

**Caracterização química e propriedades antioxidantes de
amostras de *Lepista nuda* (Bull.) obtidas por cultura *in
vitro* e *in vivo* em diferentes *habitats***

Sara Vanessa da Cruz Pinto

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

Orientado por
Maria João Sousa
Isabel C. F. R. Ferreira

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.



Aos meus Pais e ao meu namorado....

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por me terem permitido continuar com os estudos, fazendo um grande esforço financeiro, e por me terem dado todo o apoio que sempre precisei.

Ao meu namorado por me ter dado todo o apoio e coragem para continuar.

Aos meus amigos que sempre me deram apoio nas horas mais difíceis deste percurso, principalmente à Tânia Brito, à Raquel Leal e ao José Pinela.

Às minhas orientadoras, Professoras Doutoras Maria João Sousa e Isabel Ferreira que sempre acreditaram nas minhas capacidades e que me deram toda a força e, por isso, um muito obrigado.

À coordenadora do Departamento de Biologia e Biotecnologia da Escola Superior Agrária de Bragança (ESA), Professora Doutora Ana Carvalho, e à responsável pelo laboratório de Biologia, Professora Doutora Anabela Martins, por permitirem a execução deste trabalho e por todo o apoio logístico.

À responsável pelo Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada da ESA (BioChemCore), Professora Doutora Isabel Ferreira, e à Doutora Lillian Barros por todo o apoio prestado neste trabalho; foi uma ajuda imprescindível, obrigada por tudo.

Ao Professor Doutor Luís Pedro do Laboratório do Centro de Biotecnologia Vegetal da Faculdade de Ciências de Lisboa, pelo apoio nas análises das frações voláteis do fungo *Lepista nuda*.

À Dona Isabel e Amélia que nas horas de mais dificuldade deram todo o apoio.

E por fim, mas não os últimos, aos meus amigos de licenciatura e mestrado que ao longo destes últimos anos foram tão importantes.

Obrigado !!!!

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	iii
ÍNDICE DE TABELAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ABREVIATURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
I. INTRODUÇÃO	2
1.1. Morfologia e classificação de fungos	2
1.2. Produção de macrofungos	7
1.3. O macrofungo <i>Lepista nuda</i>	11
1.4. Compostos voláteis em macrofungos	12
1.5. Macrofungos como fonte de compostos bioativos	16
1.6. Objetivos	19
II. MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1. Material biológico e preparação das amostras	21
2.1.1. Corpos frutíferos silvestres e comerciais	21
2.1.2. Produção <i>in vitro</i> do micélio	21
2.2. Avaliação do crescimento do micélio em diferentes meios de cultura sólidos	23
2.2.1. Determinação da curva de crescimento do micélio de <i>Lepista nuda</i> com base no raio obtido em diferentes meios de cultura sólidos	23
2.2.2. Determinação da curva de crescimento do micélio de <i>Lepista nuda</i> com base nas massas fresca e seca obtidas em diferentes meios de cultura sólidos	25
2.2.3. Aplicação de condições de stresse à amostra comercial em diferentes meios de cultura sólidos	26
2.3. Padrões e Reagentes	27
2.4. Determinação de voláteis obtidos por destilação-extração Likens-Nickerson (LN) ...	28
2.5. Determinação da composição proximal	30
2.6. Determinação de ácidos gordos	30
2.7. Determinação de açúcares	31
2.8. Determinação de ácidos orgânicos	32
2.9. Determinação de compostos fenólicos	32
2.10. Determinação de tocoferóis	33
2.11. Avaliação da atividade antioxidante	34

2.11.1.	Aspetos gerais	34
2.11.2.	Ensaio Folin Ciocalteu.....	34
2.11.3.	Ensaio do ferricianeto/azul da Prússia	35
2.11.4.	Ensaio da atividade captadora de radicais DPPH	35
2.11.5.	Ensaio do β -caroteno/linoleato	35
2.11.6.	Ensaio TBARS	36
2.12.	Análise estatística.....	36
III.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
3.1.	Avaliação do crescimento do micélio de <i>Lepista nuda</i> em diferentes meios de cultura sólidos.	39
3.1.1.	Avaliação do crescimento do micélio de <i>Lepista nuda</i> com base no raio obtido em diferentes meios de cultura sólidos	39
3.1.2.	Avaliação do crescimento do micélio de <i>Lepista nuda</i> com base nas massas fresca e seca obtidas em diferentes meios de cultura sólidos.....	43
3.1.3.	Avaliação do crescimento do micélio de <i>Lepista nuda</i> obtido a partir da amostra comercial, em diferentes meios de cultura sólidos sob condições de stresse de temperatura	55
3.2.	Composição em voláteis nas amostras de <i>Lepista nuda</i> comerciais e silvestres provenientes de diferentes <i>habitats</i>	57
3.3.	Composição proximal e ácidos gordos maioritários nas amostras de <i>Lepista nuda</i> comerciais e silvestres provenientes de diferentes <i>habitats</i>	62
3.4.	Composição química dos corpos frutíferos e dos micélios de <i>Lepista nuda</i>	64
3.5.	Atividade antioxidante dos corpos frutíferos e dos micélios de <i>Lepista nuda</i>	69
IV.	CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS.....	72
V.	BIBLIOGRAFIA	75
VI.	ANEXOS	83

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos fungos do Filo <i>Basidiomycota</i>	7
Tabela 2. Resultados de crescimento obtidos nos diferentes meios de cultura a diferentes temperaturas.	56
Tabela 3. Composição da fração volátil, obtida por destilação-extração, de amostras de <i>Lepista nuda</i> comerciais e silvestres provenientes de carvalho e pinhal.	61
Tabela 4. Composição proximal e ácidos gordos maioritários dos corpos frutíferos de <i>Lepista nuda</i> obtidos em diferentes <i>habitats</i>	63
Tabela 5. Composição em açúcares, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e tocoferóis dos corpos frutíferos de <i>Lepista nuda</i> provenientes de diferentes <i>habitats</i> e do micélio obtido, <i>in vitro</i> , em diferentes meios de cultura.	67
Tabela 6 Atividade antioxidante dos corpos frutíferos de <i>Lepista nuda</i> provenientes de diferentes <i>habitats</i> e do micélio obtido, <i>in vitro</i> , em diferentes meios de cultura.	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação do corpo frutífero, micélio e hifas.	4
Figura 2. Divisão dos organismos proposta por Whittaker (1969).	5
Figura 3. Estrutura do micélio e os basidiósporos suspensos no chapéu do cogumelo... 6	6
Figura 4. Produção de diversos macrofungos em Portugal.	8
Figura 5. Macrofungo <i>Lepista nuda</i>	11
Figura 6. Aparelho de <i>Clevenger</i> modificado.	14
Figura 7. Aparelho de destilação-extração <i>Likens-Nickerson</i>	14
Figura 8. Estrutura química do 1-octen-3-ol	16
Figura 9. Estrutura química dos tocoferóis.....	17
Figura 10. Frutificações de <i>Lepista nuda</i>	21
Figura 11. Excisão de porções do corpo frutífero	22
Figura 12. Crescimento contínuo e ramificado das hifas nos diferentes meios de cultura.	23
Figura 13. Esquema representativo do procedimento usado na placa de Petri para a determinação da curva de crescimento do micélio de <i>Lepista nuda</i>	24
Figura 14. Determinação da curva de crescimento do micélio de <i>Lepista nuda</i> em diferentes meios de cultura.	24
Figura 15. Inóculo em celofane usado na determinação das massas de micélio.....	26
Figura 16. Inóculos de micélio a diferentes temperaturas: (A) frio 4 °C; (B) quente 37 °C.....	27
Figura 17. Destilador de <i>Likens-Nickerson</i>	28
Figura 18. Micélio da amostra comercial de <i>Lepista nuda</i> utilizada para extração de compostos voláteis.....	29
Figura 19. Curva de crescimento do micélio obtido em diferentes de meio de cultura a partir de corpos frutíferos de <i>Lepista nuda</i> provenientes de prado.	40
Figura 20- Curva de crescimento do micélio obtido em diferentes meios de cultura, a partir de corpos frutíferos comerciais de <i>Lepista nuda</i>	41
Figura 21. Taxa Relativa de Crescimento com base no raio do micélio obtido a partir da amostra de <i>Lepista nuda</i> proveniente de prado.	42
Figura 22. Taxa Relativa de crescimento com base no raio do micélio obtido a partir da amostra comercial de <i>Lepista nuda</i>	42

Figura 23. Crescimento do micélio de <i>Lepista nuda</i> proveniente de prado, com base nas massas fresca e seca obtidas em meio de cultura MMN completo.	44
Figura 24. Crescimento do micélio de <i>Lepista nuda</i> proveniente de prado, com base nas massas fresca e seca obtidas no meio de cultura MMN incompleto.	45
Figura 25. Crescimento do micélio de <i>Lepista nuda</i> proveniente de prado, com base nas massas fresca e seca obtidas em meio de cultura PACH.....	46
Figura 26. Crescimento do micélio de <i>Lepista nuda</i> proveniente de prado, com base nas massas fresca e seca obtidas em meio de cultura FAD.	47
Figura 27. Crescimento do micélio de <i>Lepista nuda</i> proveniente de prado, com base nas massas fresca e seca obtidas em meio de cultura PDA.	48
Figura 28. Crescimento do micélio de <i>Lepista nuda</i> comercial, com base nas massas fresca e seca obtidas em meio de cultura MMN completo.....	49
Figura 29. Crescimento do micélio de <i>Lepista nuda</i> comercial, com base nas massas fresca e seca obtidas em meio de cultura MMN incompleto.....	50
Figura 30. Crescimento do micélio de <i>Lepista nuda</i> comercial, com base nas massas fresca e seca obtidas em meio de cultura PACH.....	51
Figura 31. Crescimento do micélio de <i>Lepista nuda</i> comercial, com base nas massas fresca e seca obtidas em meio de cultura FAD.....	52
Figura 32. Crescimento do micélio de <i>Lepista nuda</i> comercial, com base nas massas fresca e seca obtidas em meio de cultura PDA.....	52
Figura 33. Taxa Relativa de crescimento com base na massa de micélio obtida a partir, da amostra de <i>Lepista nuda</i> proveniente de prado.	54
Figura 34. Taxa Relativa de crescimento com base na massa de micélio obtida a partir da amostra comercial de <i>Lepista nuda</i>	55
Figura 35. Resultados obtidos no crescimento do micélio nos diferentes meios de cultura e diferentes temperaturas, e a cor obtida.	57
Figura 36. Estrutura química do composto 2-pentilfurano.....	58
Figura 37. Estrutura do linolol (3,7-dimetil-1,6-octadieno-3-ol)	59
Figura 38. Estrutura química da pulegona.....	59
Figura 39. Estrutura química do limoneno.....	60
Figura 40. Perfil em ácidos gordos do corpo frutífero de <i>Lepista nuda</i> silvestre proveniente de carvalhal.....	64

Figura 41. (A) Perfil em açúcares da amostra comercial e do micélio MMN completo
(B) Perfil em ácidos orgânicos da amostra comercial e do micélio MMN completo (C)
Perfil em tocoferóis da amostra de carvalho e da amostra de micélio FAD..... 68

ABREVIATURAS

Absorvância	A
Atividade captadora de radicais	ACR
Associação Oficial de Química Analítica (<i>Association of Official Analytical Chemists</i>)	AOAC
Inóculo inicial	cw₁
Crescimento do micélio por raio	cw₂
Detetor de díodos	DAD
Desvio padrão	DP
2,2-difenil-1-picril-hidrazilo	DPPH
Ácido desoxirribonucleico	DNA
Massa seca	dw
Por exemplo (<i>Exempli gratia</i>)	e.g.
Concentração de extrato correspondente a 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no ensaio do poder reductor	EC₅₀
Estados Unidos da América	EUA
Meio <i>Ferry & Das</i>	FAD
Ésteres metílicos de ácidos gordos (<i>Fatty Acid Methyl Esters</i>)	FAME
Fonte comercial	FC
Detetor de ionização de chama (<i>Flame Ionization Detector</i>)	FID
Carvalhal	FO
Pinhal	FP
Massa fresca	fw
Cromatografia gasosa (<i>Gas Chromatography</i>)	GC
Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa	GS-MS
Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High-Performance Liquid</i>	HPLC

	<i>Chromatography</i>)	
	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>	IUPAC
	Destilação-extração Likens-Nickerson	LN
	Radical peroxilo	LOO[•]
	Malondialdeído	MDA
	Meio sólido <i>Melin-Norkans</i> modificado completo	MMN completo
	Meio sólido incompleto <i>Melin-Norkans</i>	MMN incompleto
	Espectrometria de massa (<i>Mass Spectrometry</i>)	MS
	Ácidos gordos monoinsaturados (<i>Monounsaturated Fatty Acids</i>)	MUFA
	Número	n.º
	Não detetado	nd
	Meio sólido <i>Pachlewski</i>	PACH
	Meio <i>Potato Dextrose Agar</i>	PDA
	Ácidos gordos polinsaturados (<i>Polyunsaturated Fatty Acids</i>)	PUFA
	Detetor de índice de refração (<i>Refraction Index</i>)	RI
	Espécies reativas de azoto (<i>Reactive Nitrogen Species</i>)	RNS
	Espécies reativas de oxigénio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)	ROS
	Rotações por minuto	rpm
	Ácidos gordos saturados (<i>Saturated Fatty Acids</i>)	SFA
	Ácido tiobarbitúrico (<i>Thiobarbituric acid</i>)	TBA
	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (<i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i>)	TBARS
	Taxa Relativa de Crescimento	TRC
	Cromatografia líquida ultra rápida	UFLC
	Relação volume/volume	v/v
	Relação massa/volume	w/v

RESUMO

O macrofungo *Lepista nuda* (Bull), também conhecido como *Clitocybe nuda*, pertence ao filo *Basidiomycota*, à classe *Basidiomycetes*, à ordem *Agaricales*, à família *Tricholomataceae* e ao género *Lepista*, e tem como nome comum “pé-azul”. Trata-se de um fungo comestível saprófita/decompositor com muito interesse comercial devido, não só, ao seu valor nutricional, mas também ao seu aroma intenso e característico.

O objetivo do presente trabalho foi comparar a composição química e o potencial antioxidante de amostras de *Lepista nuda* provenientes de diferentes *habitats* do Nordeste de Portugal (corpos frutíferos silvestres provenientes de carvalhal e pinhal, e comerciais), e do micélio obtido por cultura *in vitro* a partir dos corpos frutíferos provenientes de prado e comerciais, usando cinco meios de cultura diferentes. Pretendeu-se, ainda, analisar efeitos de condições de stresse, relativamente à temperatura, no crescimento do micélio. Na determinação da composição química, deu-se especial atenção aos voláteis, ácidos gordos, açúcares, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e tocoferóis. Na avaliação das propriedades antioxidantes determinou-se o poder redutor, o efeito captador de radicais livres e a inibição da peroxidase lipídica em homogeneizados cerebrais.

.Verificou-se que o micélio apresentou um maior crescimento radial e de massa no meio MMN completo. Por outro lado, o micélio obtido a partir da amostra comercial cresceu com maior rapidez em relação ao obtido a partir da amostra proveniente de prado; mas foi o micélio obtido a partir dessa amostra que teve uma maior produção de massa.

Nas condições de stresse, o fungo sujeito a altas temperaturas, só cresceu em meio PACH; já a baixas temperaturas, cresceu em todos os meios de cultura testados.

Os compostos voláteis dos cogumelos têm sido pouco estudados, embora eles contribuam significativamente para o sabor e propriedades organolépticas destas espécies. Foram identificados 22 componentes voláteis nas amostras comerciais e silvestres provenientes de carvalhal e pinhal, constituindo 84-94% da fração volátil. As diferenças entre os voláteis das amostras silvestres e comercial foram principalmente quantitativas. O linalol (17-26%), a pulegona (12-14%) e limoneno (10-11%) foram os três principais componentes em todas as amostras. A grande diferença foi observada na percentagem de 2-pentilfurano, presente em pequena quantidade nas amostras silvestres (2% e 5% nas amostras provenientes de carvalhal e pinhal, respetivamente), mas em

quantidade considerável na amostra comercial (15%), sendo o segundo componente maioritário. Os compostos C8 são voláteis ubíquos entre fungos e responsáveis pelo seu aroma; o 1-octen-3-ol tem sido descrito como o mais abundante. No entanto, no presente estudo, este composto foi detetado em pequenas quantidades em todas as amostras (2%), tendo sido o linalool, o limoneno e pulegona os componentes principais nas amostras em estudo.

A amostra comercial revelou a maior contribuição energética, maior conteúdo de PUFA, devido à contribuição de ácido linoleico, e também maior concentração de compostos fenólicos. A amostra silvestre de carvalho deu os maiores níveis de ácidos orgânicos. As amostras de micélio mostraram ter níveis mais elevados de glucose, tocoferóis e maior atividade antioxidante. Particularmente, o meio de cultura PACH provou ser melhor para a produção de glucose, os meios de cultura PDA, PACH e FAD para β e γ -tocoferóis, o meio de cultura MMN completo para compostos fenólicos e o meio de cultura MMN incompleto para as propriedades antioxidantes.

No geral, a cultura *in vitro* poderia ser explorada para obtenção de compostos bioativos de macrofungos para aplicações industriais, no controlo das condições ambientais para produzir maiores quantidades desses compostos e com o intuito de superar a diversidade na composição química observada em amostras recolhidas em diferentes *habitats*.

ABSTRACT

The macrofungi *Lepista nuda* (Bull), also known as *Clitocybe nude* belongs to the phylum *Basidiomycota*, class *Basidiomycetes*, order *Agaricales*, family *Tricholomataceae* and gender *Lepista*, and has the common name "blewit". It is an edible saprophytic/decomposer fungus with high commercial interest due not only to its nutritional value, but also to its intense and characteristic aroma.

The aim of this study was to compare the chemical composition and antioxidant potential of samples of *Lepista nuda* from different habitats in the Northeast of Portugal (commercial and wild fruiting bodies from oak and pine forests), and of the mycelium obtained by *in vitro* culture from commercial and meadow wild fruiting bodies, using five different culture media. Furthermore, the effects of stress conditions related to temperature, on mycelia growth were also evaluated. In the chemical composition evaluation, particular attention was given to the determination of volatile compounds, fatty acids, sugars, organic acids, phenolic compounds, and tocopherols. Regarding the antioxidant properties, reducing power, free radical scavenging effects and inhibition of lipid peroxidation in brain homogenates were evaluated.

Mycelium cultured in solid complete Melin-Norkans medium showed the highest growth and radial mass. Otherwise, the mycelium obtained from commercial sample grew faster compared to the one obtained from wild meadow samples, but it was the mycelium obtained from this sample that gave the highest mass production.

Under conditions of stress with high temperatures, the fungi only grew in medium PACH; applying low temperatures, mycelia grown in all the tested culture media.

Volatile compounds from mushrooms have been little studied, although they contribute significantly to the flavour and organoleptic properties of these species. Twenty two volatile components were identified in the commercial and wild samples (obtained from oak and pine forests), constituting 84-94% of the volatile fraction. The differences between the commercial and wild samples volatiles were mostly in quantities. Linalool (17-26%), pulegone (12-14%) and limonene (10-11%) were the main components in all the samples. The major difference was observed in the percentage of 2-pentylfuran, present in small amounts in wild samples (2% and 5% in samples from oak and pine forests, respectively), but in considerable amounts in the commercial sample (15%), being the second main compound. C8 compounds are

ubiquitous volatiles in fungi and have been pointed out as responsible for their aroma; 1-octen-3-ol has been described as the most abundant. However, in this study, this compound was detected in small amounts in all the samples (2%); linalool, limonene and pulegone were the major components in the analyzed samples.

The commercial sample (cultivated) gave the highest energetic contribution and PUFA contents due to the contribution of linoleic acid, as also of phenolic compounds; the wild sample from oak forest gave the highest levels of organic acids. Mycelia samples showed to have higher levels of glucose, tocopherols and antioxidant activity. Particularly, PACH medium proved to be better for glucose production, PDA, PACH and FAD for β - and γ -tocopherols, complete MMN for phenolic compounds and incomplete MMN for antioxidant properties

Overall, *in vitro* culture could be explored to obtain bioactive compounds from macro fungi for industrial applications, controlling environmental conditions to produce higher amounts of these compounds and to overcome the diversity in chemical composition observed in samples collected in different habitat.



Capítulo I

I. INTRODUÇÃO

1.1. Morfologia e classificação de fungos

Desde sempre que os fungos despertaram um grande interesse. Já desde os tempos imemoriais que lhes são atribuídos inúmeros atributos, devido à sua estranha e misteriosa vida, à sua diversidade de cores, de formas, aos aromas e sabores característicos. Por várias vezes, tentou-se explicar a sua aparência peculiar e a sua origem, sendo atribuído a fenómenos mágicos e até a intervenções do demónio (Keizer, 2000).

Para desmistificar o mistério em volta dos fungos e para os compreender iniciou-se o estudo dos fungos - micologia, que surgiu como um ramo da botânica. Historicamente, os fungos foram classificados e identificados como plantas inferiores, da divisão *Thallophyta* por Linnaeus. Atualmente, estudos demonstram que os fungos têm características próprias, que são suficientemente e significativamente distintas, permitindo assim criar um reino separado, o reino *Myceteae* (Chang & Miles, 2004).

Estima-se que existam cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos na terra e cerca de 100 000 espécies são conhecidas em todo o mundo, no qual 800 espécies estão, atualmente designadas como novas espécies para a ciência (Hawksworth, 2001). Isto torna os cogumelos, um dos recursos da biodiversidade menos estudados/explorados do nosso planeta (Webster & Weber, 2007). Para além disso, existe uma grande variedade dentro da mesma espécie, por exemplo, ao nível morfológico poderão ser similares, mas ser distintos relativamente aos seus metabolitos. Ou seja, alguns metabolitos podem ser produzidos por todas as variedades de uma espécie em particular e outros metabolitos serem específicos de uma única variedade. No entanto, é importante referir que dependendo das condições pelo qual o organismo se desenvolve, a sua composição química pode alterar-se (Hanson, 2008).

Extraordinariamente, os fungos conquistaram em larga escala uma enorme série de *habitats*, desempenhando diferentes e importantes papéis nos ecossistemas (Dix & Webster, 1995). Os fungos são ubíquos em *habitats* terrestres e de água doce, mas também existem no gelo do Antártico (Feofilova, 2001; Webster & Weber, 2007). Detêm um importante papel na ecologia, reciclando o material orgânico, uma vez que não conseguem produzir o seu próprio alimento, como as plantas, a partir de materiais inorgânicos simples, como o dióxido de carbono, água, nitratos e usando a energia do

sol. Assim, os fungos alimentam-se de material orgânico complexo (Chang & Miles, 2004; Webster & Weber, 2007; Hanson, 2008).

Os fungos são organismos eucariotas com um núcleo distinto, sem clorofila e com uma nutrição heterotrófica. Ao contrário dos animais que se alimentam por ingestão, os fungos obtêm os nutrientes através de digestão extracelular realizada por enzimas excretadas, absorvendo os produtos solubilizados. Assim, os fungos podem ser saprófitas, alimentam-se de matéria orgânica morta ou decomposição; parasitas, colonizam animais, vegetais ou mesmo de outros fungos, vivendo à custa destes; e simbioses, que estabelecem uma associação de interesse com outros organismos vivos, com benefícios mútuos (Frade & Alfonso, 2005; Webster & Weber, 2007; Hanson, 2008).

É comum dividir os fungos em dois grupos conforme a sua estrutura, os unicelulares e os filamentosos. Os unicelulares são os mais abundantes na natureza, como por exemplo as leveduras. Já os filamentosos são menos abundantes. Têm uma estrutura tubular, que se denomina de hifas. As hifas podem crescer apenas nas pontas ou regiões especializadas. Através de ramificações, e em algumas espécies, por meio de anastomose ou fusão de hifas, é formada uma rede desses filamentos à qual se dá o nome de micélio (Figura 1) (Chang & Miles, 2004). Geralmente são bastante uniformes nos diferentes grupos taxonómicos dos fungos. Uma das poucas características que nos permitem a sua distinção é a presença ou ausência de paredes transversais designadas por septos (Webster & Weber, 2007).

A reprodução dos fungos ocorre por norma através de esporos, mas também pode desenvolver-se de forma vegetativa, isto é, ocorre através de fragmentos de micélio. Embora muitos esporos sejam disseminados pelo vento, outros podem necessitar da intervenção de vetores como insetos ou outros animais. Desta forma, podem ser pigmentados e alguns podem ter um revestimento gelatinoso de polissacáridos para facilitar a sua disseminação por um “transportador” e a sua ligação a um hospedeiro (Hanson, 2008).

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

A estrutura que normalmente se chama de cogumelo é na realidade o corpo frutífero do fungo (Figura 1) (Chang & Miles, 2004); o tipo mais comum de cogumelo é

em forma de guarda-chuva, com píleo e estipe, e algumas espécies têm adicionalmente um anel, uma volva, ou ambos. Por baixo do chapéu apresentam uma superfície de consistência mole, o himénio (que pode apresentar diferentes formas: lâminas ou lamelas, tubos ou poros, pregas mais ou menos definidas, superfícies lisas, entre outras), onde se produzem os esporos (Martins, 2004). Contudo, esta estrutura não se aplica a todas as espécies; alguns cogumelos são em forma de taças flexíveis, outros são redondos como bolas de golfe, existem ainda aqueles que se assemelham a uma orelha humana. Existe pois, uma grande variedade de formas (Chang & Miles, 2004).

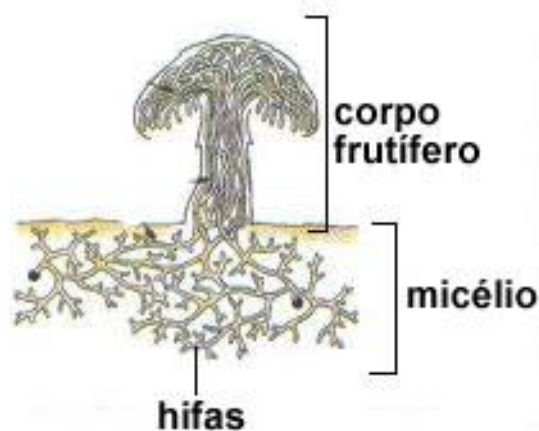


Figura 1. Representação do corpo frutífero, micélio e hifas (Web 1).

Em 1969, Whittaker propôs uma classificação dos organismos em cinco reinos em que pela primeira vez os fungos aparecem como um reino à parte (Figura 2). No entanto, estudos novos levaram à descoberta que, a nível molecular, a vida na terra pode ser classificada em três grupos, designados por domínios, dos quais dois são procarióticos e o terceiro eucariótico. Os fungos são, assim, reconhecidos como um dos cinco reinos eucariotas, sendo os outros *Animalia*, *Plantae*, *Chromista* e *Protozoa* (Carlile et al., 2001). Atualmente, a classificação retirou do Reino *Fungi* todos os organismos que possuem celulose na sua parede e reestruturou a classificação dos seres vivos. O reino *Fungi* mantém-se mas, com alterações.

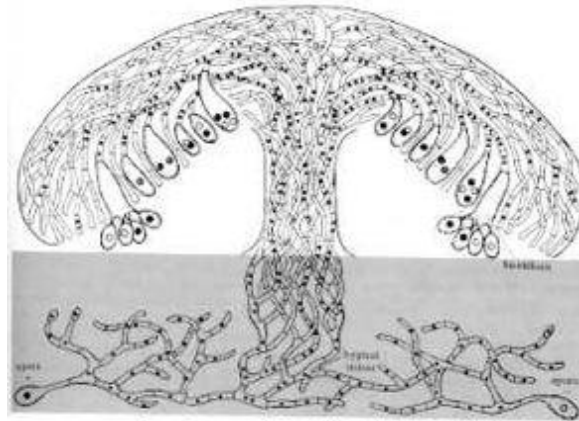


Figura 3. Estrutura do micélio e os basidiósporos suspensos no chapéu do cogumelo (Web 3).

A maioria dos fungos identificados no campo e nos bosques são da classe *Agaricomycetes*. A nível microscópico, nesta classe existem duas particularidades muito vulgarizadas pelo grupo que caracterizaram. Uma dessas particularidades é presença de “clamp connections”, que aparentemente ligam células adjacentes ou hifas. A outra particularidade é que os basidiósporos são normalmente balistosporos, ou seja, são ativamente lançados do basídio. A classificação dos *Agaricomycetes* é um pouco controversa. Antes consideravam-se três classes inseridas no Filo *Basidiomycota*: *Basidiomycetes*, *Teliomycetes* e *Ustomycetes*. Hoje, a designação *Basidiomycetes* torna-se antiquada e, quando utilizada, refere-se ao Filo *Basidiomycota*. Assim, os *Basidiomycetes* são atualmente classificados como *Agaricomycetes* (Carlile et al., 2001).

