriormente a redução do radical DPPH pela medição da absorvância a 515nm.

A atividade captadora de radicais livres (RSA) foi calculada como uma percentagem de descoloração de DPPH usando a seguinte equação:

$$\% \text{ RSA} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{S}}) / A_{\text{DPPH}}] \times 100$$

Nesta equação, A_{S} corresponde à absorvância da solução que contém a amostra e A_{DPPH} é a absorvância da solução de DPPH.

2.5.4.1 Fundamento teórico:

O método do DPPH consiste em utilizar um radical livre de DPPH, que vai ser reduzido ao entrar em contacto com uma outra substância, o antioxidante, que doa um hidrogénio ao DPPH, fazendo com que este deixe de ser um radical e passe a ser uma molécula estável.

O que acontece durante o método do DPPH está seguidamente representado:

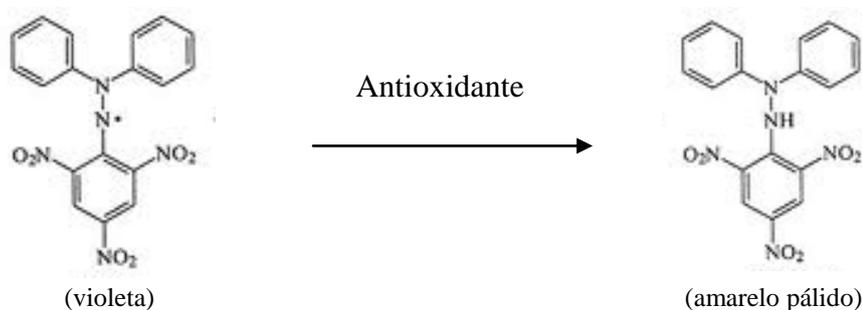


Figura 16. Redução do DPPH.

Após o contacto entre o DPPH e a outra substância, nota-se uma descoloração no DPPH que passa de violeta a um tom amarelado, sendo que quanto maior for o efeito antioxidante, mais rapidamente se dá a alteração na cor.

2.5.5 Ensaio do β -caroteno/linoleato

A solução de β -Caroteno foi preparada dissolvendo este composto (2 mg) em clorofórmio (10 mL). Dois mililitros desta solução foram pipetados para um balão de fundo redondo. O clorofórmio foi removido a 40°C sob vácuo e posteriormente adicionou-se ácido linoleico (40 mg), emulsificante Tween 80 (400 mg) e água destilada (100 mL) agitando vigorosamente.

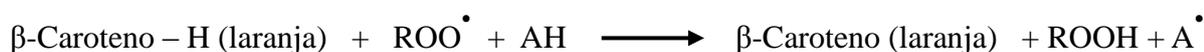
Alíquotas (4,8 mL) da emulsão foram transferidas para tubos contendo as soluções de extrato com diferentes concentrações (0,2 mL). Os tubos foram agitados e incubados a 50°C em banho-maria. Assim que a emulsão foi adicionada a cada tubo, foi medida a absorvância a 470 nm, sendo esta medição designada de absorvância de tempo zero (0). Posteriormente, os tubos foram mantidos a 80°C durante 2h e foi medida novamente a absorvância a 470 nm sendo esta designada de absorvância do tempo um (1).

A inibição da descoloração do β -caroteno foi calculada utilizando a equação: (conteúdo de β -caroteno após 2h do ensaio (tempo 1)/ conteúdo inicial de β -caroteno(tempo 0)) \times 100.

2.5.5.1 Fundamento teórico:

O ensaio da descoloração do β -caroteno baseia-se em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do β -caroteno e avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico através da leitura da absorvância a 470 nm.

O mecanismo de reação 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 & Geetha, 2006), de acordo com as seguintes equações:



2.5.6 Ensaio TBARS

Para a realização deste ensaio, foi utilizado tecido cerebral de porco (*Sus scrofa*), obtido a partir de animais de abate oficial. Este tecido foi dissecado e homogeneizado em gelo com tampão Tris-HCl (20mM, pH 7,4) para produzir um homogeneizado cerebral que foi centrifugado a 3000g durante 10 min.

Uma alíquota (100 µL) do sobrenadante foi incubada com diferentes concentrações das soluções de extratos (200 µL) na presença de sulfato de ferro (10 mM, 100 µL) e ácido ascórbico (0,1 mM; 100 µL) a 37°C durante 1h. A reação foi parada com a adição do ácido tricloroacético (28% w/v, 500 µL) seguindo-se a adição do ácido tiobarbitúrico (TBA, 2% w/v, 380 µL) e a mistura foi submetida a 80°C durante 20 min. Após centrifugação a 3000g durante 10 min, para a remoção do precipitado de proteínas, a intensidade da cor do complexo malondialdeído (MDA)-TBA do sobrenadante foi medida através da leitura da sua absorvância a 532 nm. Foi preparado um tubo de controlo com tampão Tris-HCl em vez de solução de extrato.

A percentagem de inibição de peroxidação lipídica (%) foi avaliada pela inibição da formação de TBARS (substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico) e calculada segundo a fórmula:

Inibição (%) = $[(A-B)/A] \times 100\%$, onde A e B correspondem à absorvância de controlo e da solução da amostra, respetivamente.

2.5.6.1 Fundamento teórico:

O ácido tiobarbitúrico (TBA) e o malondialdeído (MDA) costumam ser utilizados como biomarcadores da peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica pode ser determinada pela medição dos produtos de oxidação que reagem com o TBA para formar compostos de cor rosa, genericamente designados como substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Figura 17), que são medidas por espectrofotometria a 532 nm (Ng et al., 2000; Kaur et al., 2006).

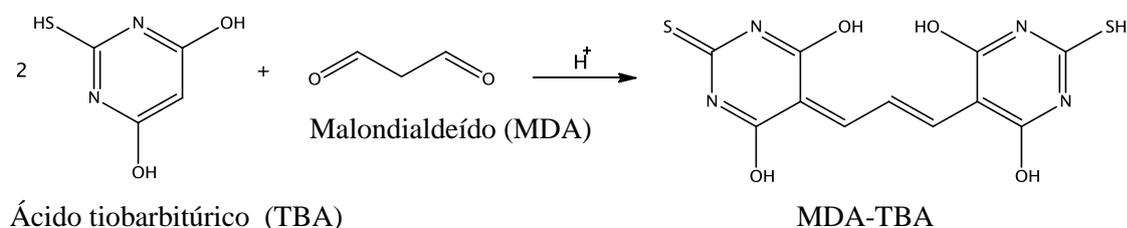


Figura 17. Reação envolvida no ensaio TBARS.

O TBA em associação com o MDA, na presença de iões H^+ , forma um cromogéneo (MDA-TBA). Existem dois passos essenciais nesta reação, em primeiro lugar, a solução contendo o antioxidante é oxidada devido à adição de um ião metálico, tal como o ferro ou o cobre; posteriormente, a extensão desta oxidação é ditada pelo ácido tiobarbitúrico, sendo que uma solução contendo um antioxidante irá travar a oxidação (Antolovich et al., 2002).

2.6. Análise estatística

Para cada uma das espécies foram utilizadas 3 amostras e todos os ensaios foram efetuados em triplicado. Os resultados foram expressos em valores médios \pm desvio padrão (SD) e, foram analisados através da análise de variância (ANOVA) seguida de um teste de *Tukey's* HSD com $\alpha=0,05$. Este tratamento foi efetuado recorrendo ao programa SPSS v.18.0.

Capítulo III

3. Resultados

3.1. Valor nutricional dos cogumelos em estudo

Os resultados relativos à composição nutricional dos cogumelos silvestres comestíveis em estudo são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Valor nutricional e compostos nutricionais dos cogumelos silvestres comestíveis estudados (valor médio \pm desvio padrão).

