



**Caracterização nutricional e bioatividade de cogumelos silvestres: *Lactarius citriolens*, *Lactarius turpis*, *Leucopaxillus candidus* e *Morchella conica*.**

**Vanessa Ariana Azevedo Vieira**

*Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança e à Universidade de Salamanca para obtenção do Grau de Mestre em Farmácia e Química de Produtos Naturais*

Orientado por

**Isabel Cristina Fernandes Rodrigues Ferreira**

**Anabela Lourenço Rodrigues Martins**

**Bragança**

**2014**

*Lactarius citriolens, Lactarius turpis, Leucopaxillus candidus e Morchella conica*

# Índice

Índice de Figuras .....	5
Índice de Tabelas .....	5
Agradecimentos .....	7
Abreviaturas.....	9
Resumo .....	13
Abstract.....	14
Enquadramento do estudo .....	15
1. Introdução.....	19
1.1. Caracterização das amostras .....	19
1.2. Valor nutricional de cogumelos silvestres .....	24
1.3. Moléculas bioativas em cogumelos silvestres .....	31
1.4. Bioatividade de cogumelos silvestres .....	35
1.5. Objetivos.....	40
2. Material e Métodos.....	43
2.1. Amostragem das espécies de cogumelos .....	43
2.2. Padrões e Reagentes.....	43
2.3. Composição química e nutricional .....	44
2.3.1. Determinação de macronutrientes .....	44
2.3.2. Determinação de açúcares livres .....	44
2.3.3. Determinação de ácidos gordos.....	45
2.3.4. Determinação de tocoferóis .....	46
2.3.5. Determinação de ácidos orgânicos .....	46
2.3.6. Determinação de ácidos fenólicos e compostos relacionados .....	47
2.4. Bioatividade dos extratos metanólicos das amostras .....	48

2.4.1.	Preparação dos extratos .....	48
2.4.2.	Ensaio de atividade antioxidante.....	48
2.4.3.	Ensaio de Folin-Ciocalteu .....	48
2.4.4.	Ensaio de Ferricianeto/Azul da Prússia .....	49
2.4.5.	Ensaio da atividade captadora de radicais DPPH.....	49
2.4.6.	Ensaio de inibição de descoloração de $\beta$ -caroteno/linoleato.....	49
2.4.7.	Ensaio de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	50
2.4.8.	Ensaio de atividade antibacteriana.....	50
2.4.9.	Ensaio de atividade antifúngica .....	51
2.4.10.	Ensaio de citotoxicidade em células de fígado.....	52
2.5.	Análises estatísticas .....	53
3.	Resultados e Discussão.....	55
3.1.	Nutrientes, não nutrientes e bioatividade de <i>Morchella conica</i> silvestre de diferentes origens.....	55
3.2.	Expansão do conhecimento do género <i>Lactarius</i> relativamente à composição química e atividade antioxidante .....	64
3.3.	O que ainda não foi descrito sobre o cogumelo silvestre <i>Leucopaxillus candidus</i> (Bres.) Singer .....	73
4.	Considerações Finais .....	79
5.	Bibliografia.....	81

## Índice de Figuras

Figura 1. Estrutura mais comum de um corpo de frutificação .....	21
Figura 2. <i>Lactarius turpis</i> Fr., <i>Lactarius citriolens</i> Pouzar, <i>Leucopaxillus candidus</i> (Bres.) Singer e <i>Morchella conica</i> Pers.....	21
Figura 3. Estrutura química dos aminoácidos mais abundantes em cogumelos silvestres .....	26
Figura 4. Estrutura química do ácido palmítico, ácido oleico e ácido linoleico.....	28
Figura 5. Estrutura química da glucose, manitol e trealose.....	30
Figura 6. Estrutura química dos tocoferóis e tocotrienóis .....	32
Figura 7. Estrutura química do ácido hidroxibenzóico e hidroxicinâmico.....	33
Figura 8. Estrutura química do ácido cítrico os ácidos oxálico, quínico, málico, cítrico e fumárico.....	35
Figura 9. Perfil individual de açúcares de <i>M. conica</i> de Portugal e da Sérvia. ....	58
Figura 10. Perfil individual de açúcares de <i>L. turpis</i> e <i>L. citriolens</i> .....	71
Figura 11. Perfil individual de ácidos orgânicos de <i>L. citriolens</i> e <i>L. turpis</i> .....	72