Existem várias ordens dentro dos macrofungos *Agaricomycetes* tais como os *Agaricales*, *Boletales*, entre outros (Tabela 1). Os fungos pertencentes à família *Trichololataceae* têm como características aspeto fibroso, chapéu, pé cilíndrico e esporos brancos. São abundantes os géneros *Lepista*, *Calocybe*, *Clitocybes*, *Pleurotus*, *Leucopaxillus* e *Marasmius*, mas também têm alguns fungos micorrízicos (*Tricholoma* e *Hygrophorus*) e parasíticos (*Armillaria*) (Rueda, 2007).

Tabela 1. Classificação dos fungos do Filo Basidiomycota (Kirk et al., 2008).

Reino	Filo	Sub-filo	Classes	Ordens	Famílias	Género
Fungi	Basidiomycota	Agaricomycotina	<i>Agaricomycetes</i>	<i>Agaricales</i>	<i>Trichololataceae</i>	<i>Lepista</i>
				<i>Atheliales</i>		
				<i>Auriculariales</i>		
				<i>Boletales</i>		
				<i>Cantharellales</i>		
				<i>Corticiales</i>		
				<i>Gastrales</i>		
				<i>Gomphales</i>		
				<i>Hymenochetales</i>		
				<i>Hysterangiales</i>		
				<i>Phallales</i>		
				<i>Polyporales</i>		
				<i>Russulales</i>		
				<i>Sebacinales</i>		
		<i>Thelephorales</i>				
		<i>Dacrymycetes</i>				
		<i>Tremellomycetes</i>				
		Pucciniomycotina	<i>Agaricostilbomycetes</i>			
			<i>Atractiellomycetes</i>			
			<i>Classiculomycetes</i>			
			<i>Cryptomycocolacomycetes</i>			
			<i>Cystobasidiomycetes</i>			
			<i>Microbotryomycetes</i>			
			<i>Mixiomycetes</i>			
			<i>Pucciniomycetes</i>			
		Ustilaginomycotina	<i>Exobasidiomycetes</i>			
<i>Entorrhizomycetes</i>						
<i>Ustilaginomyce</i>						

1.2. Produção de macrofungos

A produção mundial de cogumelos cultivados em 2000/2001 foi estimada por algumas autoridades em mais de 9 milhões de toneladas. Um estudo não oficial de 2001 indica uma produção de 7.818.000 toneladas de cogumelos cultivados na China. É de salientar que os números de produção em cada país não estão facilmente disponíveis

(Chang & Miles, 2004). No geral, a produção mundial de cogumelos aumentou mais de 12,5 por cento entre 1981 e 2002 (Web 4). Em Portugal a produção de macrofungos em 2009, já era considerável, com alguma variedade de cogumelos comestíveis produzidos e comercializados (Figura 4).

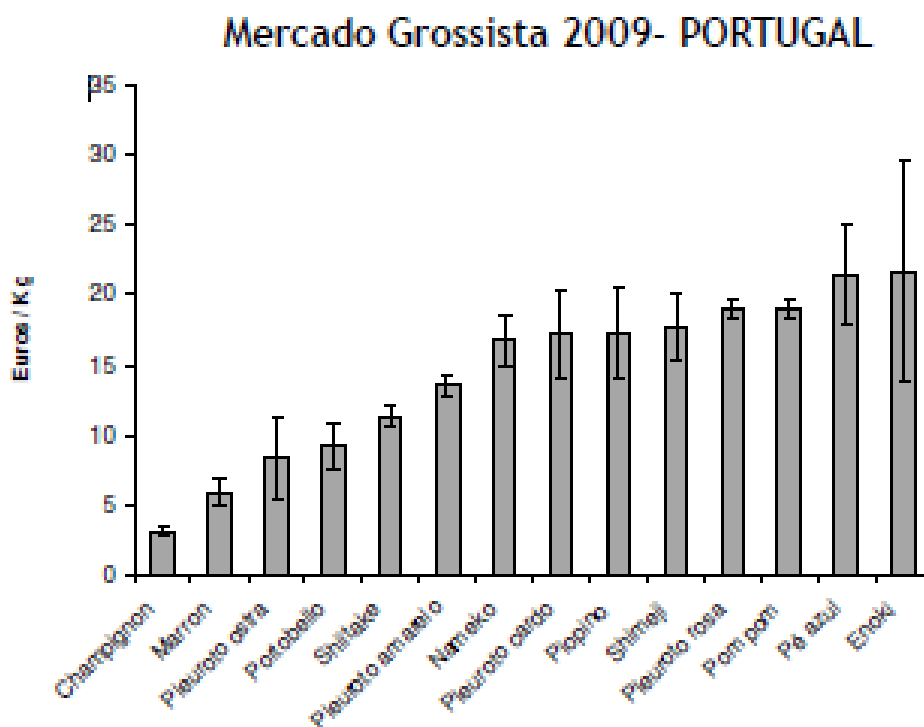


Figura 4. Produção de diversos macrofungos em Portugal (Quadrante Natural, 2010).

Em laboratório, a obtenção e estabelecimento de fungos, particularmente dos *Agaricomycetes*, é possível por excisão de porções do corpo frutífero e colocação destas em meio de cultura apropriado. O crescimento contínuo e ramificado das hifas resulta na produção de micélio indiferenciado na superfície e interior do meio de cultura com agar. Este processo de crescimento do micélio é um pouco invasivo mas é o mais eficiente para que os fungos se disseminem por todo o substrato. A colónia geralmente continua a crescer radialmente, a uma taxa uniforme até encontrar um impedimento (por exemplo, o bordo da caixa de Petri ou outra colónia). Contudo, a taxa de crescimento pode diminuir gradualmente e o crescimento pode mesmo cessar sem que todo o meio seja consumido. Este efeito pode dever-se à produção de metabolitos tóxicos nomeadamente, iões de hidrogénio ou amónia. No entanto é de referir, que em vez de se expandirem, como durante o crescimento pelo meio, as hifas podem agregar-se (Carlile et al., 2001). Não existe grande conhecimento sobre os fatores que levam a um

crescimento sincronizado das hifas em grupo. No entanto, especula-se que se baseia no desenvolvimento de hifas adjacentes, em que uma dada hifa é capaz de induzir a expressão génica de hifas adjacentes, através de secreções de mensageiros químicos (Moore, 1994).

A metodologia *in vitro* de cultura (produção de micélios) pode proporcionar diversas vantagens na obtenção e estudo de compostos bioativos, facilitando a sua extração e purificação o que aumenta o seu valor económico. Do ponto de vista ecológico, a cultura *in vitro* evita a sob exploração de espécies ameaçadas ou raras, o que representa uma metodologia promissora que salvaguarda a conservação sustentável e utilização racional da biodiversidade (Matkowski, 2008).

O meio de cultura utilizado para o desenvolvimento do fungo pode ser natural ou sintético. Um meio de cultura sintético tem uma fonte de carbono (normalmente um açúcar) e uma fonte de azoto (por exemplo, um sal amónio). A produção de metabolitos pode ser bastante sensível aos constituintes do meio de cultura, tal como às condições do meio ambiente quando *in vivo*; assim, os metabolitos produzidos por uma mesma espécie num determinado meio de cultura, podem ser diferentes quando desenvolvida num meio de cultura diferente (Hanson, 2008).

Os fungos, no decurso da evolução, diversificaram a exploração de uma grande variedade de *habitats*. Espécies diferentes, portanto, exigem diferentes condições de crescimento ideal. O modo como os fatores físicos e químicos afetam o crescimento de fungos diferentes tem que ser considerado. A temperatura, a concentração de iões de hidrogénio (pH), a humidade e a luz são alguns dos parâmetros que têm de ser mantidos e controlados (Carlile et al., 2001; Chang & Miles, 2004).

De todos os fatores que afetam o crescimento de fungos, a temperatura é certamente um dos mais importantes, e o mais frequentemente estudado. Os extremos de temperatura (máxima e mínima) são de grande importância na determinação da sobrevivência e na distribuição das espécies de fungos na natureza. A temperatura ótima para o crescimento, produção de metabolitos e esporulação são os fatores de interesse mais frequentes para os investigadores.

Um aumento na temperatura, geralmente, aumenta a atividade enzimática. Temperaturas altas resultam numa inativação enzimática, com um efeito resultante sobre o metabolismo e, conseqüentemente, sobre o crescimento. Por exemplo, a incapacidade de um fungo crescer a uma temperatura elevada pode ser o resultado da sua incapacidade para sintetizar uma determinada enzima.

Os fungos são classificados de acordo com as suas temperaturas ideais:

- ✓ Psicrófilos - com um mínimo de crescimento abaixo de 0 °C, um ótimo na faixa de 17 °C, e a ausência de crescimento a temperaturas superiores a 20 °C;
- ✓ Mesófilos - com mínimo de crescimento acima de 0 °C, máximo abaixo de 50 °C, e a ótima entre 15 e 40 °C (sendo este o maior grupo);
- ✓ Termófilos - com mínima acima de 20 °C, máxima de 50 °C ou superior e ótima em torno de 35 °C ou superior. (Chang & Miles, 2004).

O pH também tem grandes efeitos sobre o desenvolvimento morfológico. Em geral, a maioria dos fungos cresce melhor num meio ligeiramente ácido, normalmente numa gama de pH 4 a pH 8. Naturalmente, a gama de pH pode variar de espécies para espécie. Os fungos estão aptos para lidar com mudanças de pH externo, reagindo melhor do que as células de plantas ou de animais nos seus ambientes protegidos. Nos fungos, o pH citoplasmático varia muito pouco ao longo de uma vasta gama de valores de pH extremos. Não está completamente esclarecido como o pH citoplasmático é estável próximo da neutralidade. Existe uma falta de informação sobre o efeito do pH no crescimento de fungos, ao contrário de uma literatura considerável sobre o crescimento em relação ao pH inicial do meio. A concentração hidrogeniônica num meio pode afetar o crescimento indiretamente, pelo seu efeito na disponibilidade de nutrientes, ou diretamente através de uma ação sobre as superfícies celulares. É provável que, sendo satisfeitos os requisitos nutricionais, a maioria dos fungos se desenvolva bem numa ampla gama de pH desde ácido até à neutralidade, por exemplo, pH 4-7. Alguns fungos, tais como os que produzem ácidos orgânicos, são capazes de tolerar mais condições de acidez (Carlile et al., 2001; Chang & Miles, 2004).

Os fungos, na sua maioria, são expostos a períodos alternados de luz e escuridão. Alguns, contudo, estão situados na escuridão do solo (trufas) ou dentro dos tecidos de um hospedeiro. O crescimento da maioria dos fungos não é sensível à luz, no entanto, luz forte pode inibir o seu crescimento (possivelmente devido a um efeito de temperatura). Tem sido reportado que esta inibição por uma luz forte pode ser eliminada pela adição de compostos biológicos ao meio, tais como extrato de levedura. Uma possível interpretação deste fenómeno é a de que a luz pode destruir certas vitaminas. O papel mais importante da luz no crescimento de fungos está relacionado com a

formação de estruturas reprodutivas. O desenvolvimento dos corpos frutíferos de *Basidiomycetes* é, muitas vezes, acionado pela luz (Chang & Miles, 2004).

A maioria dos fungos, principalmente *Basidiomycetes*, necessita de altos níveis de humidade (e.g. uma humidade relativa de 95 a 100% e um teor de humidade do substrato entre os 50 e 75%) (Chang & Miles, 2004).

1.3. O macrofungo *Lepista nuda*

O macrofungo *Lepista nuda*, (Bull. ex Fr). Cooke também conhecido como *Clitocybe nuda* e, vulgarmente por “Pé-azul”, pertence ao filo *Basidiomycota*, à classe *Basidiomycetes*, à ordem *Agaricales*, à família *Tricholomataceae* e ao género *Lepista* (Figura 5). Encontra-se habitualmente em montados, prados e florestas naturais, azinheiras e sobreiros, o seu período de frutificação é no Outono, Inverno e Primavera; sabe-se também que é saprófita/decompositor. É um fungo comestível, o que lhe confere um interesse comercial devido não só, ao seu valor nutricional, mas também ao seu intenso e característico aroma (Rueda, 2007).



Figura 5. Macrofungo *Lepista nuda* (Web 5).

É o segundo fungo comestível mais popular na Europa Central. Na França, tem um potencial económico bastante considerável (Stott et al., 2005). Já em Portugal, apesar de não ser uma referência de produção em grande quantidade (Figura 4), é o segundo cogumelo mais caro.

Trata-se de um cogumelo comestível que apresenta inúmeras qualidades organolépticas, incluindo um sabor delicado e uma boa conservação pós-colheita, aspetos importantes que influenciam as vendas e os preços dos cogumelos (Guinberteau et al.,

1989). O seu aroma forte, a sua textura e coloração violeta apresentam alguma originalidade que estimula o consumo e, até mesmo, o cultivo deste cogumelo (Audouin et al, 1989, Noel-Suberville, 1996). O corpo frutífero de *L. nuda* contém vitamina B1, triterpenoides, esteróis e compostos organo-halogenados. A sua infusão é utilizada para prevenir o beribéri, enquanto a decoção é utilizada para o tratamento de abscessos e feridas. O extrato metanólico revelou propriedades antimicrobianas (Dulger, et al, 2022; Barros et al., 2008) e antioxidantes (Elmastas et al., 2007; Barros et al., 2008).

Importa ainda destacar que, segundo vários autores, as propriedades químicas ou bioativas dos macrofungos podem ser afetadas pelo *habitat* em que cresceram (Nikkarinen & Mertanen, 2004; Pereira et al., 2012).

1.4. Compostos voláteis em macrofungos

Alguns compostos voláteis nos cogumelos contribuem para as suas propriedades organoléticas; outros comportam-se como atraentes de insetos ou impedem a nutrição do fungo. Existem ainda outros compostos que contribuem para a relação de um fungo com os seus concorrentes.

Embora os voláteis, nomeadamente monoterpenos e compostos aromáticos simples, sejam produzidos por fungos, são mais abundantes em plantas. Os fungos produzem diferentes proporções dos componentes comuns voláteis. Alguns organismos têm um odor característico que pode ser usado para os identificar. A tecnologia de espectrometria de massa acoplada com nariz eletrónico tem sido utilizada para rapidamente revelar a presença de fungos indesejados em alimentos tais como cereais e produtos de panificação (Hanson, 2008).

Os óleos essenciais, também designados por essências, são misturas complexas de inúmeros compostos voláteis com propriedades odoríferas e outras características de interesse para o Homem. Atualmente, o consumo de óleos essenciais é tão impercetível quanto omnipresente, mas a sua importância pode ser comprovada pelas 45 000 a 50 000 toneladas que são produzidas e transacionadas anualmente. A nível mundial, o valor económico dos óleos essenciais reflete-se nos óleos que são obtidos para usos terapêuticos (farmacológicos), perfumarias, cosmética, indústrias alimentares, fabrico/produção de sabonetes, detergentes, entre outros. A variabilidade química dos compostos voláteis advém dos diversos fatores que influenciam a sua biossíntese, existindo mesmo quimiotipos definidos pelas percentagens de óleos essenciais com

composições muito distintas. Esses fatores são de natureza diversa: alguns como os ambientais ou edáficos e outros da fisiologia dos seres vivos que os produzem. A insolação, a relação temperatura, humidade do ar e o tipo de solo são, dos fatores edafoclimáticos, os que mais afetam a produção dos óleos essenciais (Cunha, 2005; Cunha et al, 2007).

A indústria recorre a diversas metodologias para extrair os compostos voláteis dos seres vivos. A destilação é das metodologias mais usadas para a extração dos compostos voláteis. O conceito de óleo essencial, enquanto mistura volátil obtida por destilação, é ultrapassado e outros métodos de extração são utilizados para o isolamento de compostos voláteis com vista a diferentes estudos. A hidrodestilação é a metodologia mais utilizada; por um lado, porque permite a diferença de escalas, permite reproduzir as técnicas usadas nos processos industriais e obter óleos essenciais com características similares, mas por outro lado porque os destiladores são isentos de compostos orgânicos, simplificando os processos de preparação de amostras para fins analíticos. A simplicidade e funcionamento do destilador proposto para esse fim, o aparelho *Clevenger* modificado inscrito na Farmacopeia Portuguesa VIII (Figura 6), fez com que fosse bem aceite pelos investigadores. Outra metodologia usada é a destilação-extração em aparelho de *Likens-Nickerson* (LN) (Figura 7), técnica usada neste trabalho. Nesta técnica, o vapor gerado na hidrodestilação é sujeito a extração pelo vapor de um solvente orgânico apolar de baixo ponto de ebulição e imiscível com a água (e.g., o pentano). Durante o processo, os compostos voláteis são arrastados pelo vapor de água e retirados da fase orgânica, o que limita os artefactos e as perdas devidas ao refluxo da fase aquosa condensada e à cristalização nas superfícies do condensador. No entanto, não evita a decomposição de compostos termolábeis mas tem a desvantagem, em relação à hidrodestilação, do óleo essencial ser obtido em solução e que, para ser recuperado, implica a remoção do solvente (Cunha, 2005).



Figura 6. Aparelho de *Clevenger* modificado.

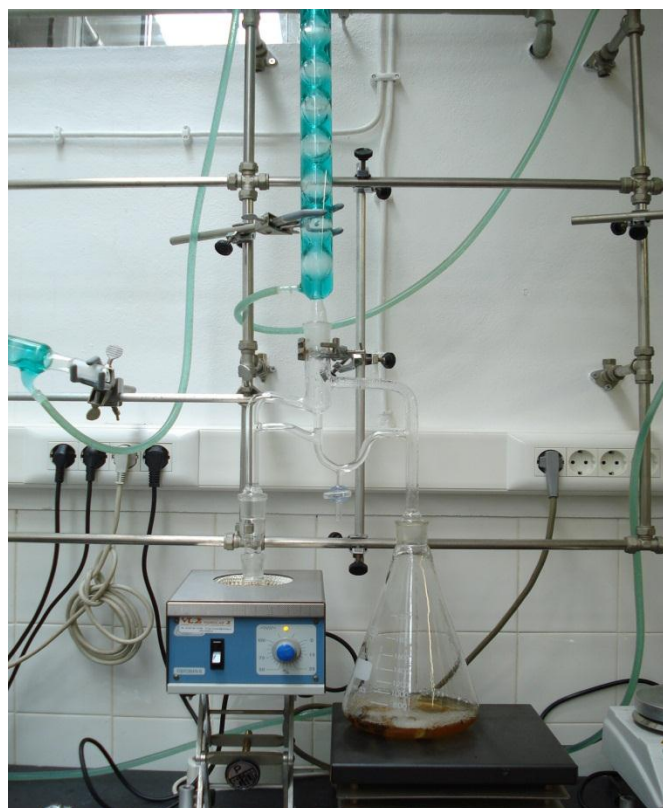


Figura 7. Aparelho de destilação-extração *Likens-Nickerson*.

Como referido anteriormente, os óleos essenciais são misturas complexas de compostos voláteis, muitas vezes com centenas de constituintes de todas as classes

funcionais e onde coexistem isómeros geométricos, posicionais e óticos, com propriedades físicas e químicas similares. Para além das dificuldades que decorrem da complexidade química, também acrescem as que resultam da existência frequente de um elevado número de componentes minoritários e vestigiais que podem ser responsáveis pelas propriedades biológicas e sensoriais. Assim, a escolha da metodologia analítica depende da finalidade do estudo. Devido à enorme diversidade e complexidade das misturas, por norma, a análise envolve duas etapas sequenciais, como o fracionamento das amostras e/ou a individualização de constituintes, geralmente, por recurso a métodos cromatográficos, seguidos de processos analíticos, químicos ou espectroscópicos nas frações ou compostos isolados. O recurso a um único método pode não ser suficiente para viabilizar a melhor análise e garantir a obtenção máxima de informação sobre a composição da amostra (Cunha, 2005).

Atualmente, a cromatografia gasosa (GC) é o método mais comum na separação de compostos permitindo a análise até a um máximo de 1500 unidades de massa; os compostos com massa molecular muito baixa, considerados gases permanentes (até às 200 unidades de massa), são considerados compostos voláteis e, a partir destas unidades, são compostos semi-voláteis. Segundo Marriott (2001), a GC é o método analítico mais apropriado para a separação dos compostos dos óleos essenciais apesar das inúmeras estruturas com diferentes modificações químicas que levam a sobreposições nos índices de retenção. Esta metodologia de separação é complementada com a espectrometria de massa (GC-MS) para identificação dos compostos, metodologia também usada neste trabalho para identificação de compostos voláteis. Os cogumelos têm sido muito utilizados como alimento ou materiais aromatizantes por causa do seu excepcional sabor/odor e, por essa razão, têm sido extensivamente estudados (Wojtasiak, 2004). Os compostos voláteis presentes nos cogumelos têm sido também investigados, com a identificação de quase 150 compostos voláteis diferentes em várias espécies. Entre os diversos componentes voláteis, uma série de compostos alifáticos C8 (compostos oxigenados), tais como o 1-octen-3-ol (Figura 8), 2-octen-1-ol, 3-octanol, 1-octanol, 1-octen-3-ona e 3-octanona, foram referidos como sendo os principais responsáveis pelas características de sabor dos cogumelos. Os perfis dos componentes voláteis podem variar com as espécies, mas também podem ser influenciados pelas condições de cultivo/*habitat* (Cho et al., 2008). Alguns aromas típicos agradáveis ou desagradáveis de cogumelos são também devido a compostos alifáticos, aromáticos e heterocíclicos voláteis, por exemplo, sulfureto de dimetilo,

benzaldeído, álcool benzílico, (*E*)-2-nonenal, lactonas e escatol (3-metilindole) (Breheret et al., 1997).

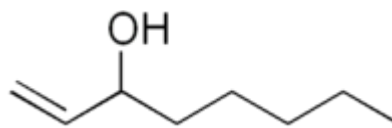


Figura 8. Estrutura química do 1-octen-3-ol (Web 6).

1.5. Macrofungos como fonte de compostos bioativos

Do ponto de vista nutricional, os cogumelos são conhecidos em todo o mundo por serem ricos em água, minerais, proteínas, fibras e glúcidos, e por serem alimentos de baixo teor calórico, devido ao reduzido teor em lípidos. Existem disponíveis na literatura vários estudos que descrevem a análise de nutrientes em diferentes espécies de cogumelos provenientes de todo o mundo (Kalač, 2009; Ouzouni et al., 2009). Em Portugal, o grupo de investigação em que se inseriu este trabalho, tem-se dedicado ao estudo de espécies provenientes do Nordeste de Portugal, uma das regiões europeias com maior biodiversidade de cogumelos silvestres, a maioria deles com grande importância gastronómica (Barros et al., 2007; Barros et al., 2008; Heleno et al., 2009; Heleno et al., 2011; Pereira et al., 2012). Além disso, vários estudos concluíram que os cogumelos possuem compostos bioativos nomeadamente antioxidantes: compostos fenólicos, tocoferóis, ácido ascórbico e carotenoides (Ferreira et al., 2009). Por essa razão, os cogumelos têm sido reconhecidos como alimentos funcionais e como fonte para o desenvolvimento de medicamentos e nutracêuticos.

Dos compostos fenólicos fazem parte um grande grupo de compostos como: ácidos fenólicos, cumarinas e flavonoides, que na sua maioria são antioxidantes. Os compostos fenólicos são produtos naturais que derivam das vias do xiquimato e do acetato, podendo assim conter moléculas muito simples, como os ácidos fenólicos, ou moléculas complexas, como lenhinas (Bravo, 1998). Vários estudos têm revelado que os ácidos fenólicos são os principais compostos fenólicos nos cogumelos (Ferreira et al., 2009).

A eficácia de um antioxidante fenólico natural depende da reação do hidrogénio fenólico, isto é da estabilidade do radical que se forma durante a reação, mas também da substituição química presente na estrutura da molécula (Hall, 2001; Wright et al., 2001).

Os tocoferóis, mais conhecidos por vitamina E, podem ser encontrados em alimentos “gordos”, pois é uma vitamina lipossolúvel. Estruturalmente tem um anel cromanol e uma cadeia lateral de unidades isopreno. Na natureza, pode ser encontrada de quatro formas diferentes: α -, β -, γ - e δ - tocoferóis (Figura 9), sendo o α - tocoferol a forma antioxidante mais amplamente distribuída. Os tocoferóis têm sido reconhecidos como um dos mais importantes antioxidantes, isto deve-se à sua capacidade de captar radicais, isto é, eles inibem a produção de radicais peróxido lipídicos produzidos por espécies reativas de oxigénio (ROS), protegendo assim as células da peroxidação dos ácidos gordos polinsaturados (PUFA) (Fang et al., 2002; Pinto, 2010).

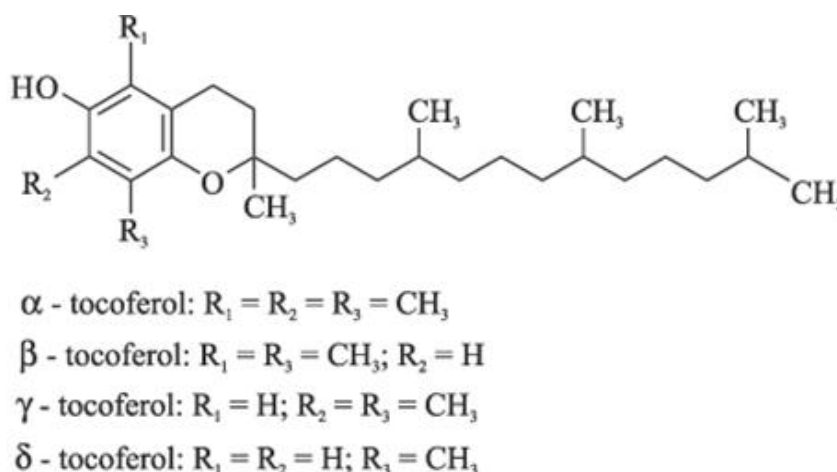


Figura 9. Estrutura química dos tocoferóis.

Os carotenoides são, de uma maneira geral, tetraterpenos que compreendem compostos formados por ligações de oito unidades isoprénicas, que possuem no mínimo dez duplas ligações conjugadas, o que lhe confere uma grande sensibilidade à oxidação e a sua tonalidade característica, amarela ou laranja. Estes compostos podem ser ainda acíclicos, como por exemplo o licopeno ($\text{C}_{40}\text{H}_{56}$), composto apenas constituído por carbonos e hidrogénios, mas também terem na sua composição um ou dois anéis penta ou hexacíclicos numa das extremidades ou nas duas.

Do ponto de vista químico, os carotenoides podem dividir-se em carotenos, compostos só com carbonos e hidrogénios (e.g., licopeno, referido anteriormente) e os

seus derivados oxigenados, as xantofilas. Os carotenoides são corantes naturais, que podem ser encontrados nos alimentos com pigmentação amarela, laranja ou vermelha (tomates, laranjas, abóboras, entre outros). Alguns carotenoides, além de serem precursores de vitamina A (retinol), possuem propriedades antioxidantes e melhoram a resposta imunológica (Cunha, 2005; Pinto, 2010).

As propriedades antioxidantes dos carotenoides fundamentam-se na sua estrutura, principalmente no sistema de ligações duplas conjugadas (Cunha, 2005), tornando possível a captação de radicais livres, principalmente o radical peróxido (LOO[•]) (Young & Lowe, 2001; Tapiero et al., 2004). Atualmente existe interesse no estudo dos antioxidantes devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo, pois a oxidação é parte importante da vida de muitos organismos nomeadamente, durante a produção de energia que ocorre nos processos biológicos. Os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica (Barreiros et al., 2006).

Assim, um radical livre é definido como qualquer átomo ou molécula que possui elétrons desemparelhados na orbital exterior (Gutteridge & Halliwell, 2000). Os radicais livres de oxigénio e de azoto, ou mais genericamente, espécies reativas de oxigénio (ROS) e de azoto (RNS) são os produtos do metabolismo celular, em condições normais. Estes radicais são muito instáveis e muito reativos (Miller et al., 1990). As ROS e RNS têm características benéficas e prejudiciais nos organismos vivos. Em concentrações baixas atuam nas respostas celulares a danos infecciosos e na indução de respostas mitogénicas, sendo benéficas para os organismos. Os efeitos prejudiciais traduzem-se no stresse oxidativo e nitrosativo que ocorrem quando há uma sobreprodução de ROS e RNS, ou quando não existem antioxidantes enzimáticos ou estão em concentrações muito baixas (Valko et al., 2007). O equilíbrio da produção de radicais livres e das defesas antioxidantes (enzimáticas e não enzimáticas), são uma condição importante para o normal funcionamento do organismo.

O excesso de radicais livres, como já referido, é prejudicial, pois pode provocar danos ao nível dos lípidos celulares, proteínas e DNA, o que afeta o funcionamento dito normal das células, gerando inúmeras doenças. Assim, a presença de antioxidantes numa dieta rica de vegetais e fruta com vitaminas A, C e E, carotenoides, polifenóis e flavonoides pode ajudar o sistema de defesa endógeno, a reduzir os danos oxidativos (Temple, 2000; Fang et al., 2002; Liu, 2003).

Não só os corpos frutíferos, mas também os micélios acumulam vários dos compostos bioativos referidos (Lindequist et al., 2005) que podem ser isolados para posteriores utilizações.