	<i>Amanita crocea</i>	<i>Amanita mairei</i>	<i>Boletus porosporus</i>	<i>Boletus Regius</i>	<i>Gyromitra esculenta</i>	<i>Helvella lacunosa</i>	<i>Russula aurea</i>	<i>Russula virescens</i>
Humidade(g/100 g fw)	89,04 \pm 0,00 a	76,82 \pm 8,50 ba	65,57 \pm 7,94 b	79,15 \pm 9,43 ba	85,68 \pm 8,39 ba	82,37 \pm 3,43 ba	79,99 \pm 9,13 ba	92,49 \pm 4,81 a
Cinzas (g/100 g dw)	25,73 \pm 1,75 b	11,21 \pm 0,09 d	4,20 \pm 0,05 e	4,40 \pm 0,29 e	32,10 \pm 3,55 a	21,70 \pm 1,10 c	12,75 \pm 0,38 d	11,04 \pm 0,19 d
Glúcidos (g/100 g dw)	49,64 \pm 1,34 e	62,75 \pm 0,74 d	79,11 \pm 1,82 b	88,79 \pm 0,44 a	52,43 \pm 2,22 e	71,50 \pm 1,02 c	75,68 \pm 0,79 b	62,27 \pm 0,83 d
Proteínas (g/100 g dw)	20,02 \pm 1,33 ba	17,74 \pm 0,79 bc	15,74 \pm 1,78 dc	5,22 \pm 0,22 f	14,74 \pm 0,79 d	4,40 \pm 0,36 f	10,33 \pm 10,33 e	21,85 \pm 0,79 a
Lípidos (g/100 g dw)	4,62 \pm 0,16 b	8,30 \pm 0,00 a	0,96 \pm 0,06 g	1,59 \pm 0,11 e	0,73 \pm 0,01 h	2,40 \pm 0,01 c	1,24 \pm 0,02 f	1,85 \pm 0,09 d
Energia (kcal/100 g dw)	320,19 \pm 4,39 c	396,67 \pm 0,26 a	388,00 \pm 0,09 a	390,36 \pm 0,42 a	275,23 \pm 10,07 d	325,21 \pm 3,05 c	355,18 \pm 1,01 b	365,09 \pm 0,87 b
Frutose (g/100 g dw)	nd	nd	19,94 \pm 0,10 a	14,04 \pm 0,72 b	nd	nd	nd	nd
Manitol (g/100 g dw)	3,57 \pm 0,33 e	1,47 \pm 0,05 f	19,33 \pm 0,90 a	6,25 \pm 0,35 d	4,17 \pm 0,21 e	4,13 \pm 0,69 e	9,56 \pm 0,14 c	10,90 \pm 0,13 b
Trealose (g/100 g dw)	4,54 \pm 0,37 a	1,31 \pm 0,05 c	1,99 \pm 0,01 b	0,66 \pm 0,03 d	1,96 \pm 0,04 b	0,23 \pm 0,07 e	2,29 \pm 0,33 b	0,20 \pm 0,01 e
Açúcares totais (g/100 g dw)	8,11 \pm 0,69 d	2,78 \pm 0,00 g	41,26 \pm 1,00 a	20,95 \pm 1,04 b	6,13 \pm 0,24 e	4,36 \pm 0,62 f	11,85 \pm 0,19 c	11,10 \pm 0,13 c
C16:0	17,66 \pm 1,21 c	18,08 \pm 0,11 c	15,32 \pm 0,36 d	15,94 \pm 0,83 d	19,29 \pm 0,16 b	29,05 \pm 0,06 a	9,28 \pm 0,14 e	17,31 \pm 0,19 c
C18:0	3,68 \pm 0,23 c	3,47 \pm 0,02 c	2,93 \pm 0,17 c	1,63 \pm 0,03 d	1,64 \pm 0,01 d	5,51 \pm 0,03 b	5,29 \pm 1,24 b	7,16 \pm 0,12 a
C18:1n9	54,46 \pm 0,65 a	53,02 \pm 0,12 a	34,02 \pm 0,06 d	21,84 \pm 0,45 e	13,44 \pm 0,06 f	43,82 \pm 0,03 b	40,63 \pm 2,42 c	40,27 \pm 0,04 c
C18:2n6	20,14 \pm 0,08 d	22,02 \pm 0,04 d	41,90 \pm 0,67 b	56,11 \pm 0,60 a	55,30 \pm 0,24 a	12,21 \pm 0,14 e	40,32 \pm 3,31 b	29,18 \pm 0,04 c
SFA (percentagem relativa)	24,21 \pm 0,59 d	23,64 \pm 0,15 d	21,54 \pm 0,58 e	19,50 \pm 0,93 f	25,76 \pm 0,21 c	39,87 \pm 1,16 a	17,25 \pm 1,02 g	28,78 \pm 0,08 b
MUFA (percentagem relativa)	55,42 \pm 0,65 a	53,94 \pm 0,11 a	36,31 \pm 0,06 d	23,96 \pm 0,30 e	17,86 \pm 0,01 f	46,44 \pm 0,04 b	42,09 \pm 2,45 c	41,51 \pm 0,01 c
PUFA (percentagem relativa)	20,37 \pm 0,06 d	22,42 \pm 0,04 d	42,15 \pm 0,64 b	56,55 \pm 0,64 a	56,38 \pm 0,22 a	13,70 \pm 1,12 e	40,66 \pm 3,46 b	29,71 \pm 0,09 c

nd- não detetado. fw- massa fresca; dw- massa seca. Em cada linha, letras diferentes significam diferenças significativas entre espécies ($p < 0.05$). 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 relativa. A diferença para 100% corresponde a outros ácidos gordos menos abundantes (resultados não apresentados).

O teor em água variou entre 65,57 g/100 g de massa seca na espécie *Boletus porosporus* e 92,49 g/100 g de massa seca na espécie *Russula virescens* que também apresentou o teor proteico mais elevado (21,85 g/100g de massa seca). A espécie *Gyromitra esculenta* revelou conter o maior teor de cinzas (32,10g/100 g de massa seca). Por outro lado, este cogumelo mostrou ter o teor mais baixo em lípidos (0,73 g/100 g de massa seca) e a menor contribuição energética (275,23 kcal/100 g de massa seca) enquanto que a espécie *Amanita mairei* apresentou o teor mais elevado (8,30 g/100 g de massa seca).

Os glúcidos foram os macronutrientes mais abundantes e os níveis mais altos foram detetados na espécie *Boletus regius* (88,79 g/100 g de massa seca). O manitol e a trealose foram os açúcares mais abundantes nas espécies estudadas (Tabela 4) mas, só as espécies *Boletus* (*B. porosporus* e *B. regius*) apresentaram frutose (Figura 18). A espécie *Boletus porosporus* revelou a maior concentração de açúcares totais (41,26 g/100 g de massa seca), com a maior concentração em frutose e manitol (~20 g/100 g de massa seca, cada).

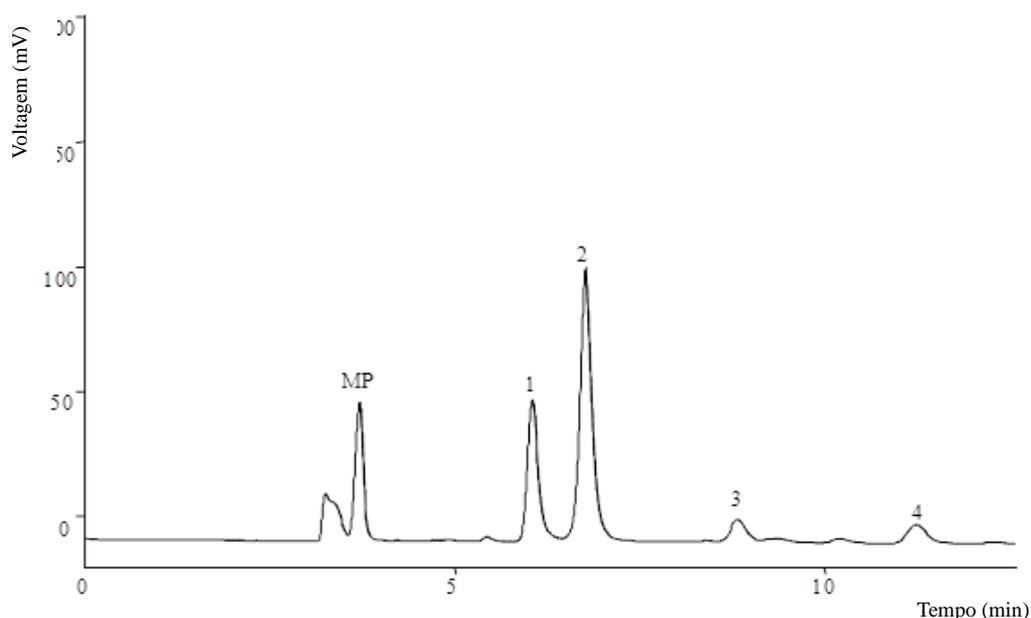


Figura 18. Cromatograma individual do perfil de açúcares da espécie *Boletus regius*: 1-frutose; 2-Manitol; 3-trealose; 4-rafinose.