## Índice de Tabelas

Tabela 1. Macronutrientes, açúcares livres, ácidos gordos e tocoferóis dos corpos de frutificação de <i>M. conica</i> expressos em massa seca (média $\pm$ DP)..	56
Tabela 2. Ácidos orgânicos e compostos fenólicos dos corpos de frutificação de <i>M. conica</i> expressos em massa seca (média $\pm$ DP).....	59
Tabela 3. Atividade antioxidante dos extratos metanólicos de <i>M. conica</i> (média $\pm$ DP)... ..	61

Tabela 4. Atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos metanólicos de <i>M. conica</i> e drogas de referência (mg/mL) (média ± DP).....	63
Tabela 5. Macronutrientes, açúcares livres, ácidos gordos e tocoferóis dos corpos de frutificação de <i>L. citriolens</i> e <i>L. turpis</i> expressos em massa seca (média ± DP). ....	65
Tabela 6. Ácidos orgânicos e compostos fenólicos dos corpos de frutificação de <i>L. citriolens</i> e <i>L. turpis</i> expressos em massa seca (média ± DP).....	69
Tabela 7. Atividade antioxidante dos extratos metanólicos de <i>L. citriolens</i> e <i>L. turpis</i> (média ± DP). ....	70
Tabela 8. Macronutrientes, açúcares livres, ácidos gordos e tocoferóis dos corpos de frutificação de <i>Leucopaxillus candidus</i> expressos em massa seca (média ± DP).....	74
Tabela 9. Ácidos orgânicos e compostos fenólicos dos corpos de frutificação de <i>Leucopaxillus candidus</i> expressos em massa seca (média ± DP). ....	76
Tabela 10. Atividade antioxidante dos extratos metanólicos de <i>Leucopaxillus candidus</i> (média ± DP). ....	77

## Agradecimentos

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

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

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

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

Às colegas de investigação Filipa Reis e Ângela Fernandes por toda ajuda, apoio e integração no Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada.

Aos meus amigos de sempre, Diogo Basto, Cristina Queirós e Joana Costa, por todo apoio e palavras de conforto.

Também não quero deixar de agradecer à amiga, colega e “chefe” Alexandra de Sousa pela compreensão e companheirismo.

Aos meus pais, pelo apoio, amor, e valores que assim me tornaram pessoa.

Ao João, por tudo o que representa para mim e por me incentivar a iniciar o meu percurso académico e ter feito parte dele.

Por fim, ao menino dos meus olhos: Huguinho consegui!!!

A todos o meu muitíssimo Obrigada!

*Lactarius citriolens, Lactarius turpis, Leucopaxillus candidus e Morchella conica*

## Abreviaturas

**A** – Absorvância

**ACR** – Atividade captadora de radicais

**ADN** – Ácido desoxirribonucleico

**ANOVA** – Análise de variância

**AOAC** – *Association of Official Analytical Chemist*

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

**DMEM** – *Dulbecco's Modified Eagle's medium*

**DMSO** – Dimetilsulfoxido

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**DP** – Desvio padrão

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

**dw** – Massa seca

**EAG** – Equivalentes de ácido gálico

**EC<sub>50</sub>** – Concentração de extrato correspondente a 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no ensaio do poder redutor

**EUA** – Estados Unidos da América

**FAME** – Ésteres metílicos de ácidos gordos

**FBS** – Soro fetal bovino

**FID** – Detetor de ionização de chama

**GC** – Cromatografia gasosa

**GI<sub>50</sub>** – Concentração de extrato correspondente a 50% de inibição de crescimento celular

**HPLC** – Cromatografia líquida de alta eficiência

**m/v** – Relação massa/volume

**MA** – Agar malte

**MBC** – Concentração mínima bactericida

**MFC** – Concentração mínima fungicida

**MIC** – Concentração mínima inibitória do crescimento

**MUFA** – Ácidos gordos monoinsaturados

**nd** – Não detetado

**n°** – Número

**PDA** – Fotodíodos

**PI** – Padrão interno

**PUFA** – Ácidos gordos polinsaturados

**RI** – Índice de refração

**rpm** – Rotações por minuto

**SFA** – Ácidos gordos saturados

**SRB** – Sulforodamina B

**TBARS** – Espécies reativas do ácido tiobarbitúrico

**TCA** – Ácido tricloroacético

**UFC** – Unidades formadoras de colónias

**UFLC** – Cromatografia líquida ultra rápida

**UV** – Ultravioleta

**v/v** – Relação volume/volume

**Vis** – Visível

**w/v** – Relação massa/volume

*Lactarius citriolens, Lactarius turpis, Leucopaxillus candidus e Morchella conica*