1.6. Objetivos

No presente trabalho estudaram-se exemplares (corpos frutíferos) comerciais e silvestres de *Lepista nuda* provenientes de diferentes *habitats* – carvalhal, pinhal e prado (amostras *in vivo*), bem como o micélio produzido *in vitro* a partir desses exemplares.

Os principais objetivos foram:

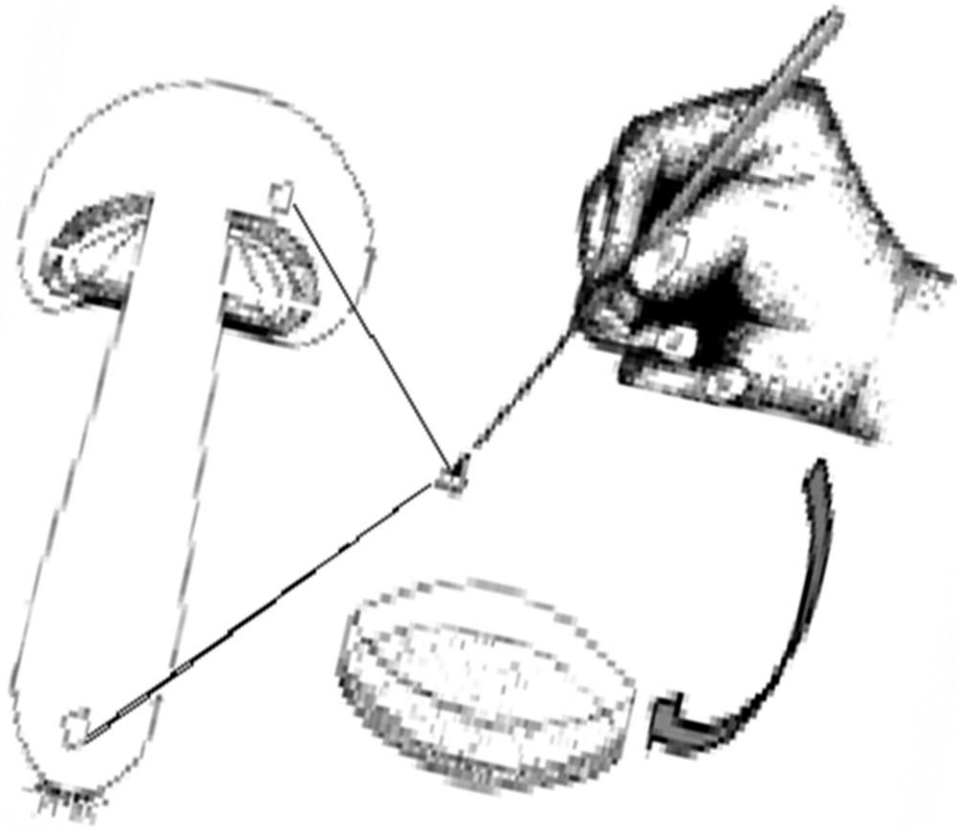
i) Estabelecer as condições ótimas para a cultura *in vitro* de *Lepista nuda*, com base nas curvas de crescimento do micélio, obtidas a partir do crescimento radial e das massas fresca e seca;

ii) Caracterizar os voláteis das amostras obtidas *in vivo* e *in vitro* após destilação-extração Likens-Nickerson (LN); a análise dos voláteis foi feita por cromatografia gasosa (GC) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).

iii) Caracterizar os ácidos gordos, açúcares, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e tocoferóis das mesmas amostras após extração sólido-líquido e análise por cromatografia gasosa acoplada a deteção por ionização de chama (GC-FID) ou cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a deteção por índice de refração (RI), díodos (DAD) ou fluorescência.

iv) Avaliar as propriedades antioxidantes, utilizando técnicas químicas e bioquímicas: poder redutor, efeito captador de radicais livres e inibição da peroxidação lipídica em homogeneizados cerebrais.

Em suma, foi feita uma comparação dos resultados da composição química e do potencial antioxidante de corpos frutíferos de *Lepista nuda* provenientes de diferentes *habitats*, e do seu micélio obtido por cultura *in vitro* usando distintos meios de cultura.



Capítulo II

II. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material biológico e preparação das amostras

2.1.1. *Corpos frutíferos silvestres e comerciais*

Os exemplares (corpos frutíferos) da espécie de cogumelo silvestre *Lepista nuda* (Figura 10) foram obtidos em diferentes *habitats*: prado, pinhal e carvalhal, na região de Bragança (Nordeste Transmontano), no outono de 2010 e 2011 e na primavera de 2011. As espécies comerciais foram obtidas num supermercado local, em setembro de 2011. A identificação taxonómica dos esporocarpos foi realizada de acordo com Moser (1983), sendo depositados exemplares no herbário da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança. As amostras dos corpos frutíferos foram liofilizadas (FreeZone 4.5 model 7750031, Labconco) e por fim reduzidas a pó.



Figura 10. Frutificações de *Lepista nuda* (Web 7).

2.1.2. *Produção in vitro do micélio*

O micélio, obtido através do esporocarpo de cada corpo frutífero (Figura 11) em condições de assepsia em câmara de fluxo laminar, foi isolado em cinco meios de cultura diferentes: meio sólido *Melin-Norkans* modificado (MMN completo; Anexo 6.1) pH 6,6 (Marx, 1969), meio sólido incompleto (MMN incompleto; Anexo 6.2) pH 6,6

(Marx, 1969), meio *Potato Dextrose Agar* (PDA; Anexo 6.3) pH 5,6 (Biolab), meio *Pachlewski* (PACH; Anexo 6.4) pH 5,4 (Pachlewski & Pachlewski, 1974), e meio *Ferry & Das* (FAD; Anexo 6.5) pH 5,0 (Ferry & Das, 1968). As amostras foram mantidas em placas de Petri (8 cm de diâmetro) contendo os meios referidos anteriormente e foram armazenados no escuro, à temperatura de 25°C.

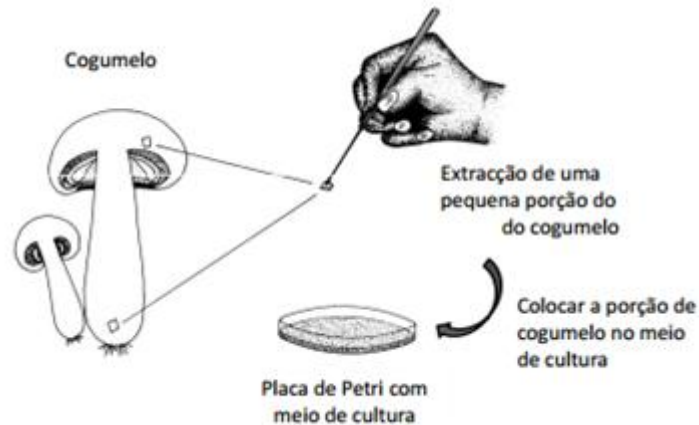


Figura 11. Excisão de porções do corpo frutífero (Quadrante Natural, 2010).

Depois da incubação, o crescimento contínuo e ramificado das hifas resultou na produção de micélio indiferenciado na superfície e interior do meio de cultura (Figura 12).

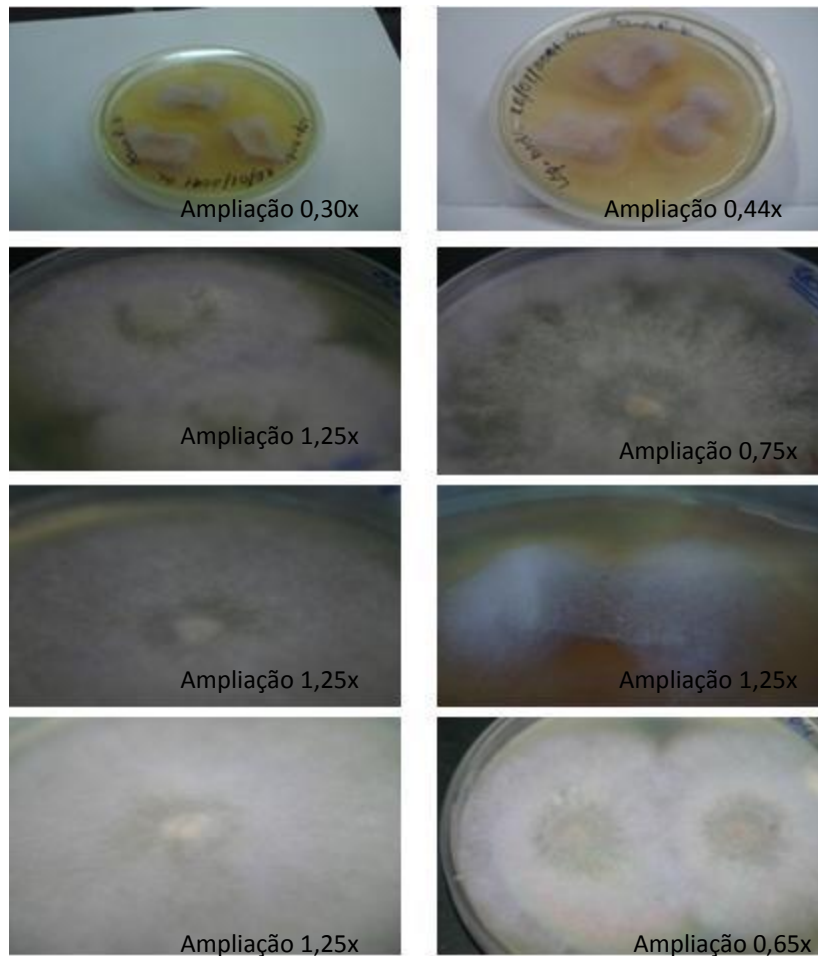


Figura 12. Crescimento contínuo e ramificado das hifas nos diferentes meios de cultura.

2.2. Avaliação do crescimento do micélio em diferentes meios de cultura sólidos

2.2.1. Determinação da curva de crescimento do micélio de *Lepista nuda* com base no raio obtido em diferentes meios de cultura sólidos

Na determinação da curva de crescimento em diferentes meios de cultura, usaram-se os meios anteriormente referidos (MMN completo; MMN incompleto; PACH; FAD e PAD). Transferiu-se o micélio das amostras de *L. nuda* obtidas em prado e comerciais, de placas em que o inóculo se encontrava em crescimento em meio de cultura MMN completo, para placas de 8 cm de diâmetro. Em cada placa, com os meios de cultura referidos anteriormente, foi colocado um inóculo, no centro destas, recorrendo ao auxílio de um bisturi estéril numa câmara de fluxo laminar em condições de assepsia. O inóculo era de pequeno diâmetro (~0,5 cm). As placas foram

devidamente identificadas, marcadas e divididas em quatro partes (R1, R2, R3 e R4; em que cada raio media cerca 4 cm), para efetuar as medições (Figura 13).

A primeira medição foi efetuada ao fim de três dias, e posteriormente, de dois em dois dias. A medição do crescimento terminou quando o micélio atingiu o limite da placa de Petri, 8 cm de diâmetro (Figura 14).

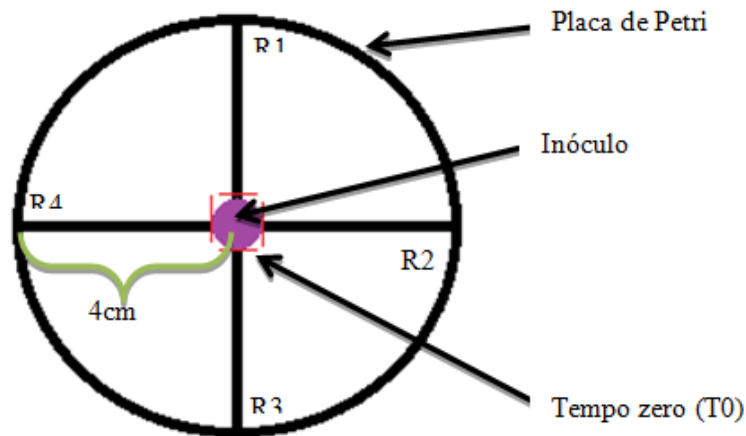


Figura 13. Esquema representativo do procedimento usado na placa de Petri para a determinação da curva de crescimento do micélio de *Lepista nuda*.

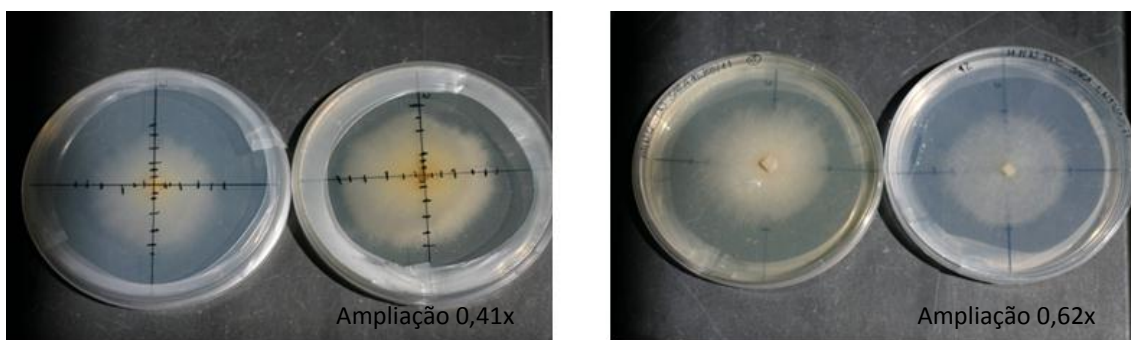


Figura 14. Determinação da curva de crescimento do micélio de *Lepista nuda* em diferentes meios de cultura.

Obteve-se a média dos dados e realizou-se uma análise da Taxa Relativa de Crescimento (TRC) a partir da fórmula (Coelho, 1999):

$$TRC \text{ (cm cm}^{-1} \text{ dia}^{-1}) = \frac{\frac{1}{cw_1} \times cw_2 - cw_1}{n^\circ \text{ de dias de crescimento}}$$

Sendo cw_1 = Inóculo inicial usado, ($T_0=0,25$ cm) e cw_2 = Crescimento do micélio por raio ao fim de 21 dias e o Número de dias de crescimento= 21 dias.

A determinação da curva de crescimento foi realizada pela média dos quatro raios, nos diferentes meios, referidos anteriormente.

Sendo cw_1 = Inóculo inicial usado, ($T_0= 0,25$ cm) e cw_2 = Crescimento do micélio por raio ao fim de 21 dias e o Número de dias de crescimento= 21 dias. A determinação da curva de crescimento foi realizada pela média dos quatro raios, nos diferentes meios referidos anteriormente.

2.2.2. Determinação da curva de crescimento do micélio de *Lepista nuda* com base nas massas fresca e seca obtidas em diferentes meios de cultura sólidos

Na determinação da curva de crescimento, por massa de micélio em crescimento (massa fresca e massa seca), os meios de cultura e as amostras usadas foram as mesmas referidas anteriormente: MMN completo, MMN incompleto, PACH, FAD e PDA; e amostras de *L. nuda* provenientes de prado e comerciais. Em cada placa de Petri, aplicou-se uma película de celofane para assim poder facilmente separar o micélio do meio de cultura (Figura 15).

Para a realização do procedimento, o inóculo usado foi retirado de placas com meio MMN completo. Determinou-se a massa inicial do inóculo (no tempo zero). Foi, posteriormente, colocado em placas de 8 cm de diâmetro devidamente identificadas.

Determinou-se a massa ao fim de 72h (3 dias) e, depois, de 48 em 48h (2 dias) durante três semanas (21 dias). Em cada pesagem de micélio fresco (massa fresca, fw), removeu-se a película de celofane e colocou-se numa estufa, a 60°C durante 72h para obter a massa seca (dw) da amostra.

A determinação da curva de crescimento nos diferentes meios de cultura foi obtida pela massa fresca e seca do micélio, a partir da média obtida nos diferentes dias de crescimento. Construíram-se gráficos com a massa média fresca e seca nos diferentes meios de cultura e nas diferentes amostras referidas anteriormente.

Calculou-se a Taxa Relativa de Crescimento (RGR) (Coelho, 1999), a partir da fórmula:

$$RGR \text{ (g g}^{-1} \text{ dia}^{-1}\text{)} = \frac{\frac{1}{dw_1} \times dw_2 - dw_1}{n^\circ \text{ de dias de crescimento}}$$

Sendo dw_1 = massa seca no 1º semana e dw_2 = massa seca na última semana.

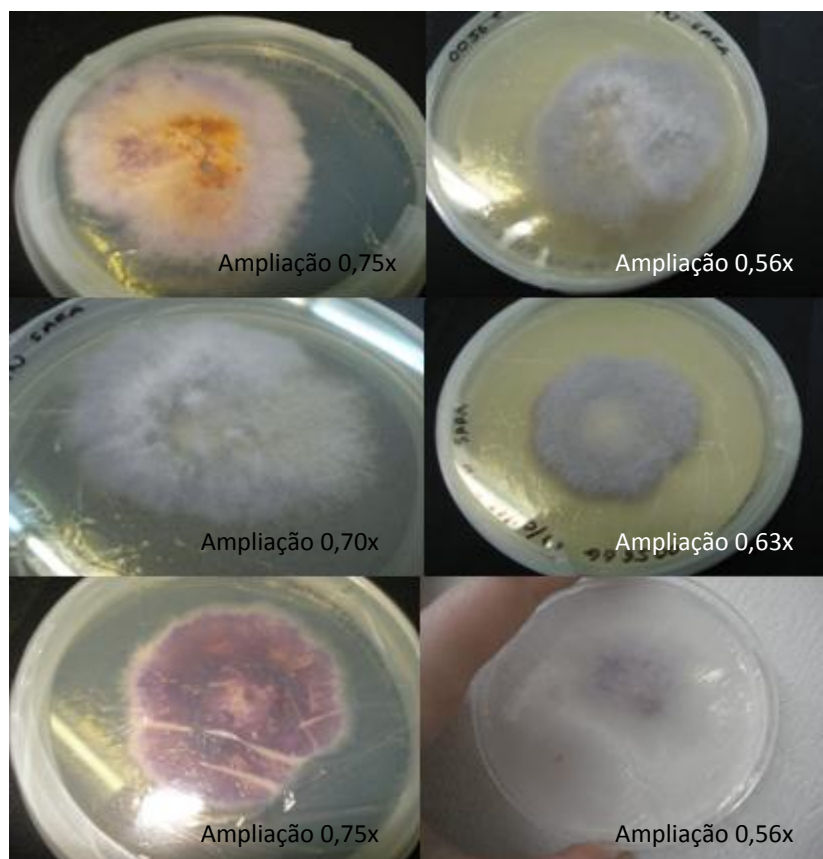


Figura 15. Inóculo em celofane usado na determinação das massas de micélio.

2.2.3. Aplicação de condições de stresse à amostra comercial em diferentes meios de cultura sólidos

Inóculos de micélio da amostra comercial foram colocados em 20 placas de Petri com diferentes meios de cultura (MMN completo, MMN incompleto, PACH, FAD e PDA). 10 Placas de Petri com o inóculo foram colocadas numa estufa a 37°C e as restantes 10 foram colocadas num frigorífico a 4°C (mantidas no escuro durante 30 dias) (Figura 16), tendo-se verificado as suas condições de manutenção e a reação dos

inóculos às condições de stresse. Após 30 dias, as placas foram colocadas à temperatura ambiente durante mais 22 dias, no escuro.

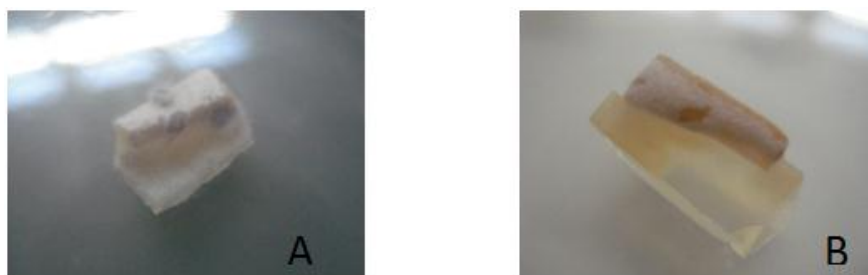


Figura 16. Inóculos de micélio a diferentes temperaturas: (A) frio 4 °C; (B) quente 37 °C, (ampliação 2x para a da esquerda e 3x para a da direita).

Os resultados foram posteriormente obtidos por registo de crescimento ou não crescimento do micélio.

2.3. Padrões e Reagentes

O reagente utilizado na destilação-extração (LN), foi o *n*-Pentano a 99,62% (Fisher Scientific) que, antes de ser utilizado foi destilado. Os solventes acetonitrilo 99,9%, *n*-hexano 95% e acetato de etilo 99,98%, de grau HPLC, foram fornecidos pela Lab-Scan (Lisboa, Portugal). A mistura padrão com 37 ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) (norma 47885-U) foi adquirida na Sigma (St. Louis, MO, EUA), assim como outros isómeros individuais de ácidos gordos e, padrões de açúcares (D(-)-frutose, D(+)-glucose anidra, D(+)-manitol e D(+)-trealose), tocoferóis (isoformas α -, β -, γ - e δ -), ácidos orgânicos (ácidos cítrico, fumárico, málico, oxálico e quínico), compostos fenólicos (ácidos gálico, *p*-hidroxibenzoico e cinâmico), e trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico). O tocol racémico, 50 mg/mL, foi adquirido na Matreya (PA, EUA). O 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) foi obtido na Alfa Aesar (Ward Hill, MA, EUA). Todos os outros produtos químicos e solventes usados eram de grau analítico e foram adquiridos a partir de fontes comuns. A água foi tratada com um sistema de purificação Milli-Q (TGI Pure Water Systems, EUA).

2.4. Determinação de voláteis obtidos por destilação-extração Likens-Nickerson (LN)

Os compostos voláteis presentes nos corpos frutíferos e micélios foram extraídos num destilador *Likens-Nickerson* (Figura 17). A temperatura da extração do pentano foi ajustada à fervura e o condensador ajustado à temperatura constante de 5°C. Após a extração dos voláteis em condições constantes por 3h foi recolhido o pentano destilado com os óleos dissolvidos, condensada a amostra num evaporador rotativo (BÜCHI 461 Water Bath, made in Switzerland) e recolhida em vial com teflon, congelada e posteriormente analisada. A análise foi efetuada por cromatografia gasosa (GC) e cromatografia gasosa espectrometria de massa (GC-MS). Embora se tenham extraído compostos voláteis a partir de corpos frutíferos e micélio, foi apenas possível a análise e identificação dos compostos nas amostras de corpos frutíferos. Por falta de tempo tendo-se no entanto conservado essas amostras para posterior análise, já não no âmbito desta tese.



Figura 17. Destilador de Likens-Nickerson.

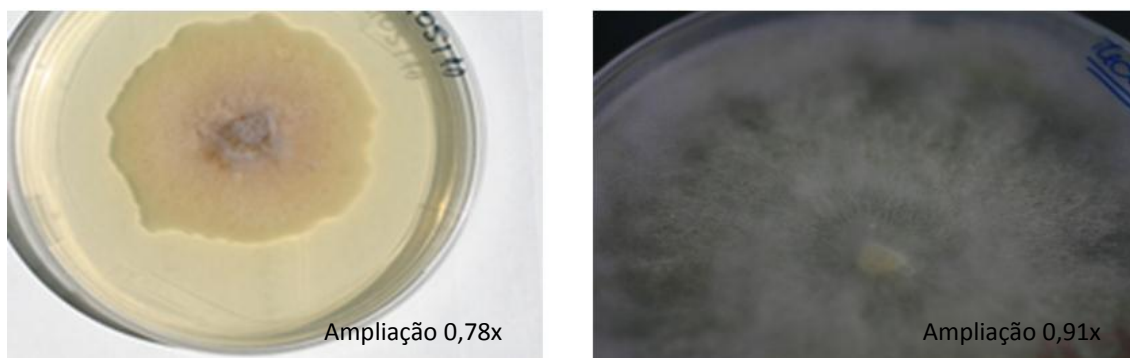


Figura 18. Micélio da amostra comercial de *Lepista nuda* utilizada para extração de compostos voláteis.

Os voláteis isolados foram analisados usando um cromatógrafo Perkin Elmer Autosystem XL (Perkin Elmer, Shelton, CT) equipado com dois detetores de chama (FID), sistema de tratamento dos dados e um injetor de vaporização no qual foram instaladas duas colunas de diferente polaridade:

- DB-1 de sílica fundida, de fase imobilizada em metilsilicone (30 m × 0,25 mm d.i. espessura de filme 0,25 µm; J & W Scientific Inc.);
- DB-17HT de fase imobilizada em fenilmetilsilicone (30 m × 0,25 mm d.i., espessura de filme de 0,15 µm; J & W Scientific Inc.).

A temperatura do forno foi programada de 45°C a 175°C, com incrementos de 3°C/min, e subsequentemente a 15°C/min até 300°C. Atingidos os 300°C a temperatura foi mantida durante 10 min. As temperaturas do injetor e dos detetores foram programadas para 280°C e 300°C, respetivamente. Foram injetados volumes de amostras na ordem dos 0.1 µl. O hidrogénio foi utilizado como gás de arrastamento, ajustado para uma velocidade linear de 30cm/s e utilizada uma relação de repartição de fluxo 1:50. A composição percentual dos óleos foi determinada pela integração das áreas dos picos sem utilização de fatores de correção. Os valores apresentados correspondem ao valor médio de duas injeções.

Nas análises de GC-MS, utilizou-se um cromatógrafo Perkin Elmer Autosystem XL, equipado com uma coluna de sílica fundida DB-1 (30 m × 0,25 mm d.i., espessura de filme 0,25 µm; J & W Scientific Inc.) ligado a um espectrómetro de massa Perkin Elmer Turbomass (versão do software 4.1). A temperatura do forno foi programada de 45°C a 175°C, com incrementos de 3°C/min, e subsequentemente a 15°C/min até 300°C. Atingidos os 300°C a temperatura foi mantida durante 10 min. O injetor foi programado para uma temperatura de 300°C, a linha de transferência para 280°C e a câmara de

ionização para os 220°C. Foi utilizado o hélio como gás de arrastamento, ajustado para uma velocidade linear de 30cm/s. As amostras foram injetadas com uma repartição de fluxo de 1:40, foi utilizada uma energia de ionização de 70 eV, a corrente de ionização de 60 μ A e uma gama de massas, 40-300 u. O tempo de varrimento foi de 1 s, sendo injetados volumes da ordem de 0,1 μ l. A identidade dos compostos foi determinada por comparação dos seus índices de retenção, relação à série de C9-C13 n-alcanos na coluna DB-1, e espectros de massa, com os padrões comerciais e compostos de referência presentes em óleos existentes no laboratório e por comparação com uma biblioteca de espectros de massa desenvolvida no laboratório (Centro de Biotecnologia Vegetal, da Faculdade de Ciências de Lisboa).

2.5. Determinação da composição proximal

As amostras de corpos frutíferos foram analisadas para a determinação de humidade, proteínas lípidos, glúcidos e cinzas), seguindo, para tal, os procedimentos oficiais de análise de AOAC (AOAC, 1995). O teor de proteína (N \times 4,38) das amostras foi estimado pelo método macro-Kjeldahl; os lípidos foram determinados pela extração de uma massa conhecida de amostra com éter de petróleo, usando um aparelho de Soxhlet; o teor de cinzas foi determinado por incineração em mufla a 600 ± 15 °C; os glúcidos foram calculados pela diferença. A energia total foi determinada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Energia (kcal)} = 4 \times (\text{g proteínas} + \text{glúcidos g}) + 9 \times (\text{g lípidos}).$$

2.6. Determinação de ácidos gordos

Os ácidos gordos nas amostras de corpos frutíferos foram determinados por cromatografia gasosa com deteção de ionização de chama (GC-FID)/coluna capilar, de acordo com o procedimento implementado no Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada (Heleno *et al.*, 2009).

As amostras foram transferidas (massa conhecida) para cartuchos de Soxhlet e extraídas, com éter de petróleo durante pelo menos 7h. A massa obtida por extração foi misturada com 5 mL de metanol: ácido sulfúrico: tolueno 2:1:1 (v/v/v), durante 12 h, num banho a 50 °C e a 160 rpm. Depois 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 por agitação no vórtex e a água foi eliminada com sulfato de sódio anidro. Recuperou-se a amostra para um vial com teflon e filtrou-se com um filtro de *nylon* de 0,2 µm da Milipore. O perfil dos ácidos gordos foi obtido num GC (DANI 1000) equipado com um injetor split/splitless, 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.

A identificação dos ácidos gordos foi feita 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.

2.7. Determinação de açúcares

Os açúcares livres foram determinados nas amostras de corpos frutíferos e micélios por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), de acordo com o procedimento implementado no Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada (Heleno et al., 2009).

Foi adicionado 1 mL do padrão interno (PI) (rafinose, 25 mg/mL) à amostra (1g) e extraiu-se com 40 mL de etanol a 80 %, incubando durante 1h30 a 80 °C, procedendo a uma agitação de 15 em 15 minutos. Posteriormente, procedeu-se à filtração e evaporação do etanol (evaporador rotativo Büchi R-210). O sobrenadante foi lavado 3 vezes sucessivas com 10 mL de éter etílico numa ampola de decantação. Após as lavagens, procedeu-se à concentração a 40 °C e o resíduo sólido foi dissolvido em água num volume final de 5 mL, filtrado através de um filtro de 0,22 µm. Seguidamente, foi transferido para um frasco âmbar e analisado. O volume de amostra injetado foi de 10 µL.