Os resultados relativos à composição individual dos principais ácidos gordos das espécies de cogumelos silvestres estudadas, bem como as percentagens de ácidos gordos saturados (SFA), ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) e ácidos gordos polinsaturados (PUFA) são apresentados

na Tabela 4. Foi detetada uma totalidade de 23 ácidos gordos em quase todas as amostras (ver exemplo na Figura 19). O principal ácido gordo encontrado foi o ácido oleico (C18:1n9) (predomínio de MUFA), exceto para as espécies *Boletus* e *Gyromitra esculenta* nas quais predominou o ácido linoleico (C18:2n6), contribuindo para a prevalência de PUFA nestas espécies.

As espécies estudadas revelaram também a presença de ácido palmítico como sendo um dos principais ácidos gordos. *Boletus regius* e *Gyromitra esculenta* apresentaram o maior teor de PUFA (~56%), enquanto as espécies *Amanita* apresentaram o maior teor de MUFA (~54%).

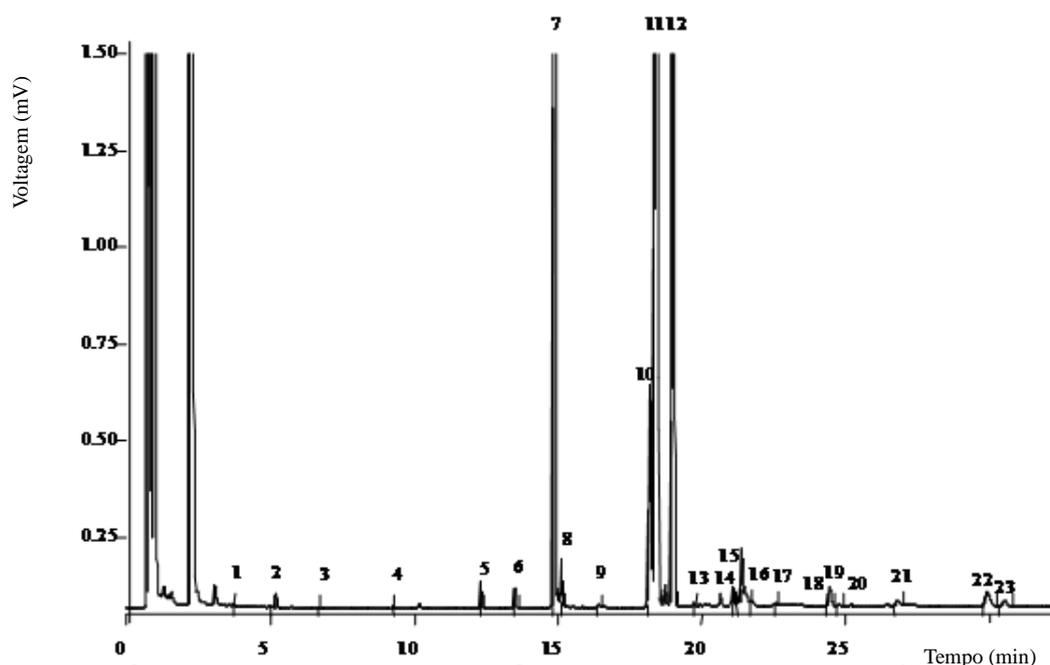


Figura 19. Cromatograma individual do perfil de ácidos gordos da espécie *Russula aurea* (1- Ácido caproico (C6:0); 2- Ácido caprílico (C8:0); 3- Ácido cáprico (C10:0); 4- Ácido láurico (C12:0); 5-Ácido mirístico (C14:0); 6-Ácido pentadecanoico (C15:0); 7-Ácido palmítico (C16:0); 8-Ácido palmitoleico (C16:1); 9-Ácido heptadecanoico (C17:0); 10- Ácido esteárico (C18:0); 11- Ácido oleico (C18:1n9c); 12- Ácido linoleico (C18:2n6c); 13-Ácido α -linolénico(C18:3n3); 14- Ácido araquidónico (C20:0); 15-Ácido *cis*-11-eicosenoico (C20:1c); 16-Ácido *cis*-11,14- eicosenoico (C20:2c); 17- Ácido *cis*-11,14,17-eicosatrienoico e Ácido heneicosenoico (C20:3n3+C21:0); 18-Ácido *cis*-5,8,11,14,17- eicosapentaenoico(C20:5n3); 19- Ácido erúcico (C22:1n9); 20- Ácido beénico (C22:0); 21-Ácido tricosanoico (C23:0); 22-Ácido lignocérico (C24:0); 23- Ácido nervónico (C24:1).

2.2. Bioatividade dos cogumelos em estudo

Foram determinados compostos bioativos, tais como, tocoferóis, carotenoides, ácidos orgânicos e compostos fenólicos e os resultados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Compostos bioativos dos cogumelos silvestres comestíveis estudados (valor médio \pm desvio padrão)

	<i>Amanita crocea</i>	<i>Amanita mairei</i>	<i>Boletus porosporus</i>	<i>Boletus regius</i>	<i>Gyromitra esculenta</i>	<i>Helvella lacunosa</i>	<i>Russula aurea</i>	<i>Russula virescens</i>
α -Tocoferol	30,57 \pm 5,65 b	21,40 \pm 4,23 b	4,99 \pm 0,79 b	360,73 \pm 14,52 a	2,19 \pm 0,35 b	1,38 \pm 0,51 b	7,39 \pm 0,51 b	20,00 \pm 0,31 b
β - Tocoferol	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	21,30 \pm 2,43 a
γ - Tocoferol	131,62 \pm 8,16 b	37,19 \pm 2,55c	23,05 \pm 2,16 c	403,07 \pm 4,98 a	11,51 \pm 2,11c	nd	15,39 \pm 1,42 c	8,00 \pm 0,83 c
δ - Tocoferol	nd	nd	nd	nd	99,07 \pm 10,68 a	15,09 \pm 3,15 b	nd	nd
Tocoferóis totais (μ g/100 g dw)	162,19 \pm 2,51 b	58,59 \pm 1,68 cd	28,04 \pm 2,96 d	763,80 \pm 19,50 a	112,83 \pm 8,92 cb	16,47 \pm 2,64d	22,78 \pm 2,27d	49,30 \pm 1,91 cd
β -caroteno (mg/100g dw)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Licopeno (mg/100 g dw)	0,23 \pm 0,00 c	0,11 \pm 0,00 f	0,04 \pm 0,00 g	0,17 \pm 0,00 e	0,43 \pm 0,00 b	0,53 \pm 0,01 a	0,05 \pm 0,00 g	0,19 \pm 0,00 d
Ácido oxálico	0,28 \pm 0,01 d	0,26 \pm 0,00 d	0,34 \pm 0,03 d	0,17 \pm 0,03 ef	0,13 \pm 0,03 f	2,98 \pm 0,11 a	1,09 \pm 0,05 b	0,78 \pm 0,00 c
Ácido quínico	0,23 \pm 0,01 c	nd	1,93 \pm 0,16 a	0,18 \pm 0,02 c	1,43 \pm 0,20 b	0,24 \pm 0,04 c	nd	nd
Ácido málico	0,94 \pm 0,00 d	nd	nd	nd	0,69 \pm 0,10 d	1,96 \pm 0,39 c	4,53 \pm 0,75 a	2,71 \pm 0,04 b
Ácido cítrico	2,07 \pm 0,21 c	2,63 \pm 0,19 b	0,21 \pm 0,02 f	3,32 \pm 0,23 a	1,46 \pm 0,02 d	1,42 \pm 0,13 d	1,20 \pm 0,08 d	0,55 \pm 0,00 e
Ácido fumárico	0,33 \pm 0,01 b	0,30 \pm 0,02 c	0,07 \pm 0,00 e	0,07 \pm 0,00 e	0,36 \pm 0,03 ba	0,33 \pm 0,02 b	0,38 \pm 0,01 a	0,23 \pm 0,01 d
Ácidos orgânicos totais (g/100 g dw)	3,86 \pm 0,21 cb	3,19 \pm 0,19 cd	2,56 \pm 0,16 d	3,74 \pm 0,23 cb	4,06 \pm 0,37 b	6,93 \pm 0,36 a	7,19 \pm 0,71 a	4,26 \pm 0,03 b
Ácido protocatéquico	21,33 \pm 1,46 a	nd	nd	1,15 \pm 0,18 c	3,74 \pm 0,26 b	0,77 \pm 0,00 cd	nd	nd
Ácido <i>p</i> -hidroxilbenzoico	0,74 \pm 0,08 c	5,94 \pm 0,65 b	0,31 \pm 0,05 c	1,77 \pm 0,23 c	nd	0,13 \pm 0,01 c	1,02 \pm 0,23 c	22,59 \pm 4,24 a
Ácido <i>p</i> -cumárico	nd	nd	nd	2,08 \pm 0,27 a	nd	0,17 \pm 0,00 b	nd	nd
Derivado de crisina 1	nd	nd	nd	11,16 \pm 0,54	nd	nd	nd	nd
Derivado de crisina 2	nd	nd	nd	7,33 \pm 0,06	nd	nd	nd	nd
Compostos fenólicos totais (mg/100 g dw)	22,07 \pm 1,54 a	5,94 \pm 0,65 b	0,31 \pm 0,05 d	23,49 \pm 0,38 a	3,74 \pm 0,26 bc	1,07 \pm 0,00 cd	1,02 \pm 0,26 cd	22,59 \pm 4,24 a
Ácido cinâmico	tr	6,87 \pm 0,03 c	tr	6,05 \pm 0,57 d	tr	nd	17,15 \pm 0,33 a	15,75 \pm 0,54 b