## Resumo

*Morchella conica*, *Lactarius citriolens*, *L. turpis* e *Leucopaxillus candidus* foram estudados com o intuito de fazer a sua caracterização em relação à composição química, valor nutricional e bioatividade. Amostras provenientes do Nordeste Transmontano e da Sérvia (apenas *M. conica*) foram submetidas a análise por técnicas cromatográficas adequadas identificação e quantificação de açúcares livres, ácidos gordos, ácidos orgânicos e compostos fenólicos. Os extratos metanólicos destas amostras foram estudados sob o ponto de vista bioativo, nomeadamente atividade antioxidante (poder redutor, atividade captadora de radicais livres e inibição da peroxidação lipídica) e, no caso de *M. conica* proveniente de Portugal e da Sérvia, atividade antimicrobiana (contra bactérias Gram positivo e Gram negativo, e microfungos). O valor nutricional de *M. conica* variou entre as duas amostras, sendo que a da Sérvia revelou a maior contribuição energética e teor em açúcares livres, ácidos gordos polinsaturados e compostos fenólicos, enquanto a amostra portuguesa foi mais rica em ácidos gordos saturados e monoinsaturados, tocoferóis e ácidos orgânicos. Em geral, a amostra de Portugal revelou o maior potencial antioxidante (com exceção da inibição da peroxidação lipídica), enquanto a da Sérvia exibiu uma maior atividade antimicrobiana. Já nas amostras do género *Lactarius*, a composição em macronutrientes variou entre as duas espécies, mas os perfis foram similares entre elas e relativamente a outras espécies de *Lactarius*; *L. citriolens* forneceu a maior contribuição energética, ácidos gordos saturados e ácidos orgânicos, enquanto a amostra de *L. turpis* foi mais rica em açúcares livres, ácidos gordos mono e polinsaturados, tocoferóis e compostos fenólicos. O extrato metanólico de *L. turpis* apresentou a maior atividade antioxidante. Por fim, *L. candidus* mostrou ser uma espécie interessante quanto ao valor nutricional, com alto teor de proteínas e hidratos de carbono, mas baixos níveis de lípidos, com a prevalência de ácidos gordos polinsaturados. O manitol foi o principal açúcar presente e o  $\beta$ -tocoferol a principal isoforma de tocoferóis. Outros compostos detetados foram os ácidos oxálico, fumárico, *p*-hidroxibenzóico e cinâmico. A ausência de citotoxicidade dos extratos foi confirmada numa cultura primária de células de fígado porco através do ensaio de sulforrodamina B. O presente trabalho fornece novas informações sobre as espécies em estudo, nomeadamente em relação às suas propriedades químicas, nutricionais e bioativas.

## Abstract

*Morchella conica, Lactarius citriolens, Lactarius turpis* and *Leucopaxillus candidus* were studied to obtain their characterization in terms of chemical composition, nutritional value and bioactivity. The samples from Northeastern Portugal and from Serbia (only *M. conica*) were submitted to adequate chromatographic analyses to identify and quantify free sugars, fatty acids, organic acids and phenolic compounds. The methanolic extracts of the samples were studied for their bioactivity, namely antioxidant activity (reducing power, free radicals scavenging activity and lipid peroxidation inhibition) and antimicrobial activity (against Gram positive and negative bacteria, and microfungi), only for Portuguese and Serbian *M. conica*. The nutritional value of the mentioned species varied between the two samples, the Serbian revealing the major energetic contribution, and the highest content in free sugars, polyunsaturated fatty acids and phenolic compounds, meanwhile the Portuguese one was richer in saturated and monounsaturated fatty acids, tocopherols and organic acids. In general, the Portuguese sample presented higher antioxidant potential (with the exception of lipid peroxidation inhibition), while the Serbian sample exhibit higher antimicrobial activity. Among the studied samples from *Lactarius* genus, the macronutrients composition varied between the two species, but the profiles were similar within the studied and other *Lactarius* species. *L. citriolens* provided the highest energetic contribution, saturated fatty acids and organic acids, while *L. turpis* sample was richer in free sugars, polyunsaturated and monounsaturated fatty acids, tocopherols and phenolic compounds. The *L. turpis* methanolic extract presented the highest antioxidant activity. Finally, *L. candidus* showed to be an interesting species regarding nutritional value, with high content in proteins and carbohydrates, but low levels of lipids, mainly polyunsaturated fatty acids. Mannitol was the main sugar present and  $\beta$ -tocopherol was also the main tocopherol isoforms. Other compounds detected were oxalic, fumaric, *p*-hydroxybenzoic and cinnamic acids. The absence of cytotoxicity in the extracts was confirmed against a primary culture of porcine liver cells through sulforhodamine B assay. The present work provides new information about the studied species, namely on their chemical, nutrition and bioactive properties.