O sistema de análise consistia num sistema integrado com uma bomba (Knauer, Smartline sistema 1000), um sistema de desgaseificação (Smartline gestor 5000) e um amostrador automático (AS-2057 Jasco) acoplado a um detetor de índice de refração (RI

detector Knauer Smartline 2300). A identificação dos açúcares foi feita por comparação dos tempos de retenção relativos dos picos da amostra com os padrões. Os dados foram analisados usando o *software* Clarity 2.4 (DataApex). Na quantificação, utilizou-se o método do padrão interno e curvas de calibração obtidas a partir de padrões comerciais de cada composto. Os resultados foram expressos em gramas por 100 gramas de massa seca.

2.8. Determinação de ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos foram determinados nas amostras de corpos frutíferos e micélios de acordo com o procedimento implementado no Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada (Barros et al., 2012).

As amostras foram extraídas com 25 mL de ácido metafosfórico a 4,5%, em agitação durante 15 min. Depois, foram filtradas (filtros de 0,22 μ m) e analisadas. A análise foi realizada por cromatografia líquida ultra rápida (UFLC), acoplada ao detetor de fotodíodos (PDA), utilizando uma Shimadzu 20A (Shimadzu Corporation). A deteção foi realizada no PDA, utilizando 215 e 245 nm como comprimento de onda preferenciais. Os ácidos orgânicos foram quantificados por comparação da área dos picos das amostras registados a 215 nm com as curvas de calibração obtidas a partir de padrões comerciais de cada composto. Os resultados foram expressos em gramas por 100 gramas de massa seca.

2.9. Determinação de compostos fenólicos

Os compostos fenólicos foram analisados nas amostras de corpos frutíferos e micélios de acordo com o procedimento implementado no Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada (Barros et al., 2009; Vaz et al., 2011).

As amostras foram extraídas com 20 a 30 mL de metanol:água 80:20 (v/v) e colocadas durante 2h num congelador. De seguida as amostras foram filtradas com papel de filtro Whatman n^o4. Os extratos foram evaporados para remoção do metanol; o resíduo foi lavado duas vezes com 20 mL de éter etílico e 20 mL de acetato de etilo. As amostras foram evaporadas até à *secura* e, posteriormente, dissolvidas em metanol:água 80:20 (v/v) e filtradas (0,22 μ m).

A análise foi feita por HPLC (Cromatógrafo Hewlett-Packard 1100, Agilent Technologies). A separação foi conseguida através de uma coluna de fase reversa C18,

Spherisorb ODS-2 (Waters) (3 μm , 150 \times 4.6 mm) termostaticada a 25 °C. Os solventes utilizados foram: (A) 2,5 % de ácido acético em água, (B) 2,5% de ácido acético:acetonitrilo (90:10, v/v) e (C) 100% de acetonitrilo. O gradiente aplicado foi: isocrático 100% A durante 10 min, 50% A e 50% B durante 10 min, isocrático 100% B durante 15 min, 90% B e 10% C durante 10 min, 70% B e 30% C durante 10 min, 50% B e 50% C durante 5 min, 20% B e 80% C durante 5 min, 100% A durante 5 min, a uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min. O perfil em compostos fenólicos foi determinado por HPLC acoplado a um detetor de díodos (DAD) utilizando como comprimento de onda preferencial, 280 nm. Os compostos fenólicos foram quantificados por comparação da área dos seus picos, registados a 280 nm, com as curvas de calibração obtidas de padrões comerciais de cada composto. Os resultados foram expressos em gramas por 100 grama de massa seca.

2.10. Determinação de tocoferóis

Os tocoferóis foram determinados nas amostras de corpos frutíferos e micélios de acordo com o procedimento implementado no Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada (Reis et al., 2011). A solução de BHT (2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol) em hexano (10 mg/mL; 100 μL) e o padrão interno (PI) em hexano (tocol; 2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 250 μL) foram adicionados às amostras antes do procedimento de extração. As amostras (~500 mg) foram homogeneizadas com metanol (4 mL) num vórtex (1 min). De seguida, adicionou-se hexano (4 mL) e homegeneizadas, de novo, no vórtex durante 1 min. Posteriormente, adicionou-se 2 mL de uma solução aquosa saturada de NaCl e homegeneizou-se a amostra durante 1 min no vórtex. Seguidamente as amostras foram centrifugadas (centrífuga refrigerada Centorion K24OR), durante 5 min a 4000 rpm e transferiu-se cuidadosamente o sobrenadante para um frasco (*vial*). As amostras foram re-extraídas mais duas vezes com hexano e centrifugadas. Os extratos foram desidratados com sulfato de sódio anidro, secos numa corrente de azoto e redissolvidos em 1 mL de hexano, os quais foram filtrados através de um filtro (0.22 μm). O resíduo obtido na filtração foi transferido para frascos de injeção (*vials*) âmbar e analisados por HPLC (equipamento descrito anteriormente), com um detetor de fluorescência (FP-2020; Jasco) programado para excitação a 290 nm e emissão a 330 nm. Os compostos foram identificados por comparação com padrões comerciais. A quantificação baseou-se na resposta de sinal de fluorescência, utilizando-se o método do padrão interno (tocol) e

utilizando curvas de calibração obtidas a partir de padrões comerciais de cada composto. Os resultados foram expressos em mg por 100 g de massa seca.

2.11. Avaliação da atividade antioxidante

2.11.1. Aspetos gerais

As amostras de corpos frutíferos e micélios (~1 g) foram submetidas a uma extração líquido-sólido por agitação com 40 mL de metanol (25 °C a 150 rpm, em placa de agitação) durante 1 hora e subsequentemente filtradas através de papel Whatman nº 4. O resíduo obtido foi novamente extraído com uma porção adicional de 30 mL metanol, nas mesmas condições referidas anteriormente. Os extratos metabólicos combinados foram evaporados e redissolvidos em metanol, de forma a obter uma concentração final conhecida, solução *stock* (20 mg/mL). Posteriormente, a partir das soluções *stock* prepararam-se soluções de extratos metanólicos com diferentes concentrações, através de diluições sucessivas, para serem sujeitos a testes *in vitro* (Barros et al., 2012) de avaliação das suas propriedades antioxidantes. As concentrações das amostras correspondentes a 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância (EC₅₀) foram calculadas a partir das representações gráficas das percentagens de atividade antioxidante (ensaios do DPPH, β-caroteno e/linoleato e TBARS) ou da absorvância a 690 nm (ensaio do poder redutor) em função da concentração da amostra. Utilizou-se o trolox como controlo positivo.

2.11.2. Ensaio Folin Ciocalteu

Uma das soluções do extrato (5 mg/mL; 1 mL) foi misturada com o reagente de *Folin-Ciocalteu* (2,5 mL, previamente diluída em água 1:10 v/v) e uma solução de carbonato de sódio (75 g/L; 2 mL). A mistura foi homogeneizada no vórtex, durante 15 segundos e deixou-se repousar durante 30 min a 40 °C para desenvolvimento da cor. A absorvância foi medida a 765 nm (espectrofotómetro AnalytikJena 200). Utilizou-se ácido gálico para obter a curva padrão (0,0094 – 0,15 mg/mL), e a redução do reagente de *Folin-Ciocalteu* pelas amostras foi expresso em mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por grama de extrato.

2.11.3. Ensaio do ferricianeto/azul da Prússia

As diferentes soluções de extrato (0,5 mL) foram misturadas com tampão fosfato de sódio (200 mmol/L; pH 6,6; 0,5 mL) e ferricianeto de potássio (1% w/v; 0,5 mL). A mistura foi incubada a 50 °C durante 20 min. Após esse período adicionou-se ácido tricloroacético (10 %; 0,16 mL). A mistura (0,8 mL) foi colocada nos 48 poços juntamente com água desionizada (0,8 mL) e uma solução de cloreto férrico (0,1 %; 0,16mL) e a absorvância foi medida a 690 nm no Leitor de Microplacas ELX800 (Bio-Tek equipamento, Inc.). As absorvâncias mais elevadas correspondem a um maior poder redutor.

2.11.4. Ensaio da atividade captadora de radicais DPPH

A mistura de reação usada consistiu, em cada um dos 96 poços, em 30 µL de cada uma das soluções do extrato em diferentes concentrações e 270 µL de uma solução metanólica de radicais DPPH (6×10^{-5} mol/L). A mistura foi colocada no escuro durante 30 min. A redução do radical DPPH foi determinada pela medição da absorvância a 515 nm. A atividade captadora de radicais (ACR) foi calculada pela percentagem de descoloração da solução de DPPH, usando a equação:

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

onde A_{S} corresponde à absorvância da solução de DPPH na presença de diferentes concentrações de extrato e A_{DPPH} é a absorvância do branco (solução de DPPH mais o solvente de extração (metanol) em vez da solução de extrato).

2.11.5. Ensaio do β -caroteno/linoleato

Preparou-se uma solução de β -caroteno dissolvendo este composto (2 mg) em clorofórmio (10 mL). Transferiram-se 2 mL desta solução para um balão periforme de 100 mL e removeu-se o clorofórmio a 40 °C, sob vácuo. Posteriormente juntou-se ácido linoleico (40 mg), emulsionante Tween 80 (400 mg) e água destilada (100 mL), e agitou-se vigorosamente. Transferiram-se alíquotas (4,8 mL) desta emulsão para tubos de ensaio contendo diferentes concentrações dos extratos (0,2 mL). Logo após a adição da emulsão a cada tubo, agitou-se e determinou-se o tempo zero de absorvância a 470

nm (espectrofotómetro AnalytikJena). Seguidamente foram incubados num banho a 50 °C durante 2 h. Passado esse tempo determinou-se novamente a absorvância a 470 nm. Foi preparado um branco com o solvente de extração (metanol) em vez da solução de extrato. A inibição da descoloração do β -caroteno foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$(\text{Absorvância}_{470} \text{ após 2h} / \text{Absorvância}_{470} \text{ inicial}) \times 100$$

2.11.6. Ensaio TBARS

Utilizou-se tecido cerebral, obtido a partir de porco (*Sus scrofa*) que foi dissecado e homogeneizado em gelo com tampão Tris-HCl (20 mM, pH 7,4) a fim de produzir um homogeneizado de tecido cerebral numa proporção 1:2 (w/v) após centrifugação (centrífuga refrigerada Centorion K24OR) a 3000g durante 10 min. Incubou-se uma alíquota (0,1 mL) do sobrenadante com as diferentes concentrações dos extratos (0,2 mL), na presença de FeSO₄ (10 μ M; 0,1 mL) e ácido ascórbico (0,1 mM; 0,1mL) a 37 °C durante 1 hora. A reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético (28% w/v; 0,5 mL), seguindo-se a adição do ácido tiobarbitúrico (TBA; 2%, w/v; 0,38 mL). A mistura foi aquecida a 80 °C durante 20 min. Após centrifugação, a 3000g durante 10 min, para remoção do precipitado de proteínas, a intensidade da cor do complexo malonaldeído (MDA)-TBA do sobrenadante foi medida através da sua absorvância a 532 nm. Foi preparado um branco com o tampão tris-HCl em vez da solução de extrato. A percentagem de inibição da peroxidação lipídica (%) foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$[(A - B)/A] \times 100\%$$

onde A e B correspondem à absorvância do branco e da solução com o extrato, respetivamente.

2.12. Análise estatística

Os ensaios relativos a cada uma das amostras foram feitos em triplicado. Os resultados foram expressos em valores médios \pm desvio padrão (DP). Os resultados de cada processo de secagem foram analisados através da análise de variância (ANOVA)

seguida de um teste de Tukey HSD com $\alpha = 0,05$. Este tratamento foi efetuado utilizando o programa SPSS v. 16.0. As diferenças estatísticas obtidas pela ANOVA foram representadas por letras (letras diferentes indicam diferenças significativas entre resultados). As letras foram ordenadas alfabeticamente de acordo com a diminuição dos valores dos resultados (e.g. a letra “a” representa o melhor resultado para a composição química e o pior resultado para os ensaios das propriedades antioxidantes).



Capítulo III

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação do crescimento do micélio de *Lepista nuda* em diferentes meios de cultura sólidos

3.1.1. Avaliação do crescimento do micélio de *Lepista nuda* com base no raio obtido em diferentes meios de cultura sólidos

O crescimento de micélio nos fungos pode ser avaliado através do crescimento das hifas em meio de cultura sólido, por determinação da área, volume ou raio médio da borda do micélio em crescimento (Montini, 2001).

O crescimento do fungo em função do tempo resulta numa curva do tipo sigmoide (tem uma forma em S), que pode ser dividida em várias fases (fase lag, fase exponencial, fase estacionária e fase de latência ou morte), nas quais se pode distinguir as diferentes características fisiológicas. A duração da fase lag depende da espécie e dos nutrientes no meio de cultura. A fase exponencial é afetada por suplementos nutricionais nomeadamente, fontes de azoto e carbono. A fase estacionária ocorre devido à exaustão de alguns nutrientes limitantes, ou pela acumulação de metabolitos tóxicos. A fase de latência ou morte corresponde, por norma, ao esgotamento total dos nutrientes ou à autólise (Montini, 2001).

O crescimento do micélio de *L. nuda*, isolado a partir dos esporocarpos de amostras silvestres obtidas em prado e de uma amostra comercial, foi avaliado ao longo do período de incubação, obtendo-se os resultados apresentados nas imagens seguintes (Figuras 19 e 20).

Pode-se verificar que as duas amostras (prado e comercial) obtidas em cinco meios de cultura diferentes (MMN completo, MMN incompleto, PACH, FAD e PDA) não revelaram nenhuma fase de adaptação (fase lag). Este facto pode dever-se ao crescimento contínuo e ramificado das hifas o que permite a produção de micélio no substrato (Carlile et al., 2001). A fase exponencial em todos os meios de cultura e nas duas amostras encontrava-se entre os 13 e 19 dias. No entanto, o crescimento médio do raio do micélio variou entre 2 e 3,5 cm. Em termos de comparação das duas amostras, a que apresentou maior crescimento nesta fase exponencial foi a amostra comercial (2,94 a 3,45 cm); a amostra proveniente de prado teve um menor crescimento (2,12 a 2,98 cm). A fase estacionária variou com o meio de cultura utilizado e com a amostra, como

se pode verificar nas figuras 19 e 20; no entanto, foi sempre maior na amostra de prado, em todos os meios de cultura testados.

Na amostra de prado, o micélio que cresceu no meio de cultura MMN completo quase preencheu a totalidade da placa de Petri (3,81 cm), em 41 dias em crescimento (Figura 19). Já o que teve menos tempo de crescimento (25 dias) foi o que se obteve no meio de cultura MMN incompleto, não preenchendo totalmente a placa de Petri (3,24 cm). Assim, dos cinco meios de cultura usados, o MMN completo mostrou ser o mais indicado para o crescimento da amostra no que respeita à produção de biomassa, parecendo ser apropriado em termos de nutrientes, pois obtiveram-se valores mais favoráveis em termos de crescimento médio de micélio e tempo de crescimento (Figura 19).

Os micélios obtidos a partir da amostra comercial que cresceram e quase preencheram a totalidade da placa de Petri (3,90 e 3,88 cm) foram os que estavam no meio de cultura MMN incompleto e completo com 21 e 29 dias de crescimento, respetivamente. Em relação a esta amostra, os melhores meios de cultura para o crescimento em termos de biomassa parecem ser o meio MMN completo, incompleto e o meio PACH, devido ao tempo de crescimento de 20 a 29 dias e ao crescimento médio do micélio de ~4 cm nos três meios de cultura (Figura 20).

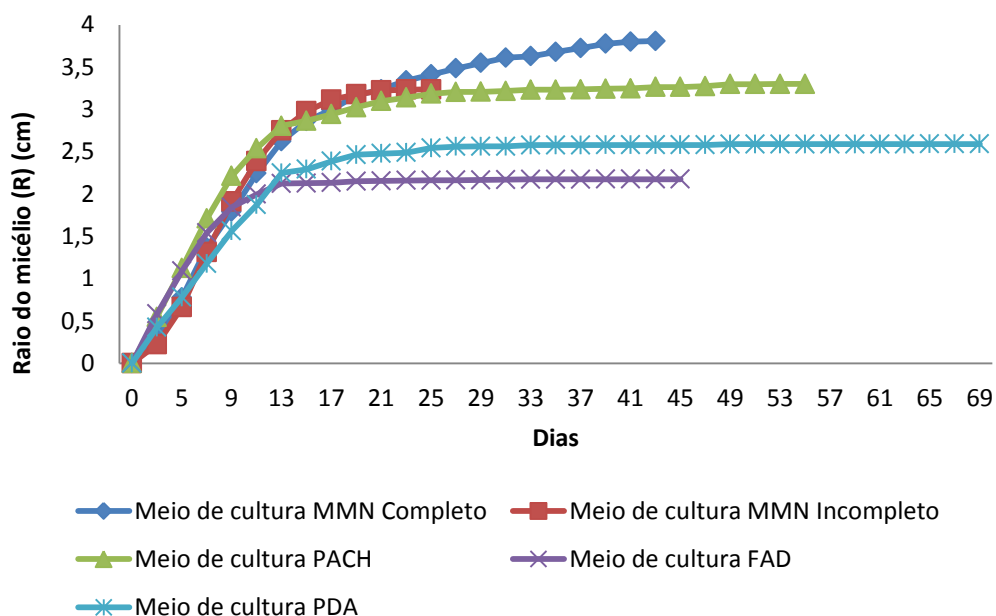


Figura 19. Curva de crescimento do micélio obtido em diferentes de meio de cultura (MMN completo, incompleto, PACH, FAD e PDA), a partir de corpos frutíferos de *Lepista nuda* provenientes de prado.

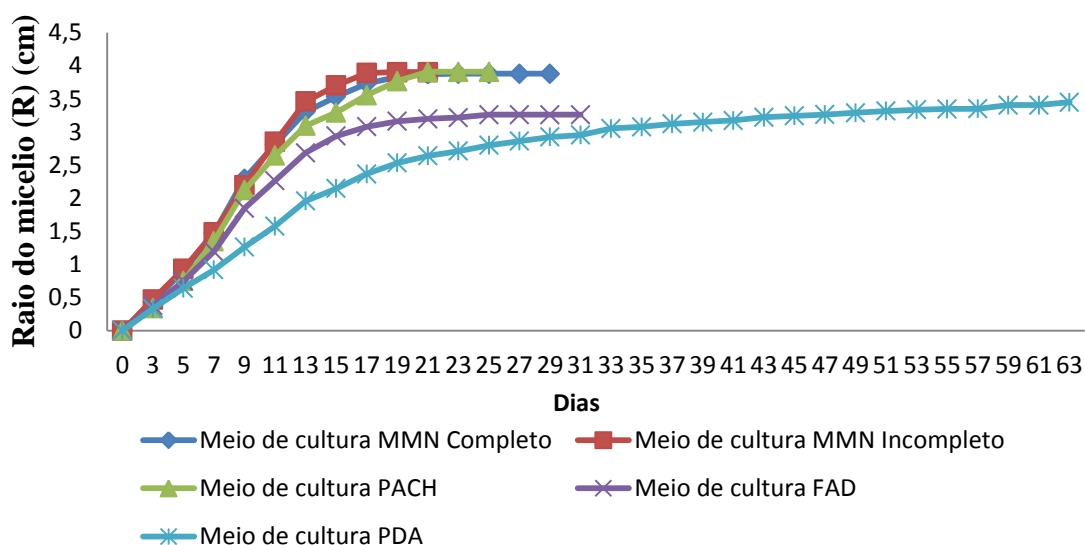


Figura 20- Curva de crescimento do micélio obtido em diferentes meios de cultura (MMN completo, incompleto, PACH, FAD e PDA), a partir de corpos frutíferos comerciais de *Lepista nuda*.

Para uma melhor observação dos resultados obtidos encontra-se, nos anexos 6.6 a 6.15, as imagens de cada uma das amostras nos cinco diferentes meios de cultura (MMN completo, MMN incompleto, PACH, FAD e PDA).

Realizou-se o cálculo da Taxa Relativa de Crescimento (TRC) a partir dos valores do raio do micélio obtidos nos diferentes meios de cultura para as duas amostras; os resultados apresentam-se nas Figuras 21 e 22.

Para o micélio obtido a partir da amostra do prado, o meio de cultura mais adequado foi o MMN completo, com $81,38 \text{ cm}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. Os restantes meios tiveram baixos valores de crescimento, o que comprova que o meio de cultura referido anteriormente é o mais indicado para o crescimento do micélio de *L. nuda* obtido a partir da amostra comercial (Figura 21).

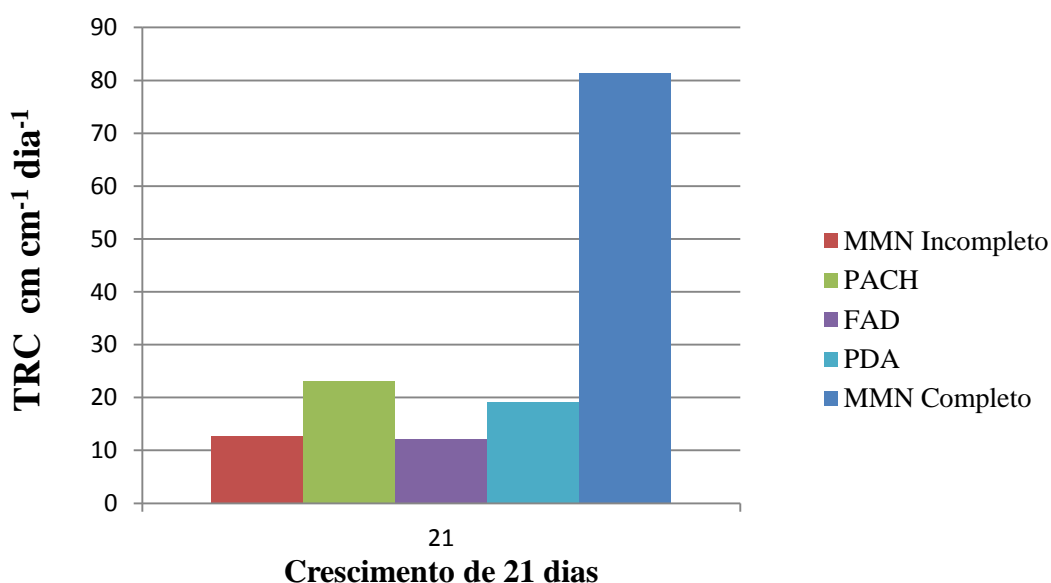


Figura 21. Taxa Relativa de Crescimento com base no raio do micélio obtido a partir da amostra de *Lepista nuda* proveniente de prado.

Os meios de cultura que, em 21 dias, obtiveram maior crescimento foram os meios MMN completo e incompleto com $0,57 \text{ cm cm}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ para os micélios obtidos a partir da amostra comercial. Mas o meio de cultura PACH está muito próximo com uma diferença de $0,03 \text{ cm cm}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, o que significa que é uma diferença mínima de crescimento. Portanto, todos eles foram bons meios de cultura para o crescimento do micélio de *L. nuda* obtido a partir da amostra de prado (Figura 22).

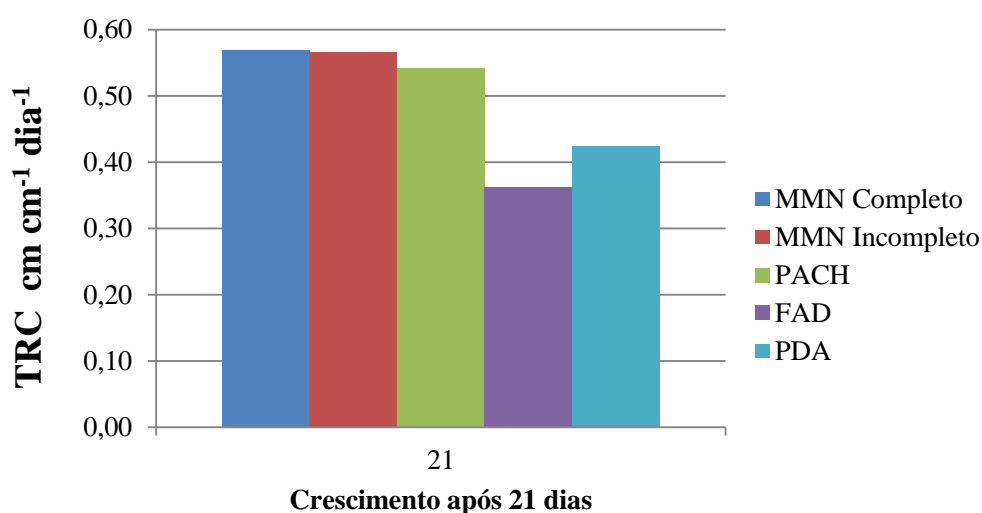


Figura 22. Taxa Relativa de crescimento com base no raio do micélio obtido a partir da amostra comercial de *Lepista nuda*.

Como referido anteriormente, o crescimento do micélio pode ser avaliado pelo crescimento das hifas em função do tempo. Mas também pode ser avaliado pela massa de micélio produzida. Assim, para determinarmos qual o melhor meio de cultura para o crescimento do macrofungo *L. nuda*, em termos de produção de massa, testaram-se os cinco meios de cultura já referidos.

Os resultados obtidos estão representados secção seguinte (Figuras 23 a 27), onde os resultados apresentados demonstram a média de crescimento em massa fresca e seca do micélio ao longo de 21 dias.

3.1.2. Avaliação do crescimento do micélio de *Lepista nuda* com base nas massas fresca e seca obtidas em diferentes meios de cultura sólidos

Os resultados obtidos, nas duas amostras (silvestre proveniente de prado e comercial), demonstram que estes têm uma fase lag, o que não se verificou nos resultados anteriores. A fase lag é a fase que se segue à inoculação, num novo meio de cultura. É por norma uma fase pequena, caracterizada por não ocorrer crescimento. As condições em que se encontra o inóculo inicialmente, tem influência na duração desta fase. Se o inóculo for retirado inicialmente de uma fase de crescimento exponencial, a fase lag será mais curta, ou mesmo nem se verifica, desde que as condições no novo meio de cultura sejam mantidas iguais às que se encontrava inicialmente. No entanto, de fungo para fungo, dependendo da natureza do inóculo e das condições nutricionais do meio de cultura, pode haver fase lag (Web 8).

A massa fresca de micélio corresponde à percentagem de água que este acumula, porque os fungos filamentosos crescem devido ao crescimento dos ápices das hifas. Ao crescer, acumula água no interior da hifa, aumentando assim de volume. Assim, ao efetuar a determinação da massa fresca do micélio inclui-se a percentagem de retenção de água no interior das hifas.

A massa seca de micélio corresponde à biomassa produzida (metabolismo com produção “de novo” de compostos como proteínas, fibras, ácidos. nucleicos ou outros compostos resultantes do metabolismo ativo do organismo em causa) na qual a percentagem de água é praticamente zero. Assim, faz sentido determinar a relação da massa fresca com a massa seca; a massa seca dá-nos o valor correto de crescimento e de

produção de biomassa produzida, isto é, a quantidade de micélio que cresce efetivamente ao longo do tempo (Web 9).

No inoculo da amostra proveniente de prado e obtida em meio de cultura MMN completo, verifica-se que o crescimento do micélio, por comparação da média de massa fresca e seca, é praticamente zero nos nove dias iniciais de crescimento. Após 13 dias, a massa fresca tem um ligeiro aumento no seu crescimento. A partir deste dia, a produção de massa fresca tem um crescimento exponencial; já a massa seca tem um crescimento exponencial mas inferior como seria expectável atendendo aos conceitos de massa seca e fresca (Figura 23).

A produção média de micélio de massa fresca e seca no fim dos 21 dias foi de 1,86 e 0,58 g, respetivamente.

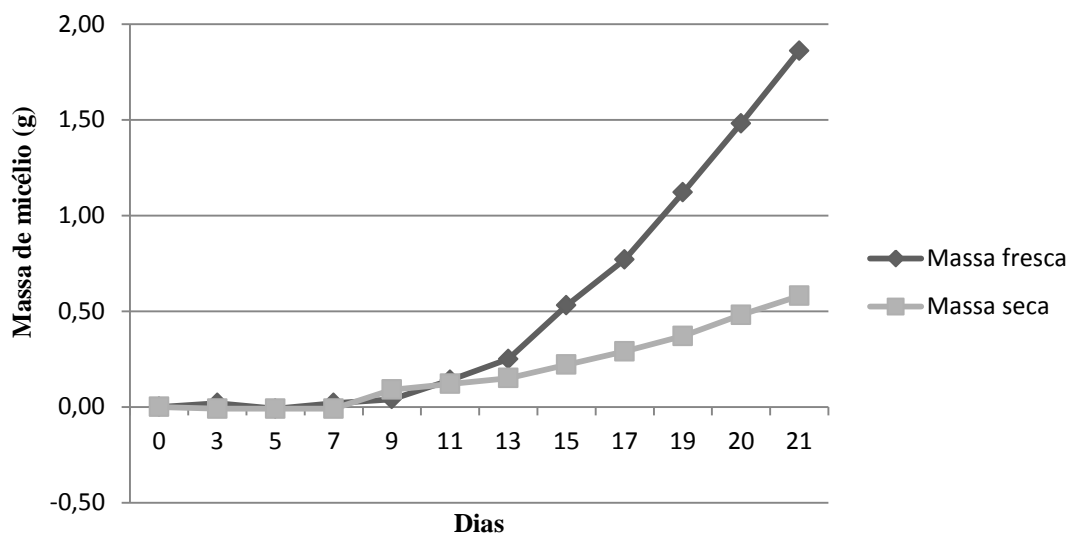


Figura 23. Crescimento do micélio de *Lepista nuda* proveniente de prado, com base nas massas fresca e seca obtidas em meio de cultura MMN completo.