nd- não detetado; dw- massa seca; tr- traços. Em cada linha, letras diferentes significam diferenças significativas entre espécies ($p < 0.05$).

Os tocoferóis foram encontrados em todas as espécies estudadas sendo mais abundantes na espécie *Boletus regius* (763,80 $\mu\text{g}/100$ g de massa seca), que também apresentou maior concentração de α -tocoferol (360,73 $\mu\text{g}/100$ g de massa seca) e γ -tocoferol (403,07 $\mu\text{g}/100$ g de massa seca). O perfil de tocoferóis da espécie mencionada pode ser observado na Figura 20.

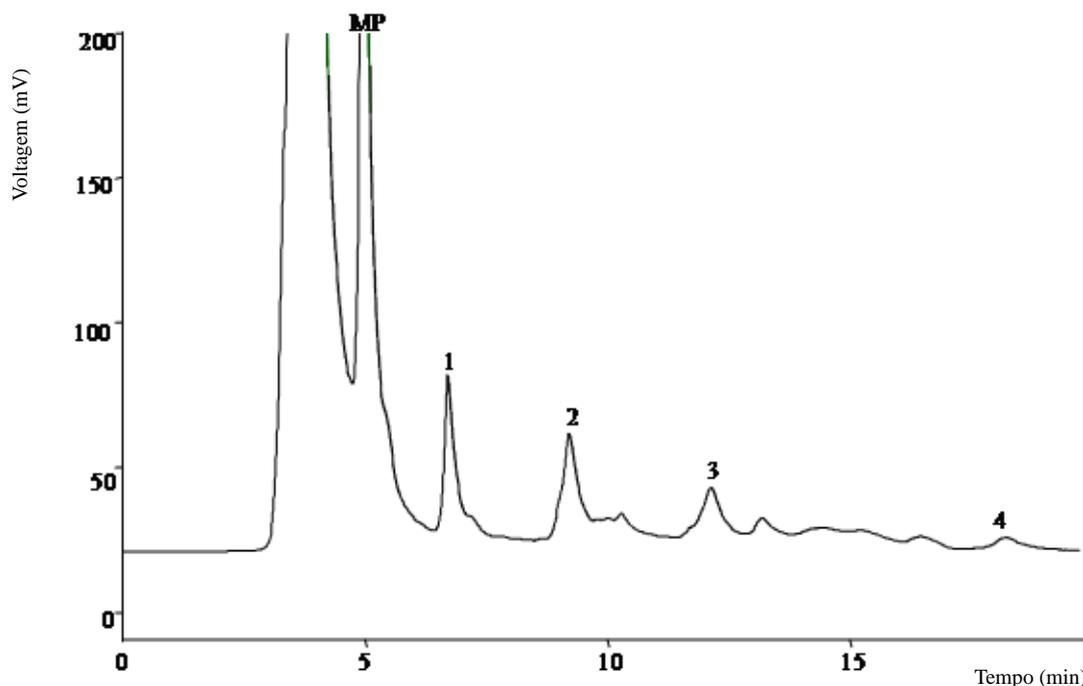


Figura 20. Cromatograma individual do perfil de tocoferóis da espécie *Boletus regius*: 1- α -tocoferol; 2-BHT; 3- γ -tocoferol.

Russula virescens foi a única espécie que demonstrou a presença de β -tocoferol (21,30 $\mu\text{g}/100$ g de massa seca), enquanto que as espécies *Gyromitra esculenta* e *Helvella lacunosa* foram as únicas a apresentar δ -tocoferol (99,07 $\mu\text{g}/100$ g de massa seca e 15,09 $\mu\text{g}/100$ g de massa seca, respetivamente).

O composto β -caroteno não foi detetado em nenhuma das espécies estudadas, no entanto, encontrou-se licopeno em todas as amostras, sendo *Helvella lacunosa* a espécie a apresentar maior teor deste carotenoide (0,53 mg/100 g de massa seca).

Na Tabela 5 apresentam-se os resultados relativos à composição em ácidos orgânicos e a Figura 21 é representativa do perfil de ácidos orgânicos obtidos para a espécie *Gyromitra esculenta*.