## Enquadramento do estudo

Os cogumelos silvestres fazem parte da dieta humana desde há vários séculos devido às suas características organoléticas (ex. textura e sabor) e valor nutricional (Manzi et al., 2001; Kalac, 2009). Na verdade, os cogumelos têm excelente valor nutritivo, baixo teor de lípidos e grandes quantidades de hidratos de carbono e proteínas, apresentando ainda, muitos dos aminoácidos essenciais (Manzi et al., 1999; Furlani & Godoy, 2005). A avaliação de um número significativo de espécies revelou serem uma importante fonte de vitaminas lipossolúveis (vitaminas A, D, E e K) e ácidos gordos polinsaturados (PUFA) (Barros et al., 2007a).

A abundância de compostos bioativos despertou o interesse nesta matriz natural (Ferreira et al., 2009). Exemplos desses compostos presentes em cogumelos são os tocoferóis (Helena et al., 2010), os compostos fenólicos (Barros et al., 2009; Vaz et al., 2011) e os ácidos orgânicos (Barros et al., 2013), alguns deles também responsáveis pelo seu potencial nutracêutico (Barros et al., 2008a).

Várias espécies de cogumelos têm sido estudadas pela comunidade científica, com o intuito de desenvolver novas terapias, e os resultados comprovaram as suas propriedades bioativas (Lindequist et al., 2005). Os nutracêuticos presentes em cogumelos (Elmastas et al., 2007; Ribeiro et al., 2007) têm sido relacionados com a sua atividade antioxidante (Mau et al., 2002; Lo & Cheung, 2005; Barros et al., 2007c) e antimicrobiana (Smânia et al., 1995; Hirasawa et al., 1999; Hatvani, 2001; Barros et al., 2007c; Turkoglu et al., 2007).

A formação de radicais livres está associada ao metabolismo normal do organismo, havendo neste um conjunto de mecanismos de proteção contra os seus efeitos nocivos. No entanto, a proteção contra os radicais livres pode ser aumentada através da introdução de antioxidantes na dieta e subsequente papel na prevenção de várias doenças (Alam et al., 2013). Na verdade, os antioxidantes podem ajudar o sistema de defesa endógeno, possuindo um papel importante como potenciais agentes protetores, reduzindo o dano oxidativo. Neste contexto, a possibilidade de incluir cogumelos, que contêm quantidades significativas de fitoquímicos bioativos, na nossa dieta pode proporcionar benefícios desejáveis para a saúde, para além da nutrição básica (Ferreira et al., 2009). Além disso, apesar da ampla diversidade de compostos

antibacterianos, a resistência bacteriana ao antibiótico de primeira escolha tem vindo a aumentar. A associação entre organismos multirresistentes e as infeções associadas aos cuidados de saúde levantam a necessidade urgente de encontrar soluções (Pittet, 2005). A descoberta de novos compostos antimicrobianos eficazes contra patógenos resistentes a drogas convencionais é crucial, e os cogumelos parecem ser uma possível fonte desses compostos (Alves et al., 2012).