No crescimento do micélio da amostra de prado obtido em MMN incompleto, a produção média de massa fresca e seca foi bastante irregular, comparado com o anterior (meio completo). A produção média de massa seca foi superior à da massa fresca. A produção média de massa fresca, passado 3 dias foi negativa, o que pode significar que houve um consumo do meio de cultura, ou seja, o micélio consumiu os nutrientes, produziu matéria nova não sendo só absorção e retenção de água, provavelmente nutrientes ainda associados ao inoculo, pois a produção média de massa seca é positiva

para período de tempo em estudo. Nos dias seguintes, a produção média de massa fresca foi irregular, mas depois de 7 dias teve um ligeiro crescimento. Já a produção média de massa seca a partir do terceiro dia teve ligeiros crescimentos, até atingir um crescimento exponencial. Depois deste aumento exponencial de crescimento, apresentou um crescimento moderado até ao fim da experiência (21 dias depois).

É importante referir que a massa fresca no fim da experiência aproximou-se da produção média de massa seca (0,21 e 0,24 g de micélio produzido, respetivamente) (Figura 24). O que nos permite considerar que o conteúdo em água do nosso micélio é relativamente baixo ou seja o aumento de massa do micélio será fundamentalmente devido a produção de novos materiais e não acumulação de água.

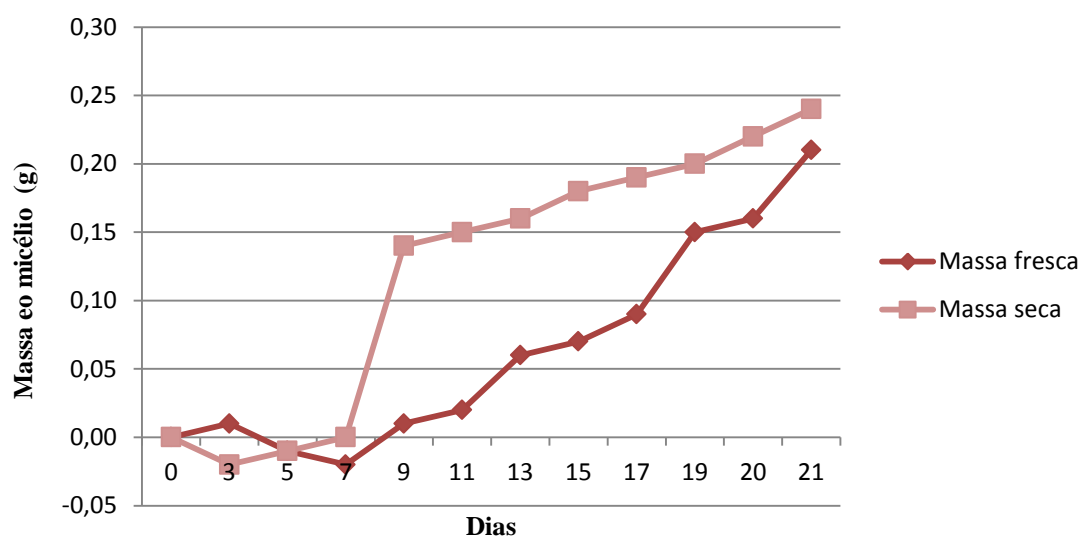


Figura 24. Crescimento do micélio de *Lepista nuda* proveniente de prado, com base nas massas fresca e seca obtidas no meio de cultura MMN incompleto.

Na determinação das curvas de crescimento por massa fresca e seca no meio de cultura PACH, os resultados obtidos (Figura 25) apresentaram irregularidades, ou seja, tal como nos resultados anteriores, a produção de massa fresca e seca teve altos e baixos. A produção média de massa fresca teve por tendência um crescimento, ao longo dos 21 dias. Já a produção média de massa seca teve um crescimento diferente. Nos primeiros dias apresentou valores negativos, mas depois de 5 dias teve um grande crescimento, ultrapassando a massa fresca produzida, tal como no meio anterior e, mantendo-se assim durante mais 10 dias, até que atingiu um valor de crescimento mais moderado, atingindo o início da fase estacionária da curva de crescimento.

A produção média de massa fresca e seca no fim dos 21 dias foi aproximando com valores de 0,41 e 0,28 g, respetivamente.

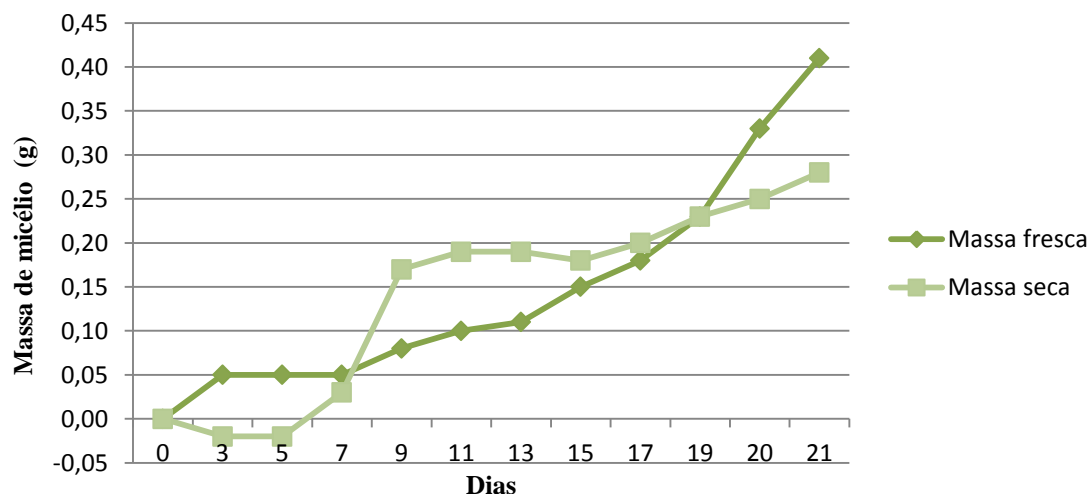


Figura 25. Crescimento do micélio de *Lepista nuda* proveniente de prado, com base nas massas fresca e seca obtidas em meio de cultura PACH.

Com o meio de cultura FAD, a produção e determinação da curva de massa fresca e seca do macrofungo foi semelhante à obtida no meio de cultura MMN completo (Figura 23).

A produção média de massa fresca e seca nos primeiros dias foi baixa, o fungo poderá ter estado a adaptar ao novo meio de cultura, originando assim uma fase lag. Isto pode estar associado ao facto do inóculo ter como meio de origem um meio de cultura diferente (MMN completo, com mais nutrientes, em relação ao meio de cultura novo), e portanto ter havido um esgotamento dos nutrientes do meio anterior e por não estarem alguns dos nutrientes disponíveis da mesma forma no meio novo, teve de haver adaptação das vias metabólicas para o crescimento neste meio mais pobre, no entanto, como já referido anteriormente, os organismos normalmente têm fases lag quando são transferidos para novos meios mesmo que estes sejam iguais aos anteriores. Neste caso por ter mudado para um meio mais pobre provavelmente essa fase lag foi mais prolongada e por isso nítida. A quantidade de nutrientes é diferente de meio de cultura para meio de cultura, existindo uma maior quantidade de carbono no meio inicial (MMN completo) a disponibilidade de fonte de energia e de esqueletos de carbono diminuiu tornando deste modo o período de adaptação mais nítido. Depois de 9 dias de incubação, a produção média de massa fresca e seca foi distinta, onde a produção média

de massa fresca teve um crescimento exponencial maior em comparação ao crescimento de massa seca. Deste modo podemos inferir que o crescimento real com aumento significativo de micélio produzido de novo foi menor neste meio, sendo grande parte do seu aumento de massa devido a absorção de água e não “construção” de novos “materiais”.

A massa média produzida no fim de 21 dias foi 0,53 g para massa fresca e 0,17 g para massa seca, o que constitui uma diferença considerável (Figura 26).

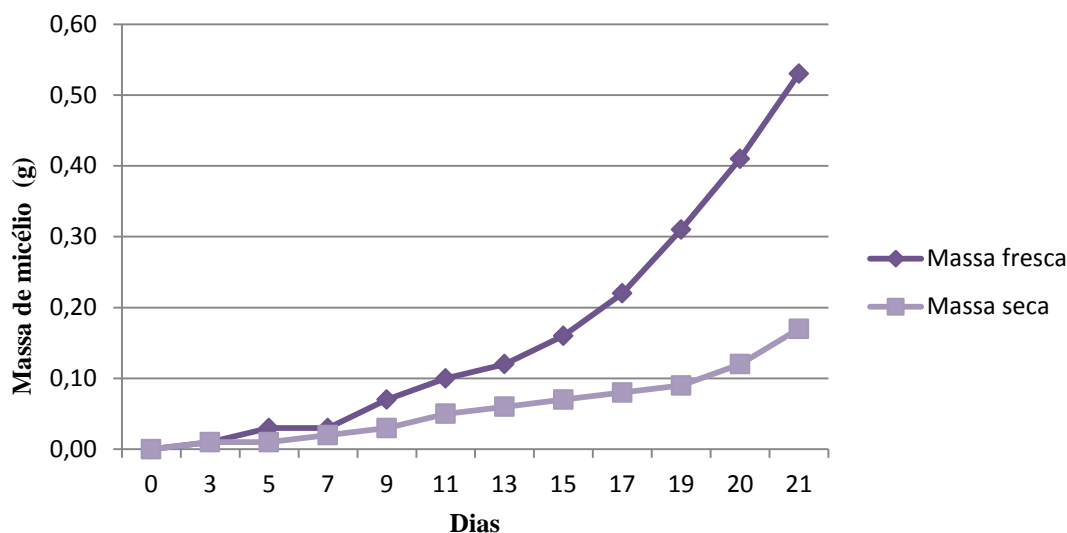


Figura 26. Crescimento do micélio de *Lepista nuda* proveniente de prado, com base nas massas fresca e seca obtidas em meio de cultura FAD.

As retas obtidas no crescimento médio do micélio por massa fresca e seca em meio de cultura PDA, foram similares às obtidas no meio de cultura PACH (Figura 25), uma vez que os resultados obtidos de massa seca foram bastante irregulares.

O crescimento médio de micélio por massa fresca nos primeiros dias teve um baixo crescimento, podendo considerar-se uma fase de adaptação ao meio de cultura, pois o inoculo, inicialmente, encontrava-se no meio de cultura MMN completo. Posteriormente, a produção média de crescimento de micélio fresco teve um crescimento exponencial grande, mas contante; ao fim dos 21 dias apresentou uma massa fresca média de 0,45 g. O conteúdo em água do micélio é relativamente baixo ou seja o aumento de massa do micélio será fundamentalmente devido a produção de novos materiais e não acumulação de água

A produção média de massa seca, como referido anteriormente, foi bastante irregular, não apresentando uma fase lag nos dias iniciais. Existiu, no entanto, produção

média de massa seca nos primeiros 3 dias, com alguma significância e depois nos 4 dias seguintes seguiu-se uma baixa produção média de massa seca. Sete dias depois teve um aumento na produção média, contudo após 2 dias, o crescimento médio da massa seca, apresentou um crescimento constante, quase retilíneo. É importante referir que só 17 dias depois, a produção média de micélio por massa seca foi inferior à da massa fresca média produzida. A produção média de massa seca no final dos 21 dias foi 0,31 g, ligeiramente próxima da massa média obtida em fresco (Figura 27). O aumento da massa do micélio poderá ser fundamentalmente devido á produção de novos materiais e não acumulação de água.

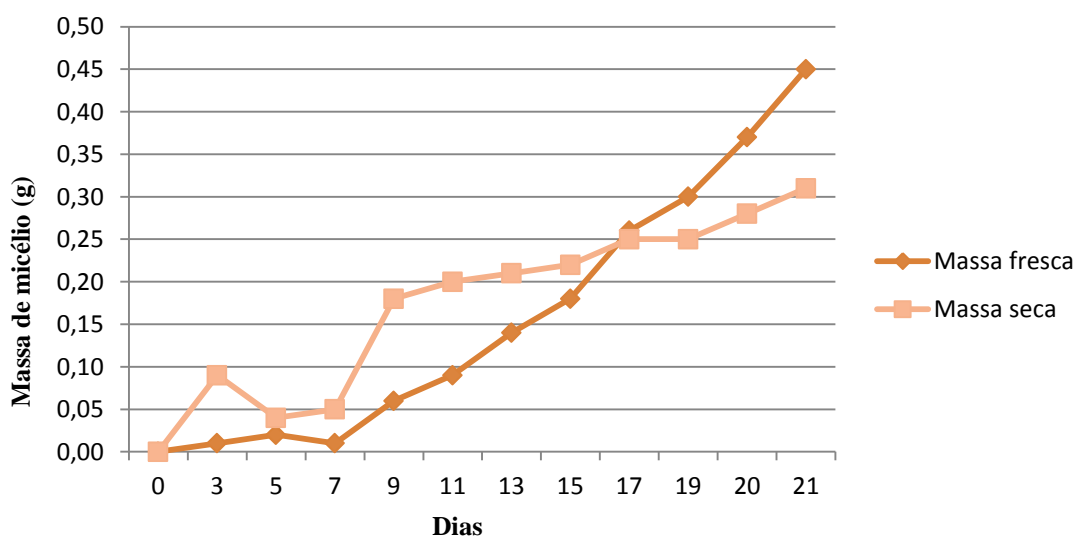


Figura 27. Crescimento do micélio de *Lepista nuda* proveniente de prado, com base nas massas fresca e seca obtidas em meio de cultura PDA.

Para amostra de prado, o meio de cultura MMN completo permitiu uma maior produção de massa fresca, podendo ser explorado no cultivo de corpos frutíferos deste fungo. O mesmo meio conduziu também a uma maior produção de biomassa seca. Este facto pode dever-se à quantidade de carbono existente no meio, que permite uma maior disponibilidade energética e de esqueletos de carbono para produção de precursores e biomoléculas essenciais ao desenvolvimento do micélio. Permitindo assim uma maior disponibilidade energética e de esqueletos de carbono para produção de precursores e biomoléculas essenciais ao desenvolvimento do micélio

Os resultados obtidos no meio de cultura MMN completo, na determinação da curva de crescimento médio de micélio produzido a partir da amostra comercial, com base nas massas fresca e seca, apresentaram alguma semelhança com os obtidos no mesmo meio de cultura na amostra de prado. No entanto existem diferenças importantes nesses resultados.

A produção média de massa seca ao longo dos 21 dias manteve-se contante e no limite da produção, obtendo-se uma massa média final de 0,05 g. No entanto, a massa fresca, nos 3 primeiros dias teve uma pequena fase lag. Logo a seguir, apresentou um crescimento exponencial, mas que durou pouco, pois nos dias seguintes a este crescimento voltou a verificar-se uma estabilidade, isto é, o crescimento foi sempre constante. Posteriormente, voltou a sofrer um crescimento exponencial, e a produção média de massa obtida 21 dias depois foi 1,84 g (Figura 28).

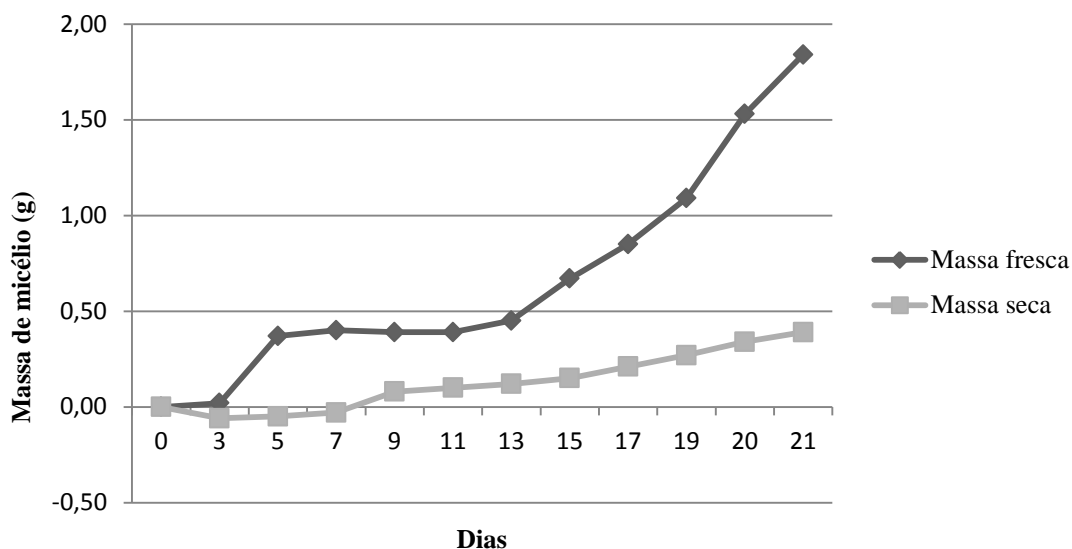


Figura 28. Crescimento do micélio de *Lepista nuda* comercial, com base nas massas fresca e seca obtidas em meio de cultura MMN completo.

A determinação da curva de crescimento médio de massa fresca e seca em meio de cultura MMN incompleto, nesta amostra, apresentou parecenças com as que foram obtidas no mesmo meio, mas na amostra de prado; a produção média de massa seca foi sempre maior que a de massa fresca (Figura 29). O conteúdo em água do micélio é relativamente baixo ou seja o aumento de massa do micélio será fundamentalmente devido a produção de novos materiais e não acumulação de água.

Isto é, o conteúdo em água do micélio é relativamente baixo, fundamentalmente devido à produção de novos materiais.

O crescimento das duas curvas (massa fresca e seca) foi quase sempre exponencial, exceto na massa fresca, em que 19 dias depois apresentou uma ligeira diminuição de produção média de micélio, mas que rapidamente voltou a crescer nos restantes dias.

A produção média obtida ao fim dos 21 dias foi 0,18 e 0,24 g de massa fresca e seca, respetivamente.

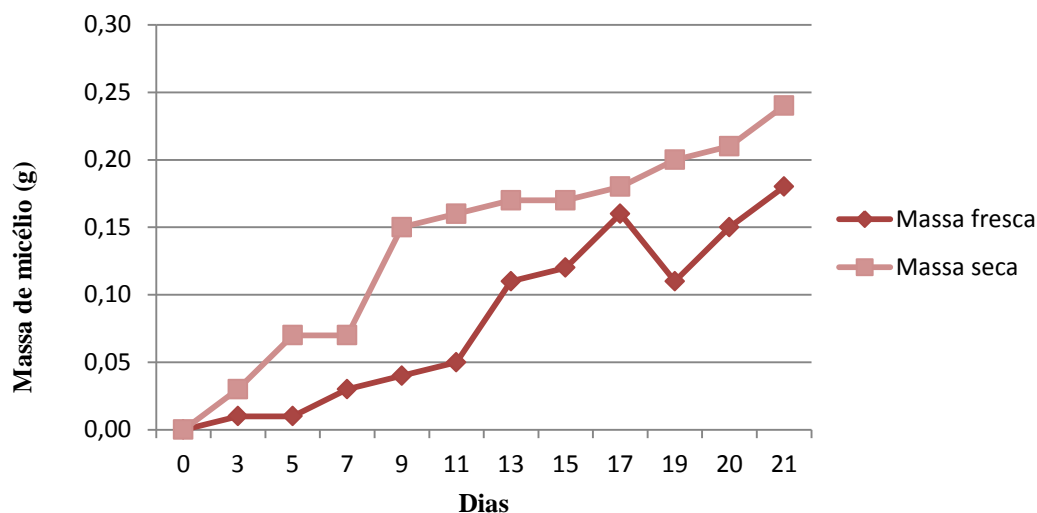


Figura 29. Crescimento do micélio de *Lepista nuda* comercial, com base nas massas fresca e seca obtidas em meio de cultura MMN incompleto.

No meio de cultura PACH, na determinação da curva de crescimento médio por massa fresca e seca, pode-se verificar a ausência de uma fase lag e um crescimento exponencial moderado das duas massas (Figura 30).

A massa seca teve uma produção maior que a massa fresca nos primeiros 19 dias. Seguidamente, essa produção foi ultrapassada pela produção de massa fresca que até aos 193 dias apresentava uma produção baixa, apenas ligeiramente exponencial, como se fosse uma fase de adaptação. Seguiu-se um aumento na sua produção tendo-se obtido, no final dos 21 dias, uma massa média de 0,79 g; a massa seca média obtida foi 0,42 g.

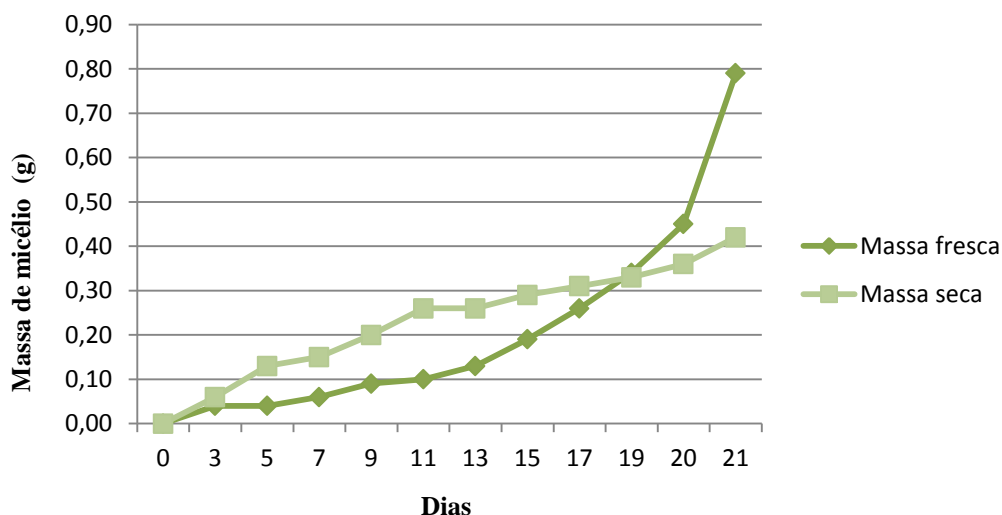


Figura 30. Crescimento do micélio de *Lepista nuda* comercial, com base nas massas fresca e seca obtidas em meio de cultura PACH.

No meio de cultura FAD, a produção média de massa seca demonstrou alguma irregularidade (Figura 31).

A produção média de massa fresca nos primeiros 11 dias teve um crescimento moderado e após 19 dias teve uma pequena regressão; no entanto, nos últimos dias da experiência apresentou crescimento exponencial, tendo-se obtido uma massa final de 0,63 g. A curva de crescimento de massa seca nos primeiros 7 dias apresentou uma fase lag, sem crescimento. Passados 7 dias, teve um crescimento muito rápido, mas logo nos dias seguintes esse crescimento manteve-se constante. Nos últimos 4 dias de experiência, apresentou um crescimento moderadamente exponencial, tendo-se obtido uma massa final de 0,30 g, permite uma maior disponibilidade energética e de esqueletos de carbono para produção de precursores e biomoléculas essenciais ao desenvolvimento do micélio.

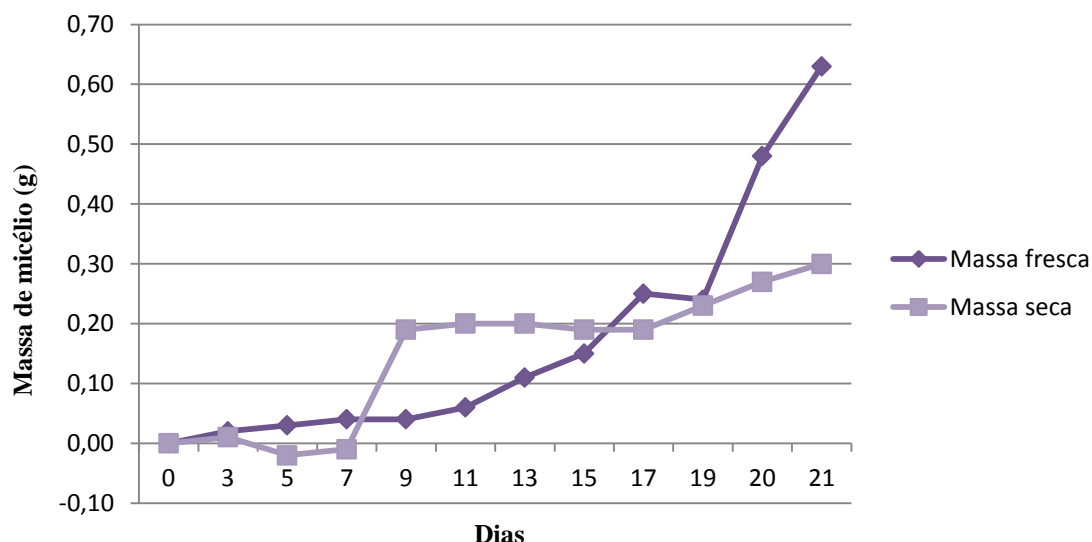


Figura 31. Crescimento do micélio de *Lepista nuda* comercial, com base nas massas fresca e seca obtidas em meio de cultura FAD.

Na determinação das curvas de crescimento do micélio por massa fresca e seca em meio PDA, os resultados também não apresentaram oscilações.

A produção média de massa fresca nos primeiros dias teve um crescimento moderado. No entanto, passado 9 dias, esse crescimento foi exponencial, tendo-se obtido a massa final de 1,02 g. Em relação à curva de massa seca, esta acompanhou o crescimento de massa fresca, mas de forma muito mais moderada e com uma produção final de 0,23 g (Figura 32).

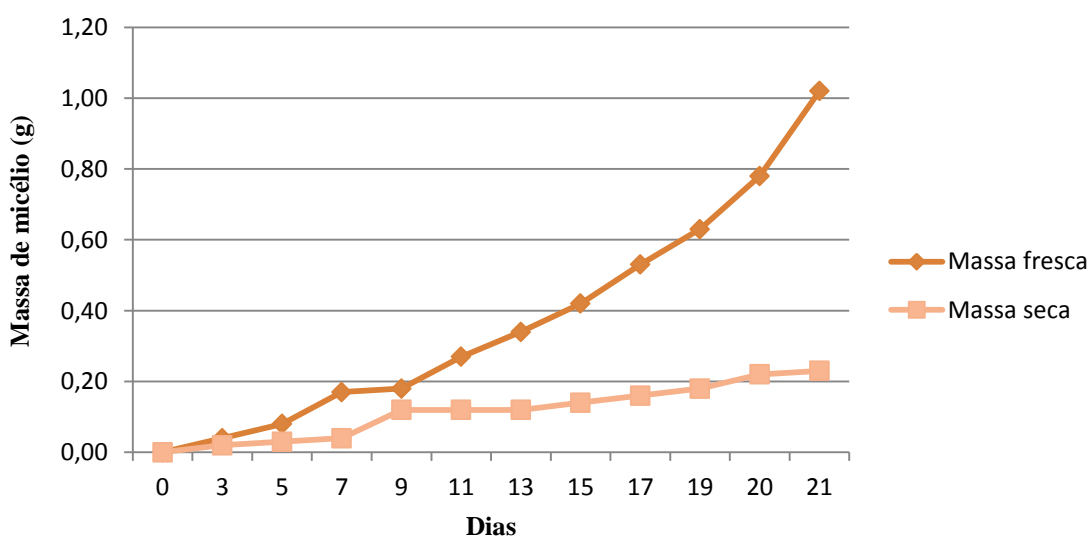


Figura 32. Crescimento do micélio de *Lepista nuda* comercial, com base nas massas fresca e seca obtidas em meio de cultura PDA.

Mais uma vez, de todos os meios de cultura usados, o que conduziu a uma maior produção de massa fresca para a amostra comercial foi o meio MMN completo. No entanto, o que apresentou uma maior produção média de massa seca, isto é de biomassa, foi o meio de cultura PACH. Este meio é muito rico em glucose que é a fonte de carbono mais usada pelos fungos (Web 8).

A composição da fração orgânica dos meios de cultura é responsável pelo fornecimento de carbono e azoto, enquanto que a fração inorgânica exerce um papel importante na disponibilização de micronutrientes que normalmente estão envolvidos no funcionamento dos sistemas de transporte celular e das reações enzimáticas (Hoseney, 1991). Em 1996, Stott et al. descreveram que o micélio se desenvolvia em meio com agar, extrato de malte e levedura a 2%; Wright & Hayes em 1978, afirmam que meios enriquecidos com caseína ou peptona hidrolisada permitiam o desenvolvimento do micélio.