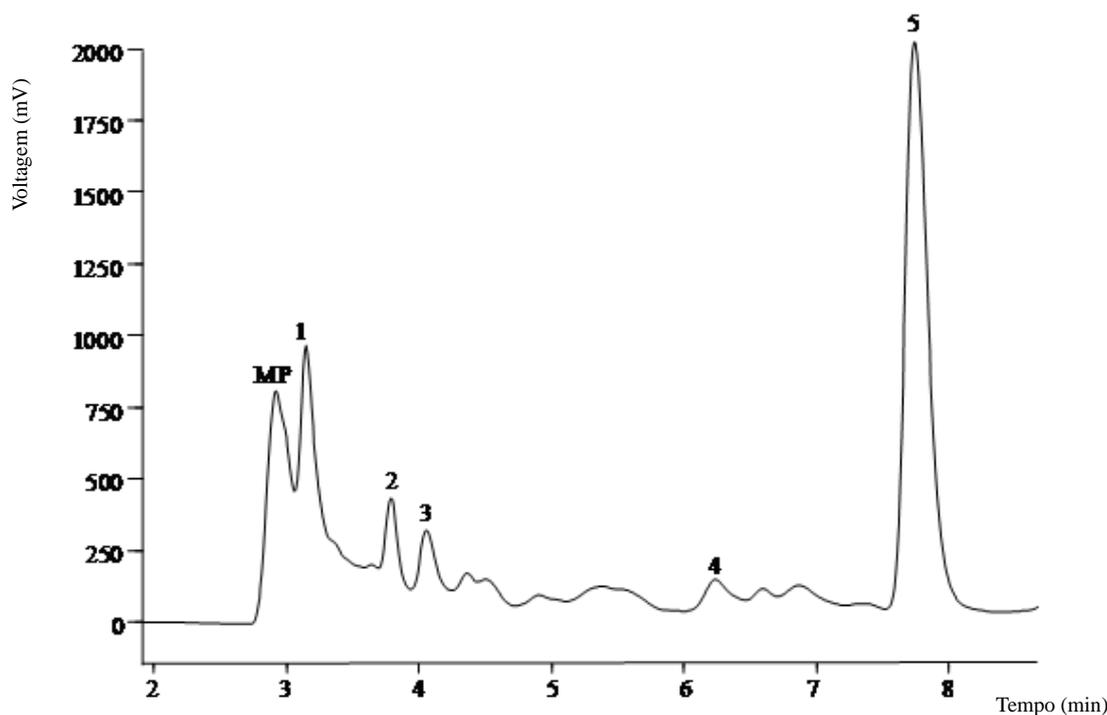


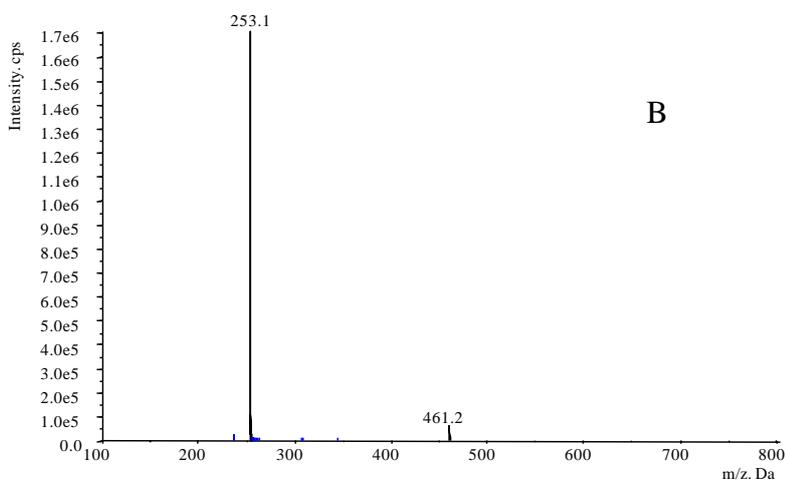
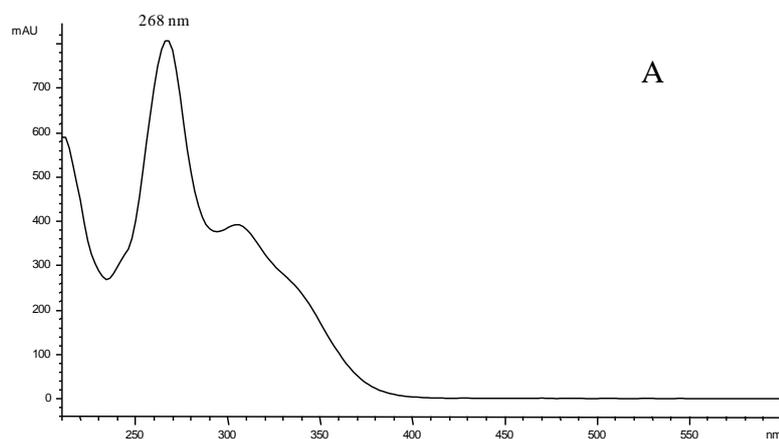
Figura 21. Cromatograma individual do perfil dos ácidos orgânicos da espécie *Gyromitra esculenta*: 1-ácido oxálico; 2-ácido quínico; 3-ácido málico; 4-ácido cítrico ; 5-ácido fumárico.

As espécies *Helvella lacunosa* e *Russula aurea* revelaram a maior concentração destes ácidos (6,93 e 7,19 g/100 g de massa seca, respetivamente) sendo que no primeiro caso (*Helvella lacunosa*) também se verificou predominância de ácido oxálico (2,98 µg/100 g de massa seca) e, no segundo caso (*Russula aurea*) do ácido málico (4,53 g/100 g de massa seca) e do ácido fumárico (0,38 g/100 g de massa seca).

Os níveis mais elevados referentes ao ácido quínico e ácido cítrico foram encontrados em *Boletus porosporus* (1,93 g/100 g de massa seca) e *Boletus regius* (3,32 g/100 g de massa seca) (Tabela 5). O ácido cítrico foi o ácido orgânico mais abundante em metade das espécies, o ácido quínico predominou na espécie *Boletus porosporus*, o ácido oxálico foi o mais abundante em *Helvella lacunosa* e o ácido málico foi o composto maioritário nas espécies *Russula*.

Os resultados da composição dos cogumelos estudados em compostos fenólicos são apresentados na Tabela 5.

Foram encontrados ácidos fenólicos (ácidos protocatéquico, *p*-hidroxibenzoico e *p*-cumárico) e um composto relacionado (ácido cinâmico) nas espécies estudadas. *Boletus regius* revelou o conteúdo mais elevado em compostos fenólicos ($23,49 \pm 0,38$ mg/100 g de massa seca), principalmente, devido à presença de dois possíveis flavonoides, tentativamente identificados como derivados de crisina 1 (hexósido de crisina) e 2 ($11,16 \pm 0,54$ e $7,33 \pm 0,06$ mg/100 g de massa seca, respetivamente). Estes dois compostos foram eluídos a diferentes tempos de retenção (24,9 min e 27,3 min) mas, apresentaram um espectro UV idêntico com comprimento de onda máximo a 268 nm (Figura 22A) e apresentaram nos seus espectros de massa sinal maioritário de *m/z* 253 (Figura 22B), ambos similares a um padrão de crisina (Figura 23).



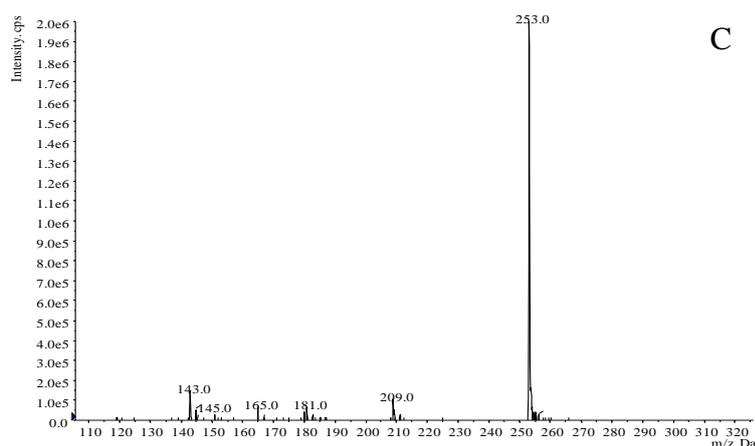


Figura 22. Espectro de absorção (A) e de massa (B) do derivado 1 da crisina e espectro de massa do derivado 2 da crisina (C) presentes na espécie *Boletus regius*. Este último espectro obtido foi semelhante ao de um padrão de crisina

No espectro de massa do derivado 1 apareceu também um outro sinal maioritário a 461 (m/z) (Figura 22B) que poderia ser interpretado como estando relacionado com o ião pseudo molecular (M-H)⁻ do composto.

Este ião, 208 u.m. superior à crisina (m/z a 253), pode corresponder a um hexoxil e a uma molécula de ácido fórmico (162 + 46 u.m., respetivamente), o que sugere que este composto possa ser um aducto de ácido fórmico (usado como solvente em HPLC) do hexósido de crisina produzido na fonte de ionização. Um composto similar já foi descrito em *Cytisus multiflorus* (Barros et al., 2012). O espectro de massa do derivado 2 (Figura 22C) era similar ao da crisina e não mostrou qualquer outro sinal que possa ser atribuído a um possível ião molecular. Foi, contudo, descartada a hipótese do composto corresponder à aglicona da crisina, que elui aos 38 min nas mesmas condições de HPLC.

Embora a presença de flavonoides já ter sido ocasionalmente descrita em outras espécies de cogumelos, este facto é controverso e portanto, deve ser adequadamente confirmado.

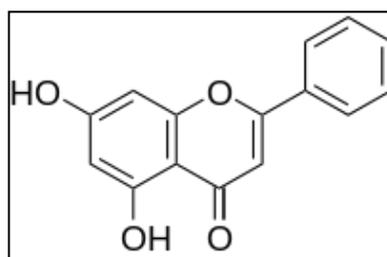


Figura 23. Ilustração representativa da estrutura da crisina (Web 15)

A atividade antioxidante dos cogumelos silvestres foi também avaliada *in vitro* e os resultados apresentam-se na Tabela 6.

Boletus porosporus apresentou os melhores resultados em todos os ensaios de avaliação da atividade antioxidante, com o maior poder redutor, medido pelos ensaios de *Folin-Ciocalteu* (30,21 mg GAE/g extrato) e do Ferricianeto/azul da prússia (menor valor de $EC_{50} = 0,49$ mg/mL), maior atividade captadora de radicais livres (menor valor de $EC_{50} = 2,06$ mg/mL) e maior inibição da peroxidação lipídica medida pelos ensaios do β -caroteno/linoleato (menor valor de $EC_{50} = 3,81$ mg/mL) e TBARS (menor valor de $EC_{50} = 0,51$ mg/mL).

Tabela 6. Propriedades antioxidante *in vitro* dos cogumelos silvestres comestíveis estudados (valor médio \pm desvio padrão).

		<i>Amanita crocea</i>	<i>Amanita mairei</i>	<i>Boletus porosporus</i>	<i>Boletus regius</i>	<i>Gyromitra esculenta</i>	<i>Helvella lacunosa</i>	<i>Russula aurea</i>	<i>Russula virescens</i>
Poder Redutor	Ensaio do <i>Folin-Ciocalteu</i> (mg GAE/g extrato)	22,27 \pm 0,38 c	8,94 \pm 0,15 e	20,15 \pm 1,68 c	30,21 \pm 1,45 a	27,16 \pm 5,29 b	13,66 \pm 0,84 d	12,23 \pm 0,21 d	14,05 \pm 0,27 d
	Ensaio do Ferricianeto/Azul da prússia (EC ₅₀ ; mg/mL)	1,08 \pm 0,23 ef	2,00 \pm 0,02 ed	1,58 \pm 0,01 e	0,49 \pm 0,00 f	6,82 \pm 0,74 c	17,60 \pm 2,09 a	2,91 \pm 0,16 d	8,24 \pm 0,06 b
Atividade captadora de radicais	Ensaio da atividade captadora de radicais DPPH (EC ₅₀ ; mg/mL)	7,94 \pm 0,08 f	13,81 \pm 0,18 c	6,97 \pm 0,25 f	2,06 \pm 0,07 g	12,66 \pm 0,22 d	26,92 \pm 1,37 b	11,34 \pm 0,22 e	30,21 \pm 1,36 a
Inibição da peroxidação lipídica	Ensaio do β -caroteno/linoleato (EC ₅₀ ; mg/mL)	50,44 \pm 7,65 a	14,10 \pm 1,50 b	17,08 \pm 0,97 b	3,81 \pm 0,32 d	9,15 \pm 0,67 c	6,53 \pm 0,38 dc	9,70 \pm 0,24 c	4,28 \pm 0,42 d
	Ensaio TBARS (EC ₅₀ ; mg/mL)	1,44 \pm 0,48 dc	0,66 \pm 0,10 d	5,49 \pm 2,80 a	0,51 \pm 0,01 d	3,95 \pm 0,72 ba	1,13 \pm 0,31 d	2,98 \pm 0,25b c	0,23 \pm 0,03 d

Em cada linha, letras diferentes significam diferenças significativas entre espécies ($p < 0.05$). Em relação ao ensaio de *Folin-Ciocalteu*, os valores mais elevados significam maior poder redutor; para os restantes ensaios, os resultados são apresentados em valores de EC₅₀, em que os valores mais elevados correspondem a menor poder redutor ou potencial antioxidante. EC₅₀: concentração de extrato correspondente a 50% da atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância para o ensaio do Ferricianeto/Azul da prússia.

Capítulo IV

4. Discussão

Tanto quanto se sabe, não há registos da caracterização nutricional e da análise de antioxidantes nestas oito espécies silvestres de cogumelos comestíveis: *Amanita crocea*, *Amanita mairei*, *Boletus porosporus*, *Boletus regius*, *Gyromitra esculenta*, *Helvella lacunosa*, *Russula aurea* e *Russula virescens*. Algumas destas espécies já tinham sido estudadas para outros fins, tais como, análise de metais em *Boletus regius* (Figueiredo 2007) e em *Russula virescens* (Chen et al., 2009; Busuioc et al., 2011), isolamento de uma protease a partir de *Helvella lacunosa* (Zhang et al., 2010) e toxicidade da espécie *Gyromitra esculenta* não cozinhada (Toth et al., , 1992; Leathem & Dorran, 2007).

Do ponto de vista nutricional, os cogumelos estudados mostraram ser ricos em água, glúcidos e proteínas, e estes são também alimentos de baixo nível calórico pois, apresentam baixo teor de lípidos.

O manitol e a trealose foram os principais açúcares encontrados sendo o primeiro (álcool derivado da manose) responsável pelo suporte e expansão dos corpos de frutificação dos cogumelos (Barros et al., 2008).

Os ácidos linoleico, oleico e palmítico foram os principais ácidos gordos presentes nas espécies estudadas, sendo o primeiro um precursor do 1-octen-3-ol, conhecido como “álcool dos fungos”, o principal componente aromático dos fungos (Maga, 1981). Os níveis de ácidos gordos insaturados foram superiores aos de SFA. Todos estes dados estão de acordo com outros estudos anteriormente efetuados que descrevem a análise nutricional de diferentes espécies de cogumelos de todo o mundo (Kalač, 2009; Ouzouni et al., 2009) incluindo, do Nordeste de Portugal, uma das regiões da Europa com maior diversidade de cogumelos silvestres, a maioria deles com grande importância gastronómica (Barros et al., 2008; Grangeia et al., 2011; Pereira et al., 2012).

Para além de serem alimentos ricos em nutrientes e com bastante sabor, os cogumelos comestíveis têm vindo a ser conhecidos por serem uma fonte de compostos bioativos.

As espécies estudadas revelaram possuir antioxidantes tais como tocoferóis, carotenoides, ácidos orgânicos e compostos fenólicos (principalmente ácidos fenólicos). Estas moléculas estão certamente envolvidas nas propriedades antioxidantes observadas para as diferentes espécies, quer a nível do poder redutor, quer dos efeitos captadores de radicais livres ou da inibição da peroxidação lipídica.

Em particular, o ácido cinâmico (composto encontrado em quantidades interessantes nas espécies *Russula*) já mostrou inibir o crescimento de uma linha de células tumorais humanas (NCI-H460) e, quando combinado com os ácidos protocatéuico e *p*-hidroxibenzoico, conduz a um forte decréscimo do número de células viáveis, sugerindo um possível efeito concomitante destes compostos (Vaz et al., 2012).

Boletus regius foi a espécie com os níveis mais elevados de glúcidos e PUFA e compostos bioativos nomeadamente, tocoferóis, ácido cítrico e compostos fenólicos, incluindo dois possíveis devivados de crisina, apresentando também a mais elevada atividade antioxidante.

Em suma, os compostos bioativos identificados nos cogumelos silvestres estudados podem ser extraídos com a finalidade de serem utilizados como nutracêuticos nomeadamente, contra doenças associadas ao stresse oxidativo. Sendo espécies comestíveis, podem também ser incorporados diretamente na dieta atuando como alimentos funcionais.

Capítulo V

5. Considerações finais

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 bioativos (tocoferóis, carotenoides, ácidos orgânicos, compostos fenólicos), poderão 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.

Podemos ainda sublinhar que este estudo evidencia uma nova forma de obter fontes de compostos bioativos com diversos interesses inclusive, interesse industrial. Procedendo-se à identificação e quantificação destas moléculas, caso estejam presentes em quantidades consideráveis, poderão ser descobertas novas e valiosas fontes de compostos importantes para a saúde e melhoria da qualidade de vida.