O meio de cultura MMN completo é um meio rico, em comparação aos meios de cultura MMN incompleto, PDA e FAD. No entanto, o meio de cultura PACH é o mais rico em comparação a todos os outros meios de cultura.

Os valores da TRC obtidos a partir das massas de micélio das amostras de prado e comerciais, obtidas nos diferentes meios de cultura são apresentados nas Figuras 33 e 34.

Para a amostra proveniente de prado, o meio de cultura que permitiu uma maior produção de massa foi o MMN completo com $114,33 \text{ g g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. No entanto, o meio de cultura FAD também conduziu a uma quantidade significativa de massa ($98,00 \text{ g g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$).

Em resumo, o meio de cultura adequado a uma produção de micélio da amostra de *L. nuda* proveniente de prado, é o MMN completo (Figura 33).

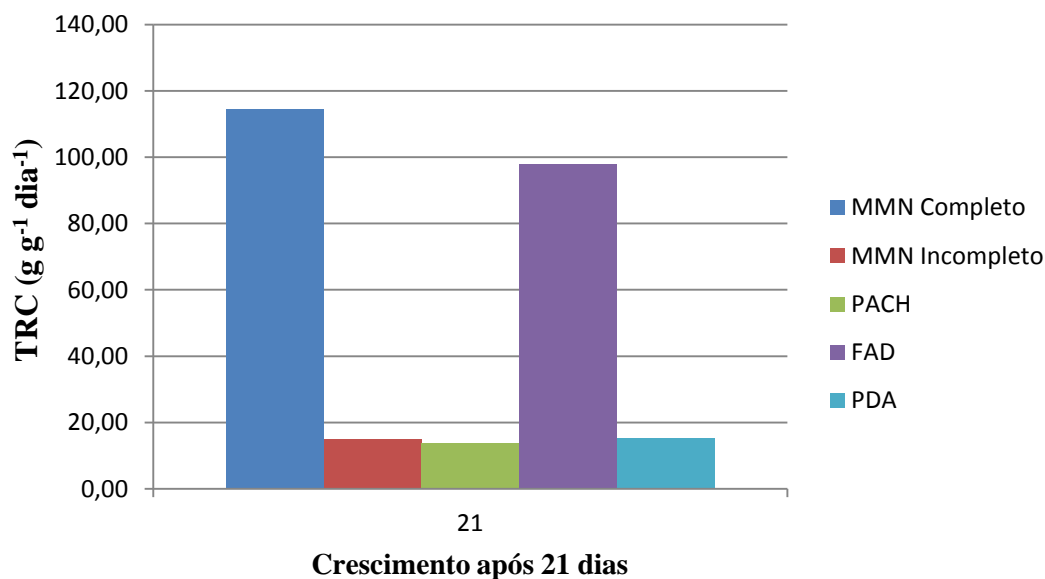


Figura 33. Taxa Relativa de crescimento (TRC) com base na massa de micélio obtida a partir, da amostra de *Lepista nuda* proveniente de prado.

De acordo com os valores de TRC relativos ao micélio da amostra comercial, verifica-se que os meios que permitiram uma maior produção de massa foram MMN incompleto e PACH, onde a produção foi $0,70 \text{ g g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. O meio de cultura MMN completo também conduziu a uma grande produção de massa ($0,69 \text{ g g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$). Assim, os meios de cultura que produziram uma maior quantidade de massa de micélio foram MMN completo, incompleto e PACH (Figura 34).

Estes resultados confirmam o que foi descrito anteriormente para a amostra comercial, à exceção do meio de cultura MMN incompleto, que na taxa relativa de crescimento está equiparado ao meio de cultura PACH. Os resultados obtidos podem estar relacionados com o facto desta amostra ser uma estirpe selecionada pelo produtor por ter a capacidade de crescer muito rapidamente com concomitante aumento de massa e volume o que será uma mais valia na produção e posterior comercialização e por ter a capacidade de adaptação a vários meios de cultura.

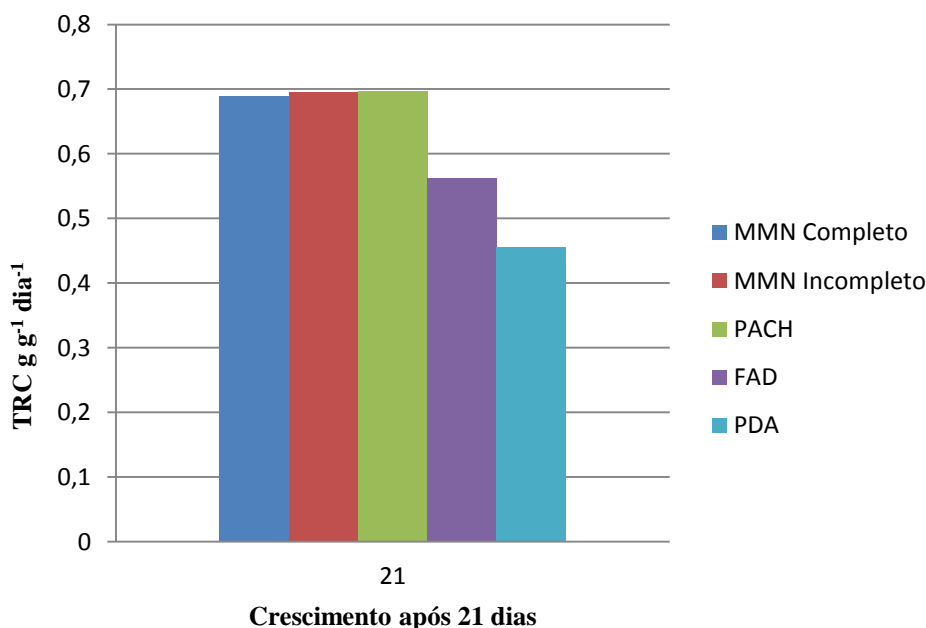


Figura 34. Taxa Relativa de crescimento (TRC) com base na massa de micélio obtida a partir da amostra comercial de *Lepista nuda*.

3.1.3. Avaliação do crescimento do micélio de *Lepista nuda* obtido a partir da amostra comercial, em diferentes meios de cultura sólidos sob condições de stresse de temperatura

Ao longo do tempo, com a inoculação da amostra comercial verificou-se que o micélio ao crescer não ficava com a cor azulada/arroxeadada, tal como foi visível para a amostra silvestre em crescimento. Uma vez que os esporos são dessa cor característica, a causa poderia estar relacionada com uma menor produção dos mesmos nos meios de cultura testados e respetivas condições de crescimento. Decidiu-se, então, colocar o fungo em condições de stresse verificando, posteriormente, se essas condições contribuiriam para o aumento da produção dos esporos como resposta do fungo ou se as razões estariam mais relacionadas com diferenças morfológicas inerentes a diferentes clones com origens genéticas diversas. Escolheu-se a temperatura como agente de stresse, já que o fungo silvestre sofre alterações de temperatura quando se encontra nos seus *habitats* naturais. Assim, se a amostra de fungo comercial sofresse alterações de condições de crescimento, poder-se-ia obter micélio de cor azul/roxa.

Ao induzirmos as condições de stresse na amostra comercial, verificou-se que ao fim de 30 dias, o micélio em todas as placas com diferentes meios de cultura e a

diferentes temperaturas (4° e 37 °C), não sofreu qualquer crescimento. Passado 20 dias, à temperatura ambiente e ao escuro, verificou-se que houve crescimento em todas as amostras que se encontravam no frio (4 °C). De entre as que se encontravam no quente (37 °C), somente as crescidas em meio PACH apresentaram crescimento (Tabela 2).

O meio PACH um meio de cultura mais rico, permitindo assim que o micélio, sobrevivesse a temperaturas elevadas (37 °C) e crescesse com uma elevada quantidade de nutrientes, quando colocado a temperaturas de aproximadamente de 25 °C.

O crescimento do micélio à temperatura de 4° C em todos os meios de cultura, pode dever-se ao facto do micélio ter entrado numa fase estacionária de crescimento devido a uma inativação enzimática temporária. Quando colocado à temperatura de aproximadamente 25 °C, a atividade enzimática foi restaurada e o micélio começou a crescer.

Tabela 2. Resultados de crescimento obtidos nos diferentes meios de cultura a diferentes temperaturas.

	MMN completo	MMN incompleto	PACH	FAD	PDA
Temperatura de 37° C	Sem crescimento	Sem crescimento	Com crescimento	Sem crescimento	Sem crescimento
Temperatura de 4° C	Com crescimento	Com crescimento	Com crescimento	Com crescimento	Com crescimento

Em relação à alteração da cor verificou-se que em nenhum meio de cultura em que houve crescimento, a cor foi alterada (Figura 35). Isto pode significar que as condições de stresse aplicadas podem não ter influência na cor dos micélios e dos esporocarpos. No entanto, pode-se afirmar que a temperatura ótima de crescimento do micélio de *L. nuda* se encontra entre os 4 e os 37 °C. Provavelmente, a amostra comercial do fungo já tinha muitas gerações e pode também ter sido selecionada, pelo produtor, uma estirpe com determinadas características tais como um crescimento muito rápido e mais produtivo. No entanto, o micélio pode ter perdido a capacidade de se tornar azulado/arroxeadado.



Figura 35. Resultados obtidos no crescimento do micélio nos diferentes meios de cultura e diferentes temperaturas, e a cor obtida.

3.2. Composição em voláteis nas amostras de *Lepista nuda* comerciais e silvestres provenientes de diferentes *habitats*

São poucos os estudos que descrevem os compostos voláteis presentes nos cogumelos. No entanto, em 1989, Audouin et al., realizaram um estudo sobre os compostos voláteis de amostras secas de *L. nuda* silvestre, onde descreveram o 1-octen-3-ol como o composto predominante. Foi já demonstrada a importância dos compostos C8 (1-octen-3-ol, octanol, 3-octanol, 1-octen-3-ona, 2-octenol e 3-octanona) no sabor de diferentes variedades de cogumelos (Noel-Suberville et al., 1996). Os últimos autores demonstraram que o composto volátil mais abundante em amostras frescas de *L. nuda* era 1-octen-3-ol e o principal ácido gordo era o ácido linoleico (C18: 2). Esta observação foi confirmada no presente trabalho, tal como se pode observar na secção seguinte.

Os resultados obtidos para a composição em voláteis nas amostras estudadas, após uma destilação-extração Likens-Nickerson, são apresentados na Tabela 3. Identificaram-se vinte e dois compostos em cada uma das três amostras (exemplares comerciais e provenientes de carvalho e pinhal), constituindo 84-94% de fração volátil. As diferenças entre os voláteis das amostras silvestres e comercial foram principalmente quantitativas. A principal diferença foi observada na quantidade relativa de 2-pentilfurano, presente em pequena quantidade nos cogumelos silvestres (provenientes de carvalho e pinhal; 2-5%; quarto composto mais abundante) e em quantidade consideravelmente maior na amostra comercial (15%; segundo composto mais abundante).

O 2-pentilfurano (Figura 36) tem sido descrito como um dos derivados de compostos orgânicos voláteis da peroxidação do ácido linoleico.

Existem duas vias possíveis para a biossíntese do 2-pentilfurano a partir do ácido linoleico: a partir das espécies reativas de oxigénio, ou a partir da via enzimática que só existe nos fungos (Bhandari, 2011).

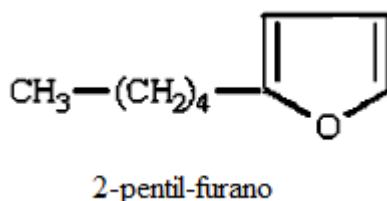


Figura 36. Estrutura química do composto 2-pentilfurano (Bhandari, 2011).

Os compostos voláteis com cadeias de oito carbonos (C8) são ubíquos entre fungos e o 1-octen-3-ol é o mais abundante sendo apontado como responsável pelo aroma característico de fungos. No presente estudo, o 1-octen-3-ol foi detetado em pequenas quantidades em todas as amostras (vestígios-2%), o que contradiz os resultados obtidos por Bhandari (2011). Zawirska-Wojtasiak (2004) descreveu o 1-octen-3-ol como um composto característico dos cogumelos e que ocorre, na maioria deles, em grandes quantidades. Assim, este composto pode ser usado para autenticar o aroma do cogumelo em estudo.

A concentração deste composto nas três amostras foi pouco significativa, sendo os componentes principais o linalool (17 a 27%), a pulegona (12 a 14 %) e o limoneno (10 a 11 %), que não são comuns nas frações voláteis de outros cogumelos, mas sim em plantas.

As amostras silvestres provenientes de carvalho e pinhal apresentaram a maior percentagem do composto linalol (26,4 % e 25,2 %, respetivamente) (Figura 37), em comparação à amostra comercial (16,7 %). O composto linalol (IUPAC: 3,7-dimetil-1,6-octadieno-3-ol) é um álcool terpénico terciário, não saturado. Encontra-se na maioria dos óleos essenciais, incluindo o de *Lavandula* (lavanda), *Citrus reticulata* (bergamota, tangerina na Região Sul do Brasil), *Aniba rosaeodora* (pau-rosa), sendo o principal componente. É um composto orgânico e é pouco solúvel em água como a maioria dos compostos que fazem parte dos óleos essenciais (Web 10).

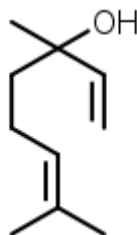


Figura 37. Estrutura do linolol (3,7-dimetil-1,6-octadieno-3-ol) (Web 10).

O segundo composto mais abundante nas amostras silvestres provenientes de carvalho (13,7 %) e pinhal (14,3 %) foi a pulegona (Figura 38); já na amostra de comercial (12,1 %) foi o terceiro mais abundante, mas com uma percentagem similar às anteriores.

A pulegona tem uma ocorrência natural e é um composto orgânico obtido a partir de óleos essenciais de uma variedade de plantas, tais como *Nepeta cataria* (*catnip*- erva dos gatos), *Mentha piperita*, (hortelã pimenta) e *Mentha pulegium* (poejo). É classificado como um monoterpene, é um líquido oleoso incolor e tem um odor agradável, semelhante ao poejo, hortelã-pimenta e cânfora. É utilizado em agentes aromatizantes, em perfumaria e em aromaterapia (Web 11).

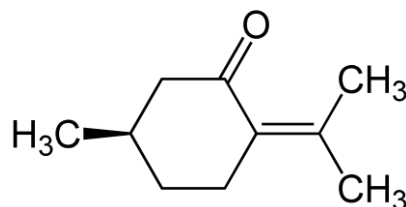


Figura 38. Estrutura química da pulegona (Web 11).

O composto limoneno (Figura 39) foi o terceiro em maior percentagem nas amostras provenientes de carvalho (9,5 %) e pinhal (9,9 %), e quarto na amostra comercial (10,8 %). O limoneno (IUPAC: 1-metil-4-isopropenilciclohex-1-eno) é uma substância química, orgânica, natural, pertencente à família dos terpenos, classe dos monoterpeneos, de fórmula molecular $C_{10}H_{16}$, encontrada em frutos cítricos (cascas principalmente de limões e laranjas), volátil e, por isso, responsável pelo cheiro que esses frutos apresentam. Nos últimos anos, a sua requisição tem aumentado muito

devido ao uso em solventes biodegradáveis. Por possuir um centro quiral, concretamente um carbono assimétrico, apresenta isomeria ótica. Portanto, existem dois isómeros óticos: o D-limoneno e o L-limoneno. A nomenclatura IUPAC correta é *R*-limoneno e *S*-limoneno, porém empregam-se com mais frequência os prefixos D e L ou alfa e beta. Além de solvente industrial também apresenta aplicações como componente aromático, ou em dissolventes de resinas, pigmentos, tintas, na fabricação de adesivos, etc., e é usado amplamente na síntese de novos compostos. Por ser um derivado dos citrinos, o limoneno pode ser considerado um agente de transferência de calor e ambientalmente inócuo, pelo que é utilizado em muitos processos farmacêuticos e de alimentos, por exemplo, como componente aromático e para dar sabor na obtenção de sabores artificiais de menta e na fabricação de doces e pastilhas elásticas (Web 12).

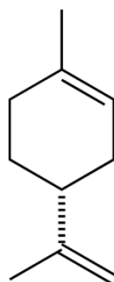


Figura 39. Estrutura química do limoneno, (Web 12)

A fração volátil das diferentes amostras em estudo foi, certamente, influenciada pelo *habitat* de proveniência dos corpos frutíferos. Cho et al. (2008), referem que os perfis dos componentes voláteis podem variar com as espécies e variedades, mas que também podem ser influenciados pelas condições de cultivo e/ou *habitat*.

A produção de compostos pode ser bastante sensível aos constituintes do meio de cultura e às condições do ambiente *in vivo*, portanto, os compostos produzidos por uma espécie num meio de cultura pode ser diferente quando inserida num meio de cultura diferente (Hanson, 2008).

É de referir que foi realizada a análise dos micélios obtidos por cultura *in vitro*, de amostras comerciais e de prado, seguindo a mesma metodologia referida anteriormente. No entanto, na análise da fração volátil destas amostras, verificou-se que a percentagem insignificante dos compostos não justificava uma quantificação e, por consequência, apresentação dos resultados. Para uma quantificação adequada nestas amostras seriam necessárias quantidades de micélio bastantes superiores.

Tabela 3. Composição da fração volátil, obtida por LN, de amostras de *Lepista nuda* comerciais e silvestres de carvalho e pinhal

Componentes	RI	Carvalho	Pinhal	Comercial
α -Pino	930	1.2	1.1	0.9
Sabineno	958	3.2	2.1	2.1
1-Octen-3-ol	961	1.7	0.5	v
β -Pino	963	3.0	1.0	2.0
2-pentil furano	973	2.2	5.2	14.8
p-Cimeno	1003	1.7	2.4	2.5
1,8-Cineol	1005	5.6	7.0	10.7
Limoneno	1009	9.5	9.9	10.8
γ -Terpineno	1035	0.6	0.3	0.3
n-Octanol	1045	v	2.3	v
Fenchone	1057	3.5	4.7	6.7
trans-Linalol óxido	1059	1.3	1.8	4.3
Linalol	1074	26.4	25.2	16.7
α -Tuiona	1074	v	0.4	v
Cânfora	1095	5.1	5.6	6.6
Mentona	1120	v	0.3	0.6
Isoborneol	1132	1.6	1.1	0.5
Terpineno-4-ol	1148	3.8	3.6	2.5
α -Terpineol	1159	v	0.9	v
Metil chavicol (Estragol)	1163	v	0.5	v
Pulegona	1210	13.7	14.3	12.1
cis-Anetol	1220	v	1.0	v
Identificação %		84.1	91.2	94.1
Componentes agrupados				
Hidrocarbonetos Monoterpénicos		24.8	16.8	18.6
Contendo oxigénio monoterpénicos	55.4		66.4	60.7
Outros		3.9	8.0	14.8

RI = Índice de Retenção em relação a n-alcanos C9-C13 na coluna DB-1; v- vestígios (% <0,05).

Estes resultados podem ajudar na compreensão da influência do *habitat*, nomeadamente dos compostos presentes no solo, na fração volátil, mas também no sabor. Podem também ser importantes ou de interesse industrial, pois estes compostos são usados em diferentes áreas, como na perfumaria, cosmética, indústrias farmacêuticas e outras indústrias.

3.3. Composição proximal e ácidos gordos maioritários nas amostras de *Lepista nuda* comerciais e silvestres provenientes de diferentes *habitats*

Os resultados da composição proximal dos corpos frutíferos de amostras de *Lepista nuda* comerciais e silvestres provenientes de diferentes *habitats*, são apresentados na Tabela 4. A amostra comercial, que foi cultivada, apresentou os níveis mais elevados de humidade (91 g/100 g fw), proteínas (12 g/100 g dw), glúcidos (77 g/100 g dw) e o maior valor energético (367 kcal/100 g dw). Por sua vez, as amostras silvestres provenientes de pinhal e carvalho apresentaram os teores mais elevados de cinzas (12 g/100 g dw) e lípidos (2 g/100 g dw), respetivamente.

Os glúcidos foram os macronutrientes mais abundantes em todas as amostras, enquanto os lípidos foram os menos abundantes. No entanto, enquanto os corpos frutíferos de origem comercial revelaram níveis mais elevados de proteínas do que de cinzas, o oposto foi observado em ambas as amostras silvestres. Este facto pode dever-se à composição do solo em que os cogumelos cresceram (Nikkarinen & Mertanen, 2004) e ao facto das espécies silvestres absorverem níveis mais elevados de minerais.

Tabela 4. Composição proximal e ácidos gordos maioritários dos corpos frutíferos de *Lepista nuda* obtidos em diferentes *habitats*.

	Comercial	Silvestre Pinhal	Silvestre Carvalho
Humidade (g/100 g fw)	90,61± 0,96	85,52± 1,11	89,06± 0,45
Cinzas (g/100 g dw)	9,56 ± 0,06 ^c	26,15 ± 2,42 ^a	13,20 ± 0,85 ^b
Proteínas (g/100 g dw)	12,18 ± 0,22 ^a	8,11 ± 0,58 ^b	1159 ± 0,61 ^a
Lípidos (g/100 g dw)	1,14 ± 0,00 ^b	1,27 ± 0,05 ^b	2,04 ± 0,21 ^a
Glúcidos (g/100 g dw)	77,12 ± 0,20 ^a	64,47 ± 1,54 ^c	73,17 ± 1,17 ^b
Energia (kcal/100 g dw)	367,46 ± 0,16 ^a	334,32 ± 62,30 ^c	357,40 ± 1,65 ^b
C16:0 (Percentagem relativa)	14,86 ± 0,12 ^c	26,97 ± 078 ^a	20,70 ± 0,39 ^b
C18:0 (Percentagem relativa)	0,88 ± 0,06 ^c	2,77 ± 0,08 ^a	1,55 ± 0,26 ^b
C18:1n9c (Percentagem relativa)	16,05 ± 0,40 ^c	25,02 ± 1,20 ^b	35,74 ± 1,02 ^a
C18:2n6c (Percentagem relativa)	63,88 ± 0,44 ^a	37,63 ± 0,19 ^b	37,71 ± 1,20 ^b
SFA (Percentagem relativa)	18,90 ± 0,16 ^c	34,43 ± 1,05 ^a	24,80 ± 0,01 ^b
MUFA (Percentagem relativa)	16,69 ± 0,27 ^c	27,21 ± 1,22 ^b	36,74 ± 1,07 ^a
PUFA (Percentagem relativa)	64,41 ± 0,43 ^a	38,36 ± 0,17 ^b	38,46 ± 1,08 ^b

Em cada linha letras diferentes representam diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$). Ácido palmítico (C16:0); Ácido esteárico (C18:0); Ácido oleico (C18:1n9c); Ácido linoleico (C18:2n6c). Foram identificados e quantificados mais vinte e um ácidos gordos (dados não apresentados).

SFA – ácidos gordos saturados; MUFA – ácidos gordos monoinsaturados; PUFA – ácidos gordos polinsaturados.

O valor energético obtido para a amostra silvestre proveniente de pinhal foi semelhante ao de outra amostra do mesmo *habitat* (334 kcal/100 g dw) conforme descrito anteriormente por Barros et al. (2008), mas inferior ao valor indicado por Ouzouni et al. (2009) para uma amostra silvestre da Grécia (392 kcal/100 g dw; calculado a partir dos dados disponíveis).

Os resultados dos ácidos gordos maioritários encontrados nas amostras estudadas, bem como as percentagens de ácidos gordos saturados (SFA), de ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) e de ácidos gordos polinsaturados (PUFA) são apresentados na Tabela 4. Foram detetados até vinte e cinco ácidos gordos na maioria das amostras (Figura 40). O ácido gordo maioritário encontrado foi o ácido linoleico (C18: 2n6), o que está de acordo com outros estudos (Noel-Suberville et al., 1996; Barros et al., 2008).

O ácido oleico (C18: 1n9) e o ácido palmítico (C16: 0) também foram ácidos gordos maioritários com diferentes ordens, dependendo da amostra. A amostra

comercial apresentou os níveis mais elevados de PUFA (64%) devido à contribuição do ácido linoleico, a amostra silvestre proveniente de carvalhal apresentou os níveis mais elevados de MUFA (37%) devido aos teores mais elevados de ácido oleico, e a amostra silvestre proveniente de pinhal revelou os níveis mais elevados de SFA (34%) devido aos níveis mais elevados dos ácidos palmítico e esteárico.

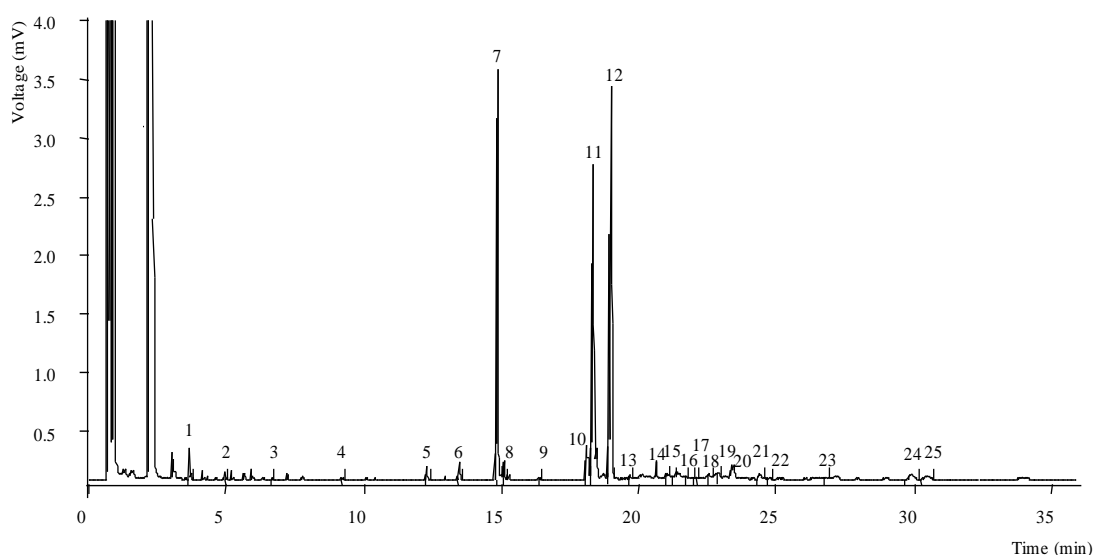


Figura 40. Perfil em ácidos gordos do corpo frutífero de *Lepista nuda* silvestre proveniente de carvalhal. 1-Ácido caproico (C6:0); 2-Ácido caprílico (C8:0); 3-Ácido cáprico (C10:0); 4-Ácido láurico (C12:0); 5-Ácido mirístico (C14:0); 6-Ácido pentadecanoico (C15:0); 7-Ácido palmítico (C16:0); 8-Ácido 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 araquídico (C20:0); 15-Ácido cis-11-eicosenoico (C20:1c); 16-Ácido cis-11,14-eicosadienoico (C20:2c); 17-Ácido cis-11,14,17-eicosatrienoico e ácido heneicosanoico (C20:3n3+C21:0); 18-Ácido araquidónico (C20:4n6); 19-Ácido cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (C20:5n3); 20-Ácido beénico (C22:0); 21-Ácido erúico (C22:1n9); 22-Ácido cis-13,16-docosadienoico (C22:2) 23-Ácido tricosanoico (C23:0); 24-Ácido lignocérico (C24:0); 25-Ácido nervónico (C24:1).

3.4. Composição química dos corpos frutíferos e dos micélios de *Lepista nuda*

A glucose foi o açúcar maioritário em todas as amostras de micélio, enquanto a trealose predominou nos corpos frutíferos (Tabela 5). Foi encontrado manitol no corpo frutífero da amostra comercial e no micélio obtido em meio de cultura MMN completo e PDA da mesma amostra, enquanto a frutose só apareceu nos corpos frutíferos das amostras comerciais e de carvalhal.

Os corpos frutíferos da amostra comercial revelaram os níveis mais elevados de frutose e de manitol, enquanto as concentrações mais elevadas de glucose, trealose e açúcares totais foram encontradas no micélio obtido em PACH (21 g/100 g dw), MMN incompleto (5 g/100 g dw) e PACH (24 g/100 g dw), respetivamente. O perfil em açúcares das amostras comercial e do micélio MMN completo pode ser observado na Figura 41A.

Entre os ácidos orgânicos foi possível quantificar os ácidos cítricos, fumárico, málico, oxálico e quínico em todas as amostras de corpos frutíferos (comercial ou silvestres) (Tabela 5). A amostra silvestre proveniente de carvalho originou os níveis mais elevados dos últimos três compostos mencionados, bem como de ácidos orgânicos totais (10 g/100 g dw). A maioria dos compostos desapareceu nas amostras de micélio obtidas a partir de diferentes meios de cultura; apenas permaneceu o ácido oxálico, embora em baixas quantidades.