Os resultados desta dissertação foram divulgados nos documentos em anexo:

Anexo A - Publicação em revista internacional

Anexo B – Comunicações em congressos

Capítulo VI

6. Bibliografia

- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., & Blackwell, M. (1996). *Introductory Mycology*. 4th ed. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Alexopoulos, C.J., & Beneke E.S. (1962). *Laboratory Manual for Introductory*. Burgess Publishing Company.
- Ambrósio, C.L.B., Campos, F.A.C.S., & Faro, Z.P. (2006). Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. *Revista de Nutrição*, 19, 233-243.
- Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., & Weil J.A., (2004). Freeradical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84, 551-562.
- Andlauer, W., & Fürst, P. (2002). Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. *Food Research International*, 35, 171-176.
- Anjo, D.L.C. (2004). Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. *Jornal Vascular Brasileiro*, 3, 145- 154.
- Annunziata, A., & Vecchio, R. (2011). Functional foods development in the European market: a consumer perspective. *Journal of Functional Foods*, 3, 223-228.
- 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.
- Arora, D. (1986) *Cogumelos desmistificada: um guia completo para os fungos carnudos*. Berkeley: Ten Speed Press.
- Bagchi, D., Preuss, H.G., & Kehrer, J.A. (2004). Nutraceutical and functional food industries: aspects on safety and regulatory requirements. *Toxicology Letters*, 150, 1-2.
- Barros, L., Correia, D.M., Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P., & Santos-Buelga, C. (2008). Optimization of the determination of tocopherols in *Agaricus sp.* edible mushrooms by a Normal Phase Liquid Chromatographic method. *Food Chemistry*, 110, 1046-1050.
- Barros, L., Dueñas, M., Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P., & Santos-Buelga, C., (2009). Phenolic acids determination by HPLC-DAD-ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 1076-1079.
- Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R., & Santos-Buelga, C. (2012). Characterization of phenolic compounds in flowers of wild medicinal plants from Northeastern Portugal. *Food Chemical and Toxicology*, 50, 1576-1582.

- Benavente-García, O., et al. (1999). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry*, 68, 457-462.
- 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.
- Bianchi, M.L.P., Antunes, L.M.G. (1999). Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição*, 12, 123-130.
- Blaut, M. (2002). Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *European Journal of Nutrition*, 41, 1-16.
- Busuioc, G., Elekes, C.C., Stih, C., Lordache S., & Ciulei S.C. (2011). The bioaccumulation and translocation of Fe, Zn, and Cu in species of mushrooms from *Russula* genus. *Environmental Science Pollution Research International*, 18, 890-896.
- Chen, X.H., Zhou, H.B., & Qiu, G.Z. (2009). Analysis of several heavy metals in wild edible mushrooms from regions of China. *Bulletin of Environmental Contaminants and Toxicology*, 83, 280-285.
- Chiu, WF. (1948). Os boletos de Yunnan. *Mycologia*, 40, 199-231.
- Diplock, A.T., Aggett, P. J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E. B., & Roberfroid, M. B. (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *British Journal of Nutrition*, 81, S1-S27.
- Erkkilä, A.T., et al. (1999). Dietary associates of serum total, LDL, and HDL cholesterol and triglycerides in patients with coronary heart disease. *Preventive Medicine*, 28, 558-565.
- Eussen, S.R.B.M., Verhagen, H., Klungel, O.F., Garssen, J., Loveren, H.v., Kranen, H.J.v., & Rompelberg, C.J.M. (2011). Functional foods and dietary supplements: Products at the interface between pharma and nutrition. *European Journal of Pharmacology*, 668, S2-S9.
- Falguera, V., Aliguer, N., & Falguera, M. (2012). An integrated approach to current trends in food consumption: Moving toward functional and organic products? *Food Control*, 26, 274-281.
- 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.
- Figueiredo, E., Soares M.E., Baptista, P., Castro, M., & Bastos M.L. (2007). Validation of an electrothermal atomization atomic absorption spectrometry method for quantification of total chromium and chromium (VI) in wild mushrooms and underlying soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7192-7198.
- 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.
- Gerhardt, E.; Vila, J.; Llimona, X. (2000). *Hongos de España y de Europa*. Ediciones Omega.
- Gezer, K. (2000). Contributions to the macrofungi flora of Antalya Province. *Turkish Journal of Botany*, 24, 293-298.
- Hawksworth DL.. (2006). "The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation". *Mycological Research* 95: 641–55. DOI:10.1016/S0953-7562(09)80810-1
- 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.
- Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, F., Blackwell, M., Cannon, P.F. et al. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111, 509-547.
- Holzappel, W. H., & Schillinger, U. (2002). Introduction to pre and probiotics. *Food Research International*, 35, 109-116.
- Hungenholtz, J., & Smid, E.J. (2002). Nutraceutical production with food-grade microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 497-507.
- Jones, P.J., & Jew, S. (2007). Functional food development: Concept to reality. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 387–390.
- Jordan, M. (2004). *A Enciclopédia de Fungos da Grã-Bretanha e Europa*. Londres: Frances Lincoln.
- Kalač, P. (2009). Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry*, 113, 9-16.

- Kalantzopoulos, G. (1997). Fermented products with probiotic qualities. *Anaerobe*, 3, 185–190.
- Kaur, I.P., Chopra, K., & Saini, A. (2002). Probiotics: potencial pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15, 1-9.
- Kaur, I.P., & Geetha, T. (2006). Screening methods for antioxidants-A Review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 6, 305-312.
- Keller, N.P.; Turner, G.; Bennett, J.W. (2005). "Fungal secondary metabolism—from biochemistry to genomics". *Nature Reviews Microbiology* 3 (12): 937–47.
- Kellie, L.T., & Hayball, P.J., (2002). Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 636 – 644.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W., & Stalpers, J.A. (2008). *Dictionary of the fungi*. 10 ed. CAB International, Wallingford.
- Koune, J.P. (2001). *Threatened Mushrooms in Europe*. Council of Europe. p. 29.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., & Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*, 89, 217-233.
- Kruger, C.L., & Mann, S.W. (2003). Safety evaluation of functional ingredients. *Food and Chemical Toxicology*. 41, 793-805.
- Kwak, N., & Jukes, D.J. (2001a). Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. *Food Control*, 12, 99-107.
- Kwak, N., & Jukes, D.J. (2001b) Functional foods. Part 2: the impact on current regulatory terminology. *Food Control*, 12, 109-117.
- Leathem, A.M., & Dorran, T.J. (2007). Poisoning due to raw *Gyromitra esculenta* (false morels) west of the Rockies. *Canadian Journal of Emergency Medicine*, 9, 127-130.
- Lee, K.J., & Kim, Y.S. (1986). Host range and host specificity of putative ectomycorrhizal fungi collected under ten different artificial forest types in Korea. *Agricultural Research Seoul National University*, 11, 41-48.
- Lindequist, U., Niedermeyer, T.H.J., & Jülich, W.D. (2005). The pharmacological potential of mushrooms. *ECAM*, 2, 285-299.
- Lin He, M.S., & Fernandez, M.L. (1998). Saturated fat and simple carbohydrates elevate plasma LDL cholesterol concentrations by specific alterations on hepatic cholesterol metabolism. *Nutrition Research*, 18, 1003- 1015.
- Lopes, R.M., et al. (2003). Flavonóides. *Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento*, 18-22.
- Maga, J.A. (1981). Mushroom flavor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29, 4–7.
- Marcote, J.M.C; Pose, M.; Traba, J.M. (2008). *Cogomelos de Galicia*. Xunta de Galicia.