O perfil em ácidos orgânicos das amostras comercial e de micélio obtido em MMN completo pode ser observado na Figura 41B. Os ácidos orgânicos encontram-se envolvidos em várias vias fundamentais do metabolismo de glúcidos, lípidos e proteínas como produtos intermediários ou finais, nomeadamente no ciclo de Krebs, que é o ciclo de rendimento energético central da célula (Voet et al., 2008). Portanto, é lógico que os micélios obtidos sob condições *in vitro* consumam esses compostos ao longo do seu crescimento.

O ácido *p*-hidroxibenzoico e um composto fenólico relacionado (ácido cinâmico) foram encontrados nas amostras estudadas (Tabela 5). A amostra comercial revelou o teor mais elevado em ácidos *p*-hidroxibenzoico e cinâmico (0,29 e 0,08 mg/100 g dw, respetivamente). Entre os micélios, o crescido em meio MMN completo revelou a concentração mais elevada de ambos os compostos. Um estudo anterior realizado por Barros et al. (2009) descreveu a presença de outros compostos fenólicos, nomeadamente ácidos protocatéquico e *p*-cumárico e a ausência de ácido cinâmico em amostras de *L. nuda* também recolhidas em Bragança (Nordeste de Portugal), mas em 2007.

Relativamente aos tocoferóis, as isoformas β - e γ -tocoferóis foram encontradas em todas as amostras (Figura 41C), enquanto o α -tocoferol só foi detetado nos corpos frutíferos silvestres de carvalho e em micélio crescido em meio de cultura MMN completo, embora em quantidades muito baixas (Tabela 5). O α -tocoferol foi também a isoforma menos abundante nas amostras silvestres de pinhal de acordo com estudos

anteriores (Barros et al., 2008) e o δ -tocoferol esteve também ausente noutras amostras de *Lepista nuda* estudadas por diferentes autores (Elmastas et al., 2007; Barros et al., 2008). Os meios de cultura PDA, PACH e FAD demonstraram ser os melhores para a produção de tocoferóis (6-7 mg/100 g dw). Num trabalho anterior realizado por Reis et al. (2011) foi possível observar um aumento dos níveis de γ -tocoferol em micélio de fungo ectomicorrízico produzido *in vitro* quando comparado com os seus corpos frutíferos, o que neste trabalho também se observou para a isoforma β -.

Tabela 5. Composição em açúcares, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e tocoferóis dos corpos frutíferos de *Lepista nuda* provenientes de diferentes *habitats* e do micélio obtido, *in vitro*, em diferentes meios de cultura.

	Amostra comercial de corpo frutífero e micélio obtido <i>in vitro</i>						Amostras silvestres de corpo frutífero	
	Corpo frutífero	MMN completo	MMN incompleto	PDA	PACH	FAD	Pinhal	Carvalhal
Frutose	0,17 ± 0,01 ^a	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,13 ± 0,02 ^b
Glucose	nd	6,12 ± 0,17 ^c	6,94 ± 0,13 ^c	3,73 ± 0,44 ^d	21,15 ± 0,54 ^a	11,88 ± 0,59 ^b	1,18 ± 0,02 ^e	1,12 ± 0,02 ^e
Manitol	1,63 ± 0,02 ^a	0,27 ± 0,01 ^c	nd	0,45 ± 0,19 ^b	nd	nd	nd	nd
Trealose	1,85 ± 0,00 ^f	4,79 ± 0,10 ^b	5,35 ± 0,09 ^a	3,02 ± 0,30 ^d	3,17 ± 0,05 ^d	2,25 ± 0,03 ^e	3,97 ± 0,11 ^c	2,25 ± 0,02 ^e
Total (g/100 g dw)	3,65 ± 0,01 ^d	13,60 ± 0,16 ^b	12,30 ± 0,04 ^{cb}	11,20 ± 2,03 ^c	24,32 ± 0,59 ^a	14,13 ± 0,62 ^b	5,16 ± 0,09 ^d	3,50 ± 0,05 ^d
Ácido cítrico	0,57 ± 0,04 ^a	nd	nd	nd	nd	v	0,25 ± 0,01 ^c	0,35 ± 0,04 ^b
Ácido fumárico	0,02 ± 0,00 ^c	v	v	v	v	v	0,07 ± 0,00 ^a	0,06 ± 0,00 ^b
Ácido málico	1,75 ± 0,19 ^a	nd	nd	nd	nd	v	1,39 ± 0,05 ^b	1,79 ± 0,02 ^a
Ácido oxálico	2,41 ± 0,31 ^c	0,88 ± 0,06 ^d	1,02 ± 0,04 ^d	0,05 ± 0,01 ^e	0,07 ± 0,00 ^e	v	3,09 ± 0,02 ^b	3,49 ± 0,00 ^a
Ácido quínico	3,08 ± 0,18 ^b	nd	nd	nd	nd	v	2,43 ± 0,01 ^c	3,89 ± 0,00 ^a
Total (g/100 g dw)	7,83 ± 0,11 ^b	0,88 ± 0,06 ^d	1,02 ± 0,04 ^d	0,05 ± 0,01 ^e	0,07 ± 0,00 ^e	v	7,23 ± 0,01 ^c	9,59 ± 0,28 ^a
Ácido <i>p</i>-hidroxibenzoico	0,29 ± 0,03 ^a	0,13 ± 0,01 ^{cb}	0,04 ± 0,00 ^d	v	tr	nd	0,10 ± 0,01 ^c	0,15 ± 0,02 ^b
Ácido cinâmico (mg/100 g dw)	0,08 ± 0,01 ^a	0,01 ± 0,00 ^b	nd	nd	nd	nd	v	0,01 ± 0,00 ^b
α-Tocoferol	v	0,03 ± 0,00 ^a	nd	nd	nd	nd	v	0,01 ± 0,00 ^b
β-Tocoferol	0,01 ± 0,00 ^b	0,26 ± 0,00 ^b	0,05 ± 0,00 ^b	6,41 ± 0,22 ^a	6,32 ± 0,22 ^a	6,40 ± 0,22 ^a	0,02 ± 0,00 ^b	0,07 ± 0,00 ^b
γ-Tocoferol	0,03 ± 0,01 ^d	0,08 ± 0,02 ^{cb}	0,11 ± 0,00 ^b	0,20 ± 0,02 ^a	0,06 ± 0,00 ^{cd}	0,20 ± 0,02 ^a	0,04 ± 0,00 ^{de}	0,05 ± 0,00 ^{cde}
Total (mg/100 g dw)	0,03 ± 0,02 ^b	0,37 ± 0,02 ^b	0,15 ± 0,01 ^b	6,61 ± 0,21 ^a	6,38 ± 0,23 ^a	6,38 ± 0,23 ^a	0,15 ± 0,01 ^b	0,38 ± 0,02 ^b

Em cada linha letras diferentes representam diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$). nd - não detetado; v - vestígios.

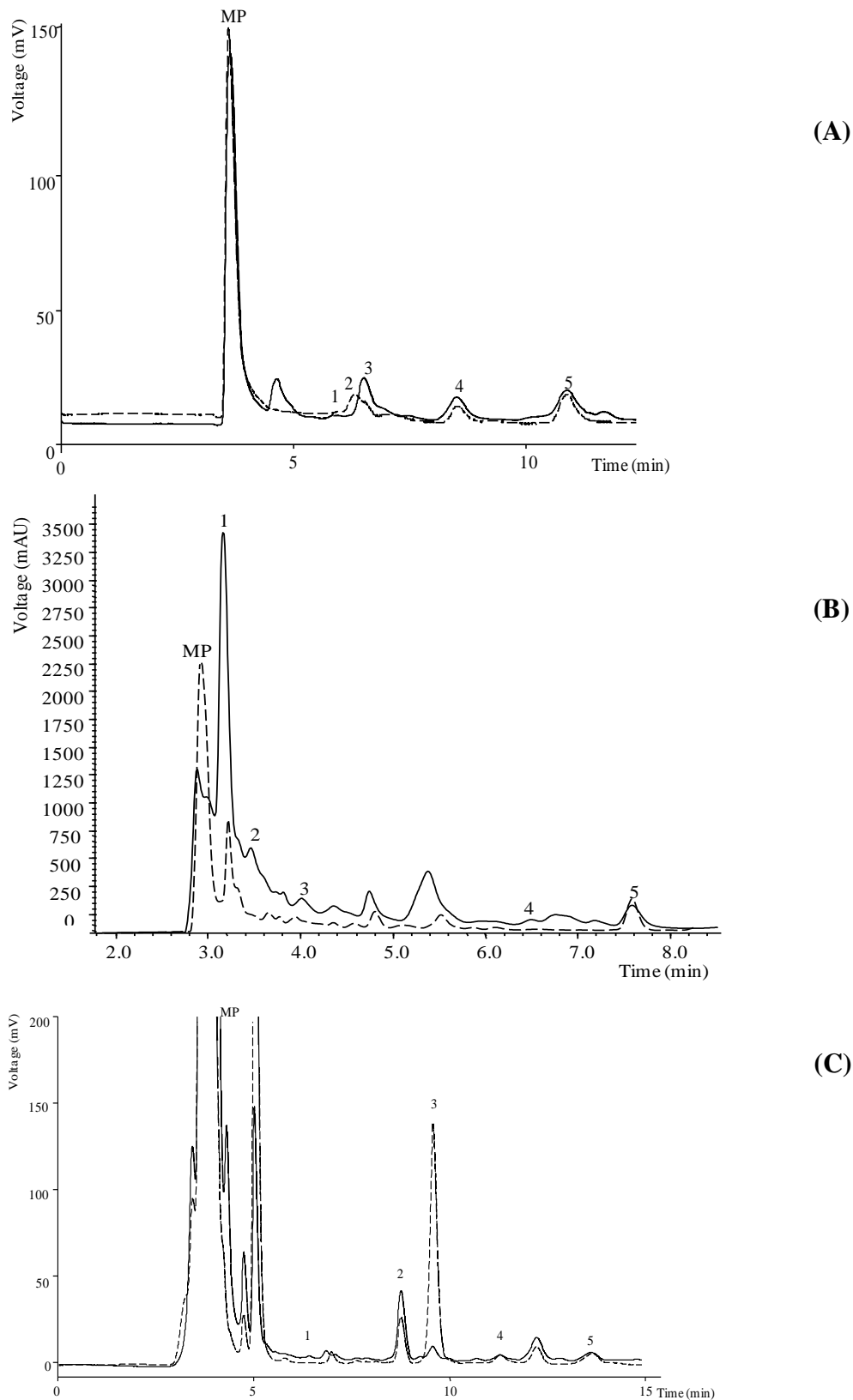


Figura 41. (A) Perfil em açúcares da amostra comercial (—) e do micélio MMN completo (----): MP- fase móvel; 1- frutose; 2- glucose; 3- manitol; 4- trealose; 5- rafinose (PI); (B) Perfil em ácidos orgânicos da amostra comercial (—) e do micélio MMN completo (----): MP- fase móvel; 1- ácido oxálico; 2- ácido quínico; 3- ácido málico; 4- ácido cítrico; 5- ácido fumárico; (C) Perfil em tocoferóis da amostra de carvalho (—) e da amostra de micélio FAD (----): MP- fase móvel; 1- α -tocoferol; 2- BHT; 3- β -tocoferol; 4- γ -tocoferol; 5- tocol (PI).

3.5. Atividade antioxidante dos corpos frutíferos e dos micélios de *Lepista nuda*

Para estudar a atividade antioxidante das amostras foram realizadas cinco metodologias: os ensaios de *Folin-Ciocalteu* e do ferricianeto/azul da prússia que avaliam o poder redutor, o ensaio do DPPH para avaliar a capacidade captadora de radicais livres e os ensaios do β -caroteno/linoleato e de TBARS para avaliar a inibição da peroxidação lipídica. Os resultados são apresentados na Tabela 6 e evidenciam que o meio de cultura MMN incompleto é o mais indicado para aumentar a atividade antioxidante de *Lepista nuda*. O micélio crescido neste meio originou a atividade antioxidante mais elevada em todos os ensaios: os valores mais elevados no ensaio de *Folin-Ciocalteu*, expressos em equivalentes de ácido gálico, e os valores mais baixos de EC_{50} nos outros ensaios, o que significa maior poder redutor ou potencial antioxidante. Neste estudo, as amostras silvestres originaram uma menor atividade captadora de radicais DPPH e inibição da descoloração do β -caroteno, mas um maior poder redutor e inibição TBARS do que aqueles descritos noutros trabalhos (Elmastas et al., 2007; Barros et al., 2008).

Tabela 6 Atividade antioxidante dos corpos frutíferos de *Lepista nuda* provenientes de diferentes *habitats* e do micélio obtido, *in vitro*, em diferentes meios de cultura.

		Amostra comercial de corpo frutífero e micélio obtido <i>in vitro</i>					Amostras silvestres de corpo frutífero		
		Corpo frutífero	MMN completo	MMN incompleto	PDA	PACH	FAD	Pinhal	Carvalhal
Poder redutor	Ensaio <i>Folin-Ciocalteu</i> (mg GAE/g extrato)	20,54 ± 0,31 ^d	30,27 ± 3,30 ^b	33,57 ± 2,25 ^a	17,01 ± 1,01 ^e	24,30 ± 1,39 ^c	9,19 ± 1,06 ^f	15,98 ± 1,23 ^e	16,57 ± 0,44 ^e
	Ensaio ferricianeto/azul da prússia (EC ₅₀ ; mg/mL)	1,50 ± 0,01 ^c	0,53 ± 0,03 ^f	0,51 ± 0,00 ^f	1,52 ± 0,04 ^c	1,02 ± 0,02 ^e	1,95 ± 0,02 ^b	2,08 ± 0,00 ^a	1,44 ± 0,02 ^d
Atividade Captadora	Ensaio da atividade sequestradora DPPH (EC ₅₀ ; mg/mL)	8,73 ± 0,48 ^{cb}	5,72 ± 0,49 ^{cb}	3,67 ± 0,05 ^c	6,78 ± 0,07 ^{cb}	9,55 ± 0,95 ^{cb}	102,75 ± 23,03 ^a	16,05 ± 0,18 ^b	15,48 ± 0,23 ^{cb}
Inibição da peroxidação lipídica	Ensaio β-caroteno/linoleato (EC ₅₀ ; mg/mL)	9,48 ± 1,02 ^d	16,67 ± 0,98 ^{ba}	8,02 ± 1,35 ^e	10,15 ± 0,89 ^d	15,50 ± 0,43 ^b	17,50 ± 0,70 ^a	12,24 ± 0,57 ^c	11,68 ± 0,61 ^c
	Ensaio TBARS (EC ₅₀ ; mg/mL)	1,75 ± 0,16 ^{bc}	3,52 ± 0,31 ^b	0,87 ± 0,04 ^c	3,35 ± 0,66 ^b	2,21 ± 0,46 ^{bc}	5,44 ± 0,43 ^{ba}	3,76 ± 0,53 ^b	8,17 ± 1,75 ^a

Em cada linha letras diferentes representam diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$).

Relativamente ao ensaio de *Folin-Ciocalteu*, valores mais elevados significam maior poder redutor; para os outros ensaios, os resultados são apresentados em valores de EC₅₀, o que significa que valores mais elevados correspondem a um menor poder redutor ou atividade antioxidante. EC₅₀: Concentração de extrato correspondente a 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância para o ensaio do ferricianeto/azul da prússia.



Capítulo IV

IV. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Neste trabalho, analisou-se o crescimento do fungo *Lepista nuda*, testando cinco meios de cultura diferentes e verificando as taxas de crescimento em situações de stresse associadas a temperaturas extremas. Avaliou-se ainda a composição química e as propriedades antioxidantes dos micélios obtidos, assim como de corpos frutíferos comerciais e silvestres provenientes de diferentes *habitats*. Dos meios de cultura testados, o meio MMN completo permitiu um melhor crescimento e desenvolvimento do macrofungo *L. nuda*.

Se o fungo for sujeito a altas temperaturas (condições de stresse), só em meios muito ricos é que voltou a crescer, no entanto em temperatura baixas, cresceu em qualquer um dos meios de cultura testados. Assim, podemos dizer que a temperatura de crescimento deste macrofungo estará situada entre os 4 a 30 °C.

Dos resultados obtidos podemos ainda concluir que a coloração característica do micélio em crescimento não se relacionou com as condições de stresse testadas, ou pelo menos essas condições não foram determinantes para a diferença morfológica entre os micélios com origem em amostras silvestres e os micélios obtidos de amostras comerciais. As causas desta diferente coloração poderão estar relacionadas com a diferente origem genética de cada um dos espécimes (silvestres e comerciais) usados no estudo; seria interessante aprofundar o conhecimento genético destes clones com estudos de biologia molecular com ferramentas como marcadores moleculares.

Por outro lado, mais estudos relacionados com a composição bioquímica das diferentes amostras de micélio obtidas de origens diferentes poderiam mostrar se a composição do micélio ou esporos diferem muito em termos de compostos com capacidade para conferir cor, nomeadamente pigmentos.

As amostras de corpos frutíferos comerciais e silvestres, provenientes de carvalhal e pinhal, revelaram a presença dos mesmos compostos voláteis, embora em percentagens diferentes. Os compostos maioritários foram, em geral, similares aos encontrados nas frações voláteis das plantas: linolol, pulegona, limoneno e 2-pentilfurano. Estes resultados demonstram a importância do *habitat* no desenvolvimento dos fungos.

Os corpos frutíferos da amostra comercial evidenciaram a maior contribuição energética e o maior conteúdo em PUFA devido à contribuição do ácido linoleico, bem como de compostos fenólicos; a amostra silvestre de carvalhal apresentou os níveis

mais elevados de ácidos orgânicos. As amostras de micélio demonstraram possuir teores elevados de glucose, tocoferóis e elevada atividade antioxidante. Em particular, o meio PACH demonstrou ser o mais adequado para a produção de glucose, os meios PDA, PACH e FAD para produção de β - e γ -tocoferóis, o meio MMN completo para obtenção de compostos fenólicos e o MMN incompleto para melhorar as propriedades antioxidantes.

A cultura *in vitro* poderá ser explorada para obtenção de compostos bioativos de macrofungos para aplicações industriais, controlando as condições ambientais de desenvolvimento para produzir uma maior quantidade desses compostos e para superar a diversidade da composição química observada em amostras provenientes de diferentes *habitats*.

O presente trabalho visou a otimização das condições de cultura *in vitro* do macrofungo *L. nuda*; o micélio, assim obtido, poderá ser utilizado como fonte de compostos voláteis de interesse para a cosmética, perfumaria, indústrias farmacêuticas, alimentares, entre outras indústrias. Para além dos voláteis, alguns compostos bioativos com interesse industrial poderão também ser extraídos e isolados.

O presente trabalho poderá ser alargado ao estudo de exemplares provenientes de outros *habitats* diferentes dos visados neste trabalho. Também deverão ser otimizadas outras condições de cultura nomeadamente, pH, humidade e luz.



Capítulo V

V. BIBLIOGRAFIA

5.1. Artigos e Livros

- AOAC, 1995. *Official methods of analysis* (16th Ed.). Arlington VA, USA: Association of Official Analytical Chemists.
- Audouin P., Vidal J-P., Richard, H., 1989. *Volatile compounds from aroma of some edible mushrooms: morel (Morchella conica), wood blewit (Lepista nuda), clouded agaric (Clitocybe nebularis) and false chanterelle (Hygrophoropsis aurantiaca)*. *Sci. Aliments*, 9, 185-193.
- Barreiros A. L. B., David J. M., David J. P., 2006. *Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo*. *Química Nova* Vol. 29, No. 1, 113-123.
- Barros L., Baptista P., Correia D.M., Casal S., Oliveira B., Ferreira, I.C.F.R., 2007. *Fatty acid and sugar compositions, and nutritional value of five wild edible mushrooms from Northeast Portugal*. *Food Chem.*, 105, 140-145.
- 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 and Chemical Toxicology*, 50, 1576-1582.
- 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., Venturini B., Baptista P., Estevinho L., Ferreira, I.C.F.R., 2008. *Chemical composition and biological properties of Portuguese wild mushrooms: A comprehensive study*. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 3856-3862.
- Bhandari S., 2011. *2-pentylfuran: biosynthesis by Aspergillus fumigatus in-vitro and investigation of confounders of a breath test in-vivo*. A Thesis Submitted for the Degree of Doctor of Philosophy at the University of Otago, Dunedin, New Zealand.
- Bravo L., 1998. *Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance*. *Nutrition Reviews*, 56, 317 – 333.
- Breheret S., Talou T, Raptor S., Bessiére J-M., 1997. *Monoterpenes in the Aromas of Fresh Wild Mushrooms*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 831-836.
- Carlile M.J., Watkinson S.C., Gooday G.W., 2001. *The Fungi*. Academic Press, 2nd Edition. Hungary.

- Chang S.T., Miles P.G., 2004. *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect and Environmental Impact* –2nd ed., 1-10, 27-35, 40-47.
- Cho I.H., Namgung H-J., Choi H-K., Kim Y-S., 2008. *Volatiles and key odorants in the pileus and stipe of pine-mushroom (Tricholoma matsutake Sing.)*. Food Chemistry 106 71–76.
- Coelho M.T., 1999. *Influência da concentração de CO2 na aclimatização de plantas de castanheiro regeneradas in vitro*. Master Thesis, Universidade de Évora, Portugal.
- Cunha A. P., 2005. *Farmacognosia e Fitoquímica*. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- Cunha A. P., Ribeiro J.A., Roque O.R., 2007. *Plantas aromáticas em Portugal Caracterização e Utilizações*. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- Dix N., Webster, J., 1995. *Fungal Ecology*. Chapman & Hall, London.
- Dulger B., Ergul C., Gucin F., 2002. *Antimicrobial activity of the macrofungus Lepista nuda*. Fitoterapia. 73, 695-697.
- Elmastas M., Isildak O., Turkekul I., Temur N., 2007. *Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms*. Journal of Food Composition and Analysis. 20, 337-345.
- Fang Y-Z, Yang S., Wu G., 2002. *Free radicals, antioxidants and nutrition*. Nutrition, 18, 872 – 879.
- Feofilova E. P., 2001. *The Kingdom fungi: Heterogeneity of physiological and biochemical properties and relationships with plants, animals, and prokaryotes (Review)*. Applied Biochemistry and Microbiology, 37, 124 – 137.
- Ferreira I.C.F.R., Barros L., Abreu,R.M.V., 2009. *Antioxidants in wild mushrooms*. Current Medicinal Chemistry, 16, 1543 – 1560.
- Ferry B.W., Das N., 1968. *Carbon Nutrition of some Mycorrhizal Boletus Species*. Trans. Brit. Mycol. Soc.. 51, 795-798.
- Frade B.L., Alfonso A.T., 2005. *Guía de campo de los hongos de la Península Ibérica*. Cd, Celarayn Editorial. León.
- 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 Res. Int. 44, 1029-1035.
- Guinberteau J., Olivier J-M., Bordaberry M.R., 1989. *Données récentes sur la culture des “pieds bleus” (Lepista sp.)*. (Recent data about blewit cultivation (Lepista sp.). Pépiniériste-Horticulteurs-Marachers Rev. Hortic. 298, 17-22.

- Gutteridge J.M., Halliwell B., 2000. *Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future*. Annuals of the New York Academy of Sciences, 899, 136 – 147.
- Hall C., 2001. *Sources of natural antioxidants: oilseeds, nuts, cereals, legumes, animal products and microbial sources*. In: Pokomý, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (Eds.), *Antioxidants in food: practical applications*. Woodhead Publishing Limited, United Kingdom.
- Hanson J.R., 2008. *The Chemistry of Fungi*. Royal Society of Chemistry, United Kingdom.
- Hawksworth D.L., 2001. *The magnitude of fungal diversity: the 1,5 million species estimate revised*. Mycological Research, 105, 1422 – 1432.
- Helena 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.
- Helena C., Helena 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 Res. Int., 44, 1029-1035.
- Hoseney R., 1991. *Principios de ciencia y tecnologia de los cereales*. Zaragoza: Acribia, 320 p.
- James T.Y., Kauff F., Schoch C., *et al.*, 2006(a). *Reconstructing the early evolution of los cereales*. Zaragoza: Acribia, 320 p.
- James, T.Y., Letcher, P.M., Longcore, J.E., Mozley-Standridge, S.E., Porter, D., Powell, M.J., Griffith, G.W., & Vilgalys, R., 2006(b). *A molecular phylogeny of the flagellated Fungi (Chytridiomycota) and a proposal for a new phylum (Blastocladiomycota)*. Mycologia, 98, 860-871.
- Kalač P., 2009. *Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review*. Food Chem., 113, 9-16.
- Keizer G. J., 2000. *La enciclopédia de las setas*. Editorial Libsa. Madrid.
- Kirk P.M., Cannon P.F., David J.C., Stalpers J.A., 2008. *Dictionary of Fungi*, 10th Edition. CABI Publishing, United Kingdom.
- Lindequist U., Niedermeyer T.H.J., Jülich W-D., 2005. *The pharmacological potential of mushrooms*. eCAM, 2, 285-299.

- Liu R.H., 2003. *Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals*. American Journal of Clinical Nutrition, 78, 517S – 520S.
- Marriott P.J., Shellie R., Cornwell C., 2001. *Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils*. J. Chromatog. A, 936, 1-22.
- Martins X.F., 2004. *Cogumelos – Património Natural Transmontano*. João Azevedo Editor, Portugal, Vol 1, 19-101.
- Marx D.H., 1969. *The influence of ectotrophic fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria*. Phytopathology, 59, 153-163.
- Matkowski A., 2008. *Plant in vitro culture, for the production of antioxidants- A review*. Biotechnology Advances. 26, 584-560.
- Miller D.M., Buettner G.R., Aust S.D., 1990. *Transition metals as catalysts of antioxidation reactions*. Free Radical Biology & Medicine, 8, 95 – 108.
- Molyneux P., 2004. *The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity*. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 26, 211 – 219.
- Montini R.M.C., 2001. *Efeito de linhagens e substrato no crescimento miceliano e produtividade em cultivo axênico do cogumelo Shiitake (Lentinula edodes (Berk.) Pegler)*. Tese de Doutor em Agronomia – Área de Concentração em Energia na Agricultura. Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP - Câmpus de Botucatu, Brasil.
- Moser M., 1983. *Keys to Agarics and Boleti*. Cd Roger Phillips, London.
- Moore D., 1994. *Tissue formation*. In: Gow, N.A.R., Gadd, G.M. (Ed.), *The Growing Fungus*. Chapman & Hall, London.
- Nikkarinen M., Mertanen E., 2004. *Impact of geological origin on trace element composition of edible mushrooms*. J. Food Compos. Anal. 17, 301-310.
- Noel-Suberville C., Cruz C., Guinberteau J., Montury M., 1996. *Correlation between fatty acid content and aromatic compound release in fresh blewit (Lepista nuda)*. J. Agric. Food Chem. 44, 1180-1183.
- Noel-Suberville, Pachlewski R., 1967. *Mikotrofizm systemu korzeniowego: Zarys Fizjologii Sosny Zwyczajnej*. Red. S Bialobok and Zelawski. PWN Warszawa, Poznan.

- 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.
- Pachlewski R., 1967. *Mikotrofizm systemu korzeniowego: Zarys Fizjologii Sosny Zwyczajnej*. Red. S Bialobok and Zelawski. PWN Warszawa, Poznan,
- 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 Chem. 130, 394-403.
- Pinto J.F., 2010. *Nutraceuticos e alimentos funcionais*. Lidel – edicoes tecnicas, lda. Lisboa – Porto.
- Quadrante Natural, 2010. *Espécies Cultiváveis, Curso prático: cultivo de cogumelos*. 26 e 27 de novembro. Instituto Politécnico de Bragança.
- Reis F.S., Ferreira I.C.F.R., Barros L., Martins A., 2011. *A comparative study of tocopherols composition and antioxidant properties of in vivo and in vitro ectomycorrhizal fungi*. LWT, 44, 820-824
- Rueda J. A. O., 2007. *Hongo y Setas- Tesoro de neutros montes*, 2º Edición. Ediciones Cálamo, Palencia.
- Seif E., Leigh J., Liu Y., Roewer I., Forget L., Lang B.F., 2005. *Comparative mitochondrial genomics in zygomycetes: bacteria-like RNase P RNAs, mobile elements and a close source of the group I intron invasion in angiosperms*. Nucleic Acids Research, 33, 734-744.
- Stojković D., Soković M., Glamočlija J., Džamić A., Ćirić A., Ristić M., Grubišić D., 2011. *Chemical composition and antimicrobial activity of Vitex agnus-castus L. fruits and leaves essential oils*. Food Chemistry 128, 1017–1022.
- Stott K., Broderick A., Nair T., 1996. *Investigation into cultivation parameters for Australian species of Lepista*. In: Royse, D.J. (ed.), Mushroom Biology and Mushroom Products. Penn State University. pp. 285-291.
- Stott K., Desmerger C., Holford P., 2005. *Relationship among Lepista species determined by CAPS and RAPD*. Mycological Research, 109 (2): 205–21. The British Mycological Society. United Kingdom.
- Tapiero H., Townsend D.M., Tew K.D, 2004. *Organosulfur compounds from alliaceae in the prevention of human pathologies*. Biomed Pharmacother. 58, 183-193.
- Temple N. J., 2000. *Antioxidants and disease: More questions than answers*. Nutrition Research, 20, 449 – 459.