- Mattila, P., Suonpaa, K., & Piironen, V. (2000). Functional properties of edible mushrooms. *Nutrition*, 16, 694-696.
- Molyneux, P. (2004). The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 26, 211-219.
- Moreno, A.C. (2005). *Setas y Hongos de La Rioja II*. Fundación Caja Rioja, Logroño.
- Nagao, H. (2002). Flora fúngicas em Chiba Pref, região central do Japão (III): Ascomycetes, Plectomycetes e Discomycetes (em japonês). *Jornal do Museu de História Natural e do Instituto Chiba*.
- Ng, T.B., Liu, F., & Wang, Z. (2000). Antioxidative activity of natural products from plants. *Life Sciences*, 66, 709-723.
- Noonan, W.P., & Noonan, C. (2004). Legal requirements for “functional foods” claims. *Toxicology Letters*, 150, 19- 24.
- Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Bento, A., Estevinho, L., et al., (2008). Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2326 – 2331.
- 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.
- Peng, W., Gan, B., Tan, W., & Guo, Y. (2003). Estudos sobre cogumelos económicos em zonas de montanha Longmen (em chinês), sudoeste da China. *Journal of Agricultural Sciences*, 16,, 36-41.
- Pereira, E., Barros, L., Martins, A., & Ferreira, I.C.F.R. (2012) Towards chemical and nutritional inventory of Portuguese wild edible mushrooms in different *habitats*. *Food Chemistry*, 130, 394-403.
- Phillips, R. (2006). *Cogumelos*. Londres: Pan Macmillan Ltd.
- Pimentel, B.M.V., Francki, M., & Gollücke, B.P. (2005). *Alimentos funcionais: introdução as principais substâncias bioativas em alimentos*. São Paulo: Editora Varela.
- Poucheret, P., Fons, F., & Rapior, S. (2006). Biological and pharmacological activity of higher fungi: 20-Year retrospective analysis. *Mycologie*, 27, 311-333.
- Reig, A.L.C., & Anesto, J.B. (2002). *Prebióticos y probióticos, una Relación Beneficiosa*. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. *Revista Cubana de Alimentação e Nutrição*, 16, 63-8.

- Roberfroid, M. (2002). Functional food concept and its application to prebiotics. *Digestive and Liver Disease*, 34, 105-10.
- Rodríguez, J.A.S. (2012). *Guia dos cogumelos Terra Fria*. Gráficas ALSE.
- Rodríguez, M.B.S., Megías, S.M., & Baena, B.M. (2003). Alimentos Funcionales y Nutrición óptima. *Revista da Espanha de Salud Pública*, 77, 317-331.
- Saad, S.M.I. (2006). Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42, 1-16.
- Salinas, R.D. (2002). *Alimentos e nutrição: introdução à bromatologia*. 3. ed. Porto Alegre: Editora Artmed.
- Salminen, S., et al. (1998) Demonstration of safety of probiotics—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 44, 93–106.
- Sesli, E. (2007). Checklist of the Turkish ascomycota and basidiomycota collected from the Black Sea region. *Mycotaxon*, 99, 71-74.
- Sgarbieri, V.C.; Pacheco, M.T.B. (1999). “Revisão: alimentos funcionais fisiológicos”, *Braz J Food Technol* 2(1-2), 7-19.
- Shami, N.J.I.E., & Moreira, E.A.M. (2004). Licopeno como agente antioxidante. *Revista de Nutrição*, 17, 227-236.
- Sirò, I., Kapolna, E., Kapolna, B., & Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance- A review. *Appetite*, 51, 456–467.
- Smith, S.E., Read, D.J., & Harley, J.L. (1997). *Simbiose micorrízica*. Academic Press.
- Soares, S.E. (2002). Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, 15, 71-81.
- Souza, P. H. M., Souza, N. M. H., & Maia, G.A. (2003). Componentes funcionais nos alimentos. *Boletim da SBCTA*, 37, 127-135.
- Stahl, W., & Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24, 345-351.
- Swann, E., & Hibbett, D.S. (2007). *Basidiomycota. The Club Fungi*. Version 20 April 2007.
- Toth, B., Patil, K., Pyysalo, H., Stessman, C., & Gannett, P. (1992). Cancer induction in mice by feeding the raw false morel mushroom *Gyromitra esculenta*. *Cancer Research*, 52, 2279-2284.
- Türkoglu, A., Alli, H., Isiloğlu, M., Yağiz, D., & Gezer, K. (2008). Macrofungus diversity of Uşak province in Turkey. *Mycotaxon*, 104, 365-368.

- 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.
- 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., Martins, A., Almeida, G.M., Vasconcelos, M.H., & Ferreira, I.C.F.R. (2012). *Clitocybe alexandri* extract induces cell cycle arrest and apoptosis in a lung cancer cell line: identification of phenolic acids with cytotoxic potential. *Food Chemistry*, 132, 482-486.
- Walji, R., & Boon, H. (2008). Natural health product regulations: perceptions and impact. *Trends in Food Science & Technology*, 19, 494-497.
- Walzem, R. L. (2004). Functional Foods. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 518.
- Watling, R., & SuSee, L. (1998). Os fungos ectomicorrízicos inoculados associados com os membros da Dipterocarpaceae na península da Malásia – II. *Journal of Tropical Forest Science*, 10, 421-430.
- Yagiz, D., Afyon, A., Konuk, M., & Helfer, S. (2006). Contributions to the macrofungi of Bolu and Düzce Provinces, Turkey. *Mycotaxon*, 95, 331-334.
- Zhang, G., Wang, H., Zhang, X., & Ng, T. (2010). Helvellisin, a novel alkaline protease from the wild ascomycete mushroom *Helvella lacunosa*. *Journal of Biosciences and Bioengineering*, 109, 20-24.

Websites:

Web 1: <http://ar.all.biz/img/ar/catalog/8519.jpeg>

Web 2: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/f8/Fibu.jpg/220px-Fibu.jpg>;

Web 3: <http://micologiananet.blogspot.com/2010/06/ba>;

Web 4: http://www.cientic.com/imagens/img_fungo1.jpg;

Web 5: <http://ruisoares65.pbworks.com/f/1304715510/micorrizas%20foto%209.jpg>;

Web 6: <http://nатурlink.sapo.pt/ResourcesUser/GaleriaFauna/Micorrizas2.jpg>;

Web 7: <http://www.adesper.com/biodiversidadfungica/images/11/amanita-crocea.jpg>;

Web 8: http://mycocheype.chezalice.fr/images/Agaricomycetes/Amanita_mairei.jpg;

Web 9: <http://www.retamatour.com/web/02web/hongos/fotos/Boletus-regius00.jpg>;

Web 10: http://farm7.staticflickr.com/6073/6106553707_74566d2483_z.jpg;

Web 11: <http://www.elrincondoyegen.com/imgs/Setas/Gyromitra%20esculenta4.jpg>;

Web 12: [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/10/Helvella
lacunosa1977.jpg/235px-Helvella_lacunosa_1977.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/10/Helvella_lacunosa1977.jpg/235px-Helvella_lacunosa_1977.jpg);

Web 13: [http://www.identifiezleschampignonsen3clics.com/images/stories/articles/
champignons_de_nos_regions/comestibles/russula_aurea_8796.jpg](http://www.identifiezleschampignonsen3clics.com/images/stories/articles/champignons_de_nos_regions/comestibles/russula_aurea_8796.jpg);

Web 14: http://www.mtsn.tn.it/russulalesnews/pho/06457Russula_virescens_pho_1.jpg;

Web 15: [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/fe/Chrysin.svg
/200px-Chrysin.svg.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/fe/Chrysin.svg/200px-Chrysin.svg.png)

Capítulo VII

7. Anexos:

Os resultados descritos nesta dissertação deram origem a uma publicação em revista internacional e a duas comunicações nacionais:

Ana Raquel Leal, Lillian Barros, João C.M. Barreira, Maria João Sousa, Anabela Martins, Celestino Santos-Buelga, & Isabel C.F.R. Ferreira. Portuguese wild mushrooms at the "Pharma-Nutrition" interface: Nutritional characterization and antioxidant properties. *Food Research International*, 2013, 50, 1–9. (**Anexo A**)

Ana Raquel Leal, Lillian Barros, Maria João Sousa, Anabela Martins, & Isabel C.F.R. Ferreira. Análise de nutrientes em espécies de cogumelos silvestres dos géneros *Amanita* e *Russula*. 11º Encontro Nacional de Química dos Alimentos, 16 a 19 de Setembro de 2012, Bragança, Portugal. Resumo apresentado em painel e Ata de congresso. (**Anexo B**)

Ana Raquel Leal, Lillian Barros, Maria João Sousa, Anabela Martins, Isabel C.F.R. Ferreira. Potencial antioxidante de espécies de cogumelos silvestres comestíveis dos géneros *Amanita* e *Russula*. 11º Encontro Nacional de Química dos Alimentos, 16 a 19 de Setembro de 2012, Bragança, Portugal. Resumo apresentado em painel e Ata de congresso. (**Anexo B**)

A. Publicação em revista internacional

B. Comunicações nacionais

*11º Encontro de Química dos Alimentos (11EQA)
(resumos e respetivas atas)*