- Valko M., Liebfriz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., *et al.*, 2007. *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 39, 44 – 84.
- Vaz J.A., Barros L., Martins A., Morais J.S., Vasconcelos M.H., Ferreira I.C.F.R., 2011. *Phenolic profile of seventeen Portuguese wild mushrooms*. LWT- Food Science and Technology, 44, 343-346.
- Voet D., Voet J., Pratt C., 2008. *Fundamentals of Biochemistry*. 3rd edition, John Wiley
- Webster J., Weber R.W.S., 2007. *Introduction to Fungi*. 3rd Edition. Cambridge University Press, United Kingdom.
- Wojtasiak R-Z., 2004. *Optical purity of (R)-(-)-1-octen-3-ol in the aroma of various species of edible mushrooms*. Food Chemistry 86 113–118
- Worrall J.J., 1999. *Structure and Dynamics of Fungal Populations*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Wright S., Hayes W., 1978. *Nutrition and fruitbody formation of Lepista nuda (Bull. Ex. Fr.) Cook*. In: Delmas, J. (ed.), *Mushroom Science X (part 1)*. Burdeos. pp. 873-884.
- Wright J.S., Johnson E.R., DiLabio G.A., 2001. *Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants*. Journal of the American Chemical Society, 123, 1173 – 1183.
- Young A.J., Lowe G.M., 2001. *Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids*. Arch. Biochem. Biophys., 385, 20-27.

5.2. Internet

Web 1- Mundo educação (2012), última consulta a 10/2012, disponível em:

<http://www.mundoeducacao.com.br/biologia/os-fungos.htm>.

Web 2- Zoologia (2006), última consulta a 10/2012, disponível em:

<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAfKHAAD/zoologia>.

Web 3- Simbiotica.org, última consulta a 10/2012, disponível em:

<http://www.simbiotica.org/tiposfungos.htm>

Web 4- <http://www.eolss.net/Sample-Chapters/C17/E6-58-06-03.pdf>; Última consulta a 10/2012

Web 5- Faculty Centre of Biodiversity (2012), última consulta a 10/2012, disponível em:

<http://www.botanik.univie.ac.at/mycology/research.htm>

e Flickr (2012) disponível em:

<http://www.flickr.com/photos/fl12345/galleries/72157622719293039>

Web 6 – Wikipedia- the free encyclopedia (2012), última consulta a 10/2012, disponível em:

<http://en.wikipedia.org/wiki/1-Octen-3-ol>

Web 7- Gruppo Micologico (2005), última consulta a 10/2012, disponível em:

<http://www.mtsn.tn.it/bresadola/gallery.asp?code=11&lang=eng>

Web 9- Copyright© (2012) Scribd Inc., última consulta a 10/2012, disponível em:

<http://pt.scribd.com/doc/51759264/Fisiologia-de-fungos-GRD-1>

Web 8- Copyright© (2012) Scribd Inc., última consulta a 10/2012, disponível em:

<http://pt.scribd.com/doc/90561179/CD-1>

Web 10- Wikipedia- the free encyclopedia (2012), última consulta a 10/2012, disponível em:

<http://fr.wikipedia.org/wiki/Linalol>

Web 11- Wikipedia- the free encyclopedia (2012), última consulta a 10/2012, disponível em:

<http://pt.wikipedia.org/wiki/Pulegona>

Web 12- Wikipedia- the free encyclopedia (2012), última consulta a 10/2012, disponível em:

<http://pt.wikipedia.org/wiki/Limoneno>



Capítulo VI

VI. ANEXOS

6.1. Composição do meio de cultura Melin-Norkans Modificado (MMN completo); pH 6,

Composto	Concentração (g/L)
NaCl	0,025
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,250
KH ₂ PO ₂	0,500
FeCl ₃	0,005
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,150
Tiamina	1,00 × 10 ⁻⁴
CaCl ₂	0,050
Casamino ácidos	1,00
Extrato de malte	5,00
Glucose	10,0
Agar	20,0

6.2. Composição do meio de cultura sólido Incompleto (MMN incompleto); pH 6,6.

Composto	Concentração (g/L)
NaCl	0,025
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,250
KH ₂ PO ₄	0,500
FeCl ₃	0,005
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,150
Tiamina	1,00 × 10 ⁻⁴
CaCl ₂	0,050
Glucose	10,00
Agar	20,00

6.3. Composição do meio de cultura Agar Batata Dextrose (PDA), pH 5,6±0.2.

Composto	Concentração (g/L)
Infusão de Batata	200,00
Dextrose	20,00
Agar	15,00

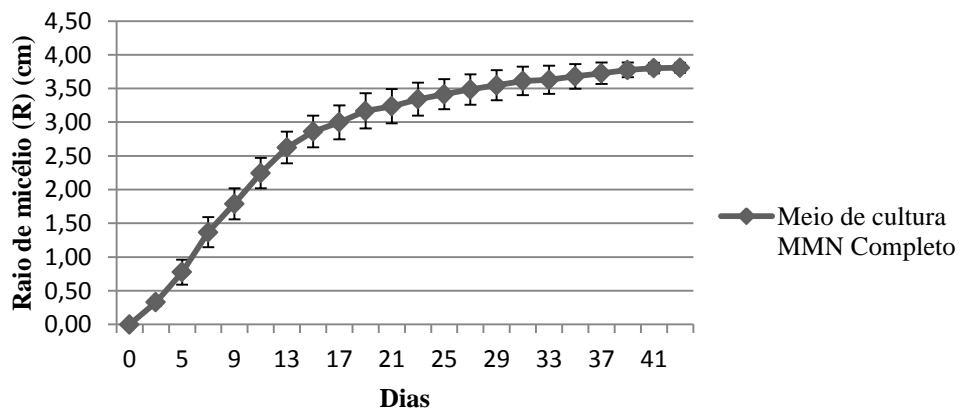
6.4. Composição do meio de cultura Pachlewski (PACH); pH 5,4.

Composto	Concentração (g/L)
C ₄ H ₁₂ N ₂ O ₆	0,500
Fe EDTA	0,200
KH ₂ PO ₄	1,000
H ₃ BO ₃	0,003
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,001
MnCl ₂ .2H ₂ O	0,0030
NaMO ₄ .2H ₂ O	0,00027
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	5,00
Tiamina	1,00 × 10 ⁻⁴
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,500
Maltose	5,00
Glucose	20,00
Agar	14,00

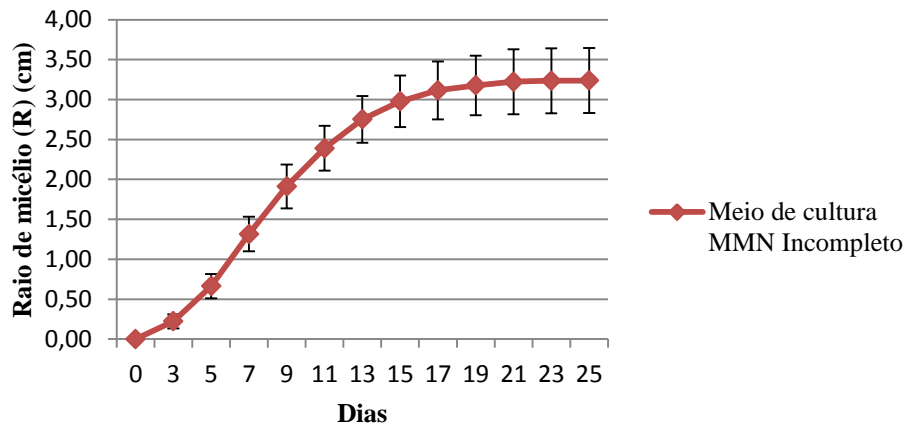
6.5. Composição do meio de cultura Ferry & Das. (FAD), pH 5,0.

Composto	Concentração (g/L)
KH_2PO_4	0,50
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,50
NH_4Cl	0,50
Extrato de Malte	5,00
Glucose	20,0
Agar	14,0

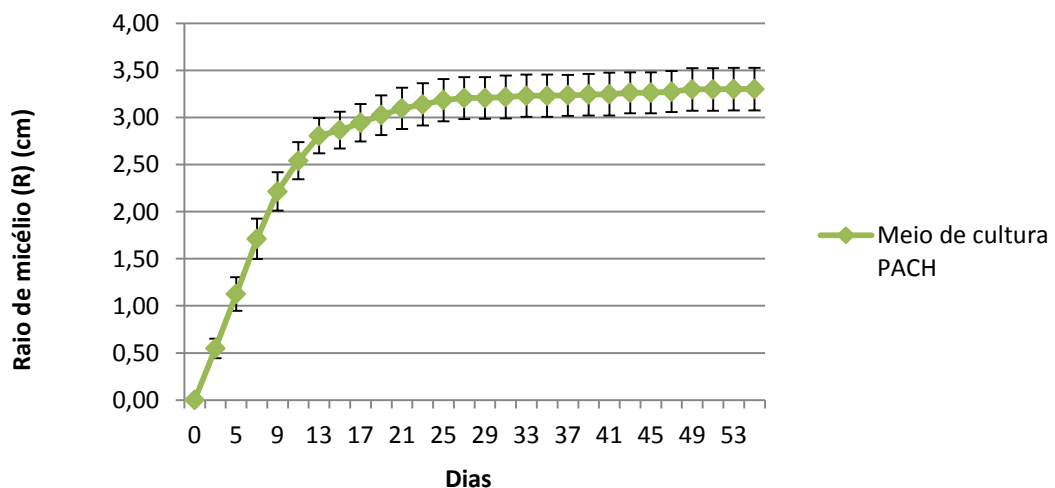
6.6. Curva de crescimento do micélio obtido a partir da amostra de prado, em meio de cultura MMN completo



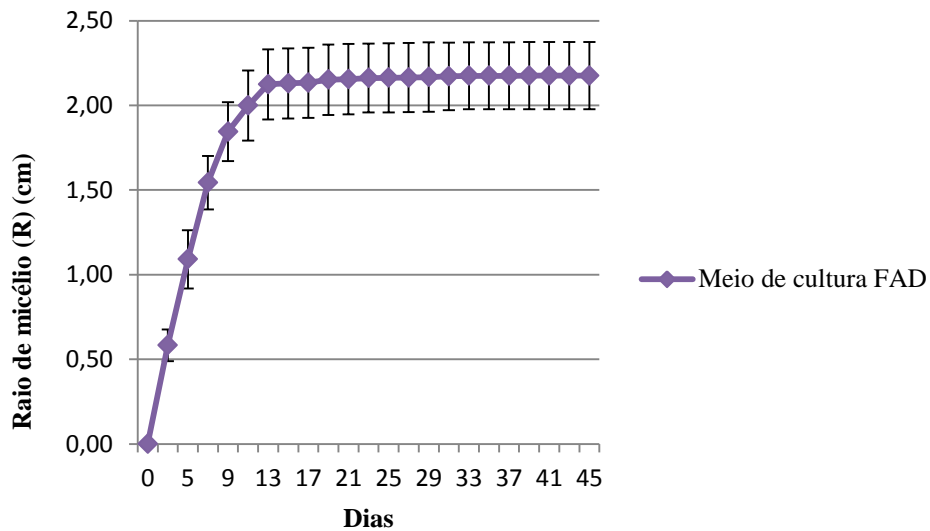
6.7. Curva de crescimento em meio de cultura MMN incompleto da amostra do prado



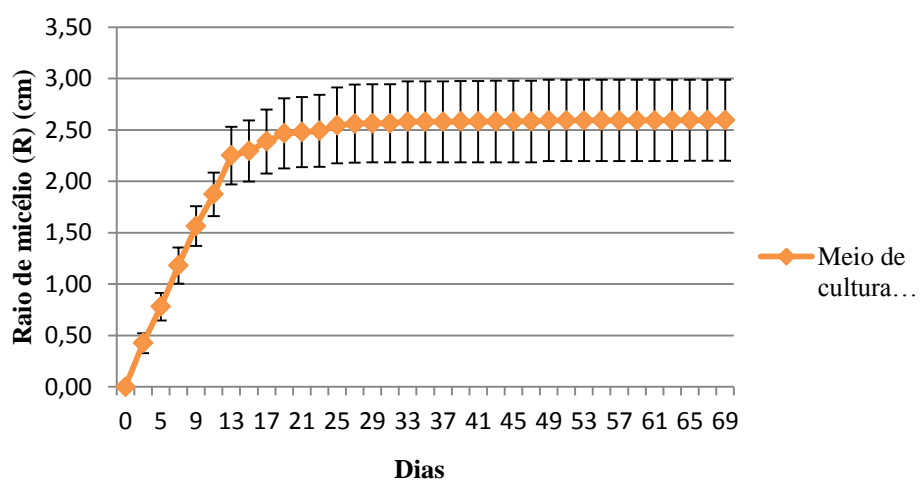
6.8. Curva de crescimento em meio de cultura PACH da amostra do prado



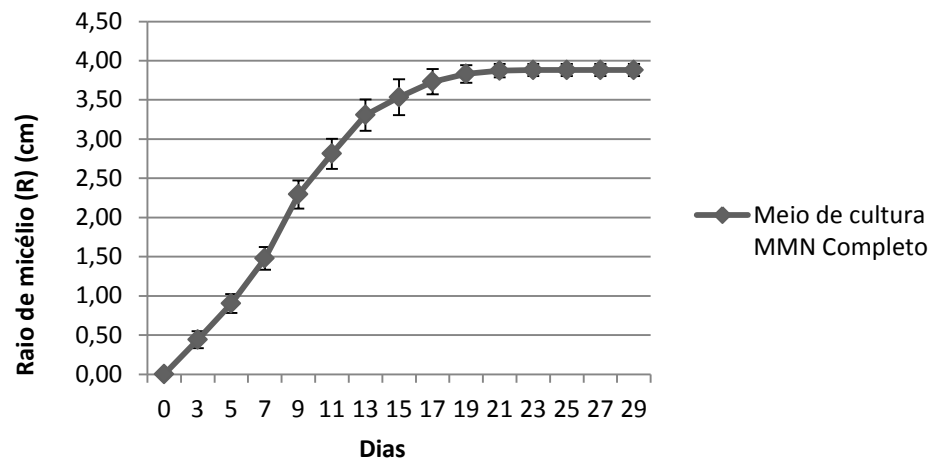
6.9. Curva de crescimento em meio de cultura FAD da amostra do prado



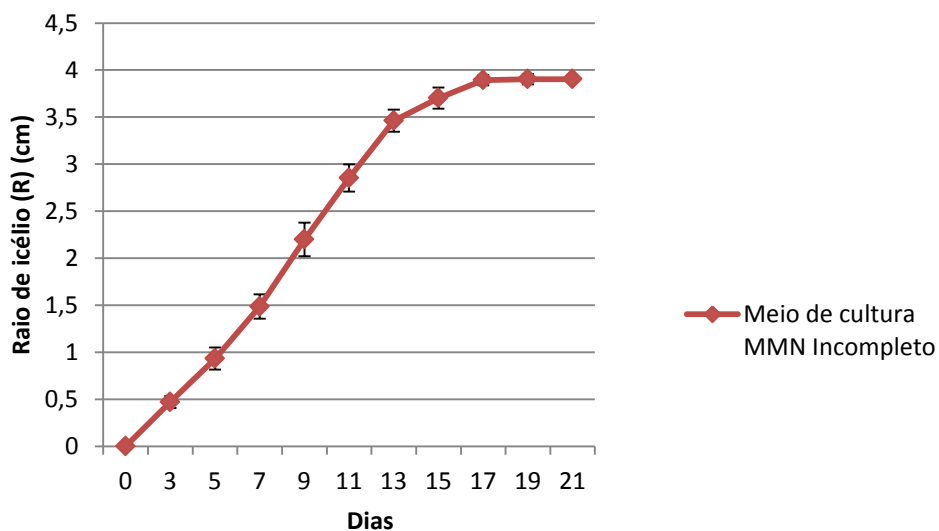
6.10. Curva de crescimento em meio de cultura PDA da amostra do prado



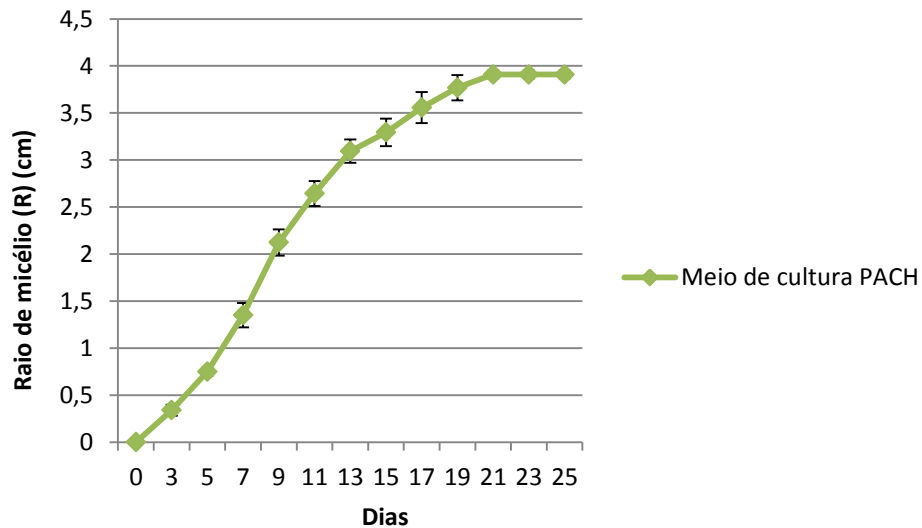
6.11. Curva de crescimento em meio de cultura MMN Completo da amostra comercial



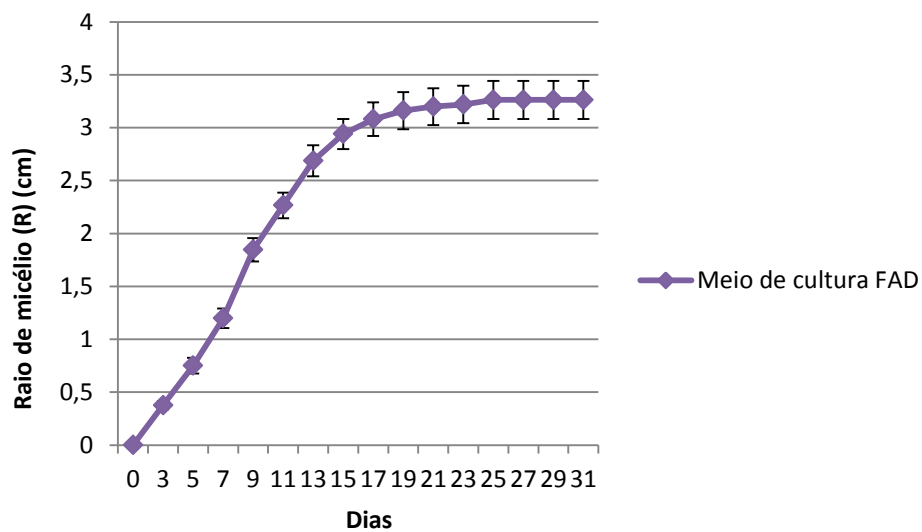
6.12. Curva de crescimento em meio de cultura MMN Incompleta da amostra comercial



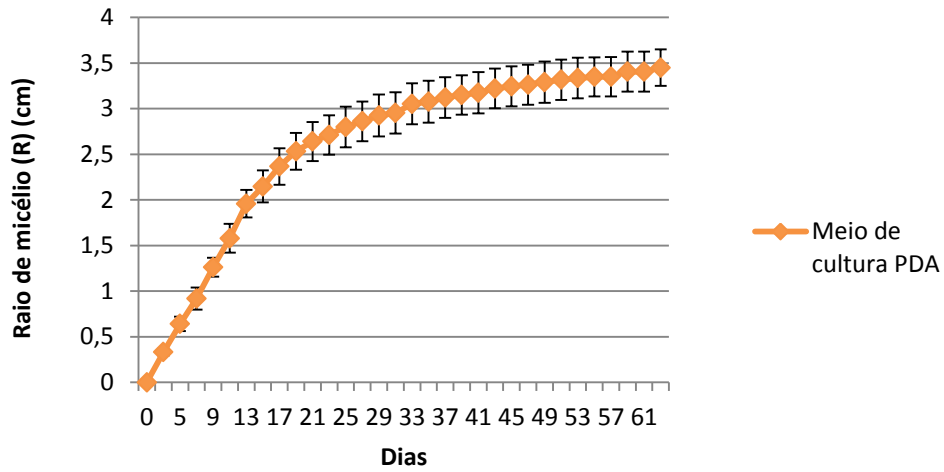
6.13. Curva de crescimento em meio de cultura PACH da amostra comercial



6.14. Curva de crescimento em meio de cultura FAD da amostra comercial



6.15. Curva de crescimento em meio de cultura PDA da amostra comercial



Alguns dos resultados descritos nesta dissertação deram uma comunicação internacional e uma nacional e a um artigo já submetido:

6.1. Comunicação internacional

Sara Pinto, Sousa MJ, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, 2012 Volatiles from the edible mushroom *Lepista nuda*: comparison between wild and commercial samples. 43rd International Symposium on Essential Oils. 5 to 8 Setembro, Lisboa Portugal.

Volatiles from the edible mushroom *Lepista nuda*: comparison between wild and commercial samples

Sara Pinto^{1,2}, Sousa MJ^{1,2}, Figueiredo AC³, Barroso JG³, Pedro LG³




¹Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária, Departamento de Biologia e Biotecnologia, Campus de Sta Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal

²Centro IPB - Escola Superior Agrária, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal

³Universidade de Laxos, Faculdade de Ciências de Laxos, Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biotecnologia e Bioinformática, Centro de Biotecnologia Vegetal, C.R. Rio 1, Campo Grande, 1760-018 Laxos, Portugal

*Joaquim@ipb.pt




Introduction

Lepista nuda (Bull. ex Fr.) Cooke, sometimes given the common name "blewit" (Fig. 1), is a Basidiomycete, from the Tricholomataceae, Agaricales. It is a saprotrophic species; growing alone, gregariously or in clusters in organic debris, in woods or in urban settings. The fruity flavour makes it an excellent edible mushroom and it is commercially grown in Britain, France and the Netherlands [1].

The aim of this work is the isolation of volatile compounds in different habitats on the Northeast Portugal.



Fig. 1 - *Lepista nuda* mushroom: a) wild growing and b) from a commercial source.

Results

Table 1 - Composition of the volatile fraction, isolated by distillation-extraction, of *Lepista nuda* samples, collected on an oak forest (OF) and on a pine forest (PF), and obtained from a commercial source (CS).

Componente	OF	PF	CS
o-Terpena	920	1.3	1.1
Sabinena	958	2.2	2.1
1-Octen-3-ol	961	1.7	0.5
p-Pinena	963	2.0	1.0
2-Pentyl furan	973	2.3	5.3
p-Cimena	1003	1.7	2.4
1,8-Guiole	1005	5.6	3.0
Limonene	1009	9.5	9.9
γ-Terpinena	1025	0.6	0.3
n-Octanol	1045	t	2.3
Pinofina	1057	2.5	4.7
trans-Undecil alde	1059	1.3	1.8
Linalol	1074	26.4	25.3
o-Tujona	1074	t	0.4
Camphor	1085	5.1	5.6
Hexanona	1130	t	0.3
Decoralol	1132	1.6	1.1
Terpinen-4-ol	1146	2.6	2.6
o-Terpinol	1159	t	0.9
Methyl chalcid (Sesquiterp)	1163	t	0.5
Pulegone	1210	13.7	14.3
α-Anetol	1220	t	1.0
% Identification	64.1	51.3	54.1
Grouped Componente			
Monoterpena hidrocarbono	24.6	16.6	16.6
Oxigen-containing monoterpenas	35.4	60.4	60.7
Others	2.9	8.0	14.6

R = Relative Index relative to 2-DECALOL molecules on the OFB (arbitrary), t = trace (<0.05%)

Twenty two components were identified in each of the three samples, attaining 84-94% of the volatile fraction (Table 1). Differences between volatiles from wild growing and commercial samples were mainly quantitative. The main difference was observed in the relative amount of 2-pentyl furan, present in small amount in the wild growing mushrooms (2-5%) and in considerable amount in the commercial sample (15%).

Material and Methods

Wild *L. nuda* (Blewit) fruit bodies were collected from populations at two different habitats in Northeast Portugal: oak forest (OF) and pine forest (PF), and were also obtained from a commercial source (CS).

Volatiles were isolated by distillation-extraction and analysed by Gas Chromatography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry as in [2].

Conclusion

Eight-carbon (C8) volatiles are ubiquitous among fungi and characteristic of the fungal aroma, 1-octen-3-ol being the most abundant [3]. In the present study, 1-octen-3-ol was detected in small amounts in all samples (traces-2%) and the major components, linalol, limonene and pulegone, are not common in other mushroom volatiles.

References

1. R. Hall et al (2002) Edible and Poisonous Mushrooms of the World. Timber Press Inc., pp. 160-161.
2. M. Mendes et al. (2011) *J. Agr. Food Res.* 32, 710-719.
3. G. Comast et al. (2006) *Mycolohor.* 49, 217-225.

Acknowledgements: This study was partially funded by FCT





43rd International Symposium on Essential Oils, Lisbon, 04-08 Sept 2012

6.2. Comunicação nacional

In I Jornadas de Jovens Investigadores da Escola Superior Agrária de Bragança

Caracterização da fracção volátil e fenólica do macrofungo *Lepista nuda* de diferentes *habitats* e do micélio em cultura *in vitro*

Sara Pinto, Isabel C.F.R. Ferreira, Maria João Sousa

CIMO-Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal.

O macrofungo *Lepista nuda*, também conhecido como *Clitocybe nuda*, pertencente ao filo *Basidiomycota*, à classe *Basidiomycetes*, à ordem *Agaricales*, à família *Tricholomataceae* e ao género *Lepista*, e tem como nome comum “Pé-azul”, encontra-se habitualmente em montados, prados e florestas naturais de azinheiras e sobreiros. O seu período de frutificação é o Outono, Inverno e Primavera; e é um saprófita/decompositor. É um fungo comestível, o que lhe confere um interesse comercial devido não só, ao seu valor nutricional, mas também ao seu intenso e característico aroma.

No presente trabalho, estudam-se exemplares comerciais e silvestres provenientes de diferentes *habitats* – carvalhal, pinhal e prado (amostras *in vivo*), bem como o micélio produzido *in vitro* a partir desses exemplares. Os principais objectivos são:

i) Estabelecer as condições óptimas para a cultura *in vitro* de *Lepista nuda*, com base nas curvas de crescimento do micélio, obtidas a partir do crescimento radial e da massa fresca e seca obtidas;

ii) Caracterizar a fracção volátil das amostras obtidas *in vivo* e *in vitro* após extracção com diferentes técnicas, entre elas a extracção por *Likens-Nickerson* (LN), extracção simultânea de vapor e por hidrodestilação, arrastamento de vapor (*Clevenger*). A análise dos voláteis é feita por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GS-MS).

iii) Caracterizar a fracção fenólica das mesmas amostras após extracção sólido-líquido e análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detecção por diodos (HPLC-DAD).

iv) Avaliar as propriedades antioxidantes das diferentes fracções (volátil e fenólica), utilizando técnicas químicas e bioquímicas: poder redutor, efeito captador de radicais livres e inibição da peroxidação lipídica em homogeneizados cerebrais.

Agradecimentos: À Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) e ao COMPETE/QREN/UE pelo projecto de investigação PTDC/AGR-ALI/110062/2009.

6.3. Artigo submetido

Chemical characterization and antioxidant properties of *Lepista nuda* fruiting bodies and mycelia obtained by *in vitro* culture: effects of collection habitat and culture media

SARA PINTO, LILLIAN BARROS, MARIA JOÃO SOUSA, ISABEL C.F.R. FERREIRA *

^a*CIMO-Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal.*

* Author to whom correspondence should be addressed (e-mail: iferreira@ipb.pt telephone +351-273-303219; fax +351-273-325405).

Running title: Chemical characterization and antioxidant properties of *Lepista nuda*

ABSTRACT

Lepista nuda is an edible mushroom which presents important organoleptic qualities including a delicate flavor and good postharvest conservation. Its chemical and bioactive properties can be affected by habitat collection. Therefore, the main goal of the present work was to compare chemical composition and antioxidant potential of *Lepista nuda* samples from different habitats, and mycelia produced by *in vitro* culture, using different culture media. The commercial sample (cultivated) gave the highest energetic contribution and PUFA contents due to the contribution of linoleic acid, as also of phenolic compounds; the wild sample from oak forest gave the highest levels of

organic acids. Mycelia samples showed to have higher levels of glucose, tocopherols and antioxidant activity. Particularly, PACH medium proved to be better for glucose production, PDA, PACH and FAD for β - and γ -tocopherols, complete MMN for phenolic compounds and incomplete MMN for antioxidant properties. Overall, *in vitro* culture could be explored to obtain bioactive compounds from macrofungi for industrial applications, controlling environmental conditions to produce higher amounts of these compounds and to overcome the diversity in chemical composition observed in samples collected in different habitat.

KEYWORDS: *Lepista nuda*; Mushroom; Mycelium; Chemical compounds; Antioxidant properties