O cogumelo *Morchella conica* Pers. é um fungo pertencente ao filo *Ascomycota* (Masaphy & Zabari, 2013). O chapéu assume uma forma cónica, a superfície do mesmo assemelha-se a uma colmeia de cristas afiadas e poços profundos e de cor castanha. A textura é semelhante a uma esponja, o chapéu e o estipe são geralmente ocos. Cresce em solos calcários, em florestas verdejantes, em margens de campos e bermas de estrada (Turkoglu et al., 2006). Há relatos da sua bioatividade, incluindo as atividades antioxidante (Puttaraju et al., 2006; Turkoglu et al., 2006; Gursoy et al., 2009; Ozturk et al., 2010) e antimicrobiana (Turkoglu et al., 2006, Ozturk et al., 2010). No entanto, estes estudos não incluem a caracterização química e nutricional da espécie.

Os cogumelos do género *Lactarius* são conhecidos como "milk cap" (chapéu de leite), é um dos maiores géneros de *Basidiomycota* ectomicorrízicos com cerca de 400 espécies reconhecidas em todo o mundo. Os membros do género são relatados em associação com inúmeras árvores e arbustos (Nuytinck et al., 2004). Uma particularidade do género *Lactarius* é que todas as espécies exsudam um líquido leitoso típico quando os basidiocarpos são quebrados. Este líquido leitoso ou látex possui sabor suave ou picante e pode ser branco ou colorido ou ainda apresentar mudança de cor, dependendo da espécie, fornecendo informações taxonómicas importantes (Heilmann-Clausen et al., 1998). Estes cogumelos são considerados importantes e promissores tanto medicinal como nutricionalmente (Ferreira et al., 2009; Joshi et al., 2013).

*Lactarius citriolens* Pouzar e *Lactarius turpis* (Weinm.) Fr. são duas espécies do género *Lactarius* que surgem em Bragança, Nordeste de Portugal, e sobre os quais não existe muita informação. Quanto a *L. turpis*, existem vários estudos que relatam a sua capacidade para reter metais pesados, como chumbo, cádmio e mercúrio (Liukkonen-Lilja et al., 1983), a sua tolerância aos minerais metálicos tóxicos (Fomina et al., 2005), a sua atividade antifúngica contra *Penicillium expansum* (Florianowicz, 2000), a identificação de necatorina na sua composição (um alcaloide de pigmento nas lâminas)

(Fugmann et al., 1984), e determinação da atividade de isótopos (e.g. Radiocaesium) (Lux et al., 1995). No entanto, nada foi descrito sobre a sua composição química e bioatividade. Tanto quanto se sabe no que diz respeito a *L. citriolens*, na literatura existem apenas estudos sobre a sua filogenia (Verbeken et al., 2014).

O cogumelo *Leucopaxillus candidus* (Bres.) Singer surge entre Agosto e Novembro. É um cogumelo médio a grande (8-20 cm), com chapéu plano-convexo com a margem encurvada, assumindo uma forma que se assemelha a um funil com a margem muitas vezes ondulada, em forma de arco, e, por vezes, sulcado na borda. O corpo de frutificação exhibe uma cor creme esbranquiçada ou pálida (Phillips, 2005). O estipe é curto, firme e branco como o resto do cogumelo, tendo lâminas apertadas e decorrentes (Martínez de Aragón, 2005). A sua comestibilidade é controversa; há autores que afirmam a não comestibilidade de *L. candidus* (Phillips, 2005), mas a maioria descreve-o como uma fonte comestível (Benguría, 1985; Román and Boa, 2004; Martínez de Aragón, 2005). No entanto, este cogumelo pode ser confundido com algumas espécies de pequenos *Clitocybe* brancos venenosos, ou seja, *Clitocybe rivulosa*, *Clitocybe dealbata* e *Clitocybe cerusata* (Martínez de Aragón, 2005).

Há apenas alguns documentos relativos a *L. candidus* incluindo os aspetos relacionados com a sua filogenia (Tedesco et al., 2009; Vizzini et al., 2012), a sua eficiência na degradação do composto explosivo RDX (hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina) (Weber et al., 2003), a caracterização biológica do seu micélio (Caiping et al., 2004), com a isolamento de dehidromatricarianol (um poliacetileno) como principal metabolito (Ahmed et al., 1978), e a possibilidade de síndrome muscarínica, gastrointestinal ou resinóide causado pela sua ingestão (Oliveira, 2009).

No presente trabalho, os cogumelos silvestres *M. conica* (de diferentes origens - Portugal e Sérvia), *L. citriolens*, *L. turpis* e *L. candidus* foram avaliados quanto à sua composição química e bioatividade. A caracterização química foi alcançada por meio da avaliação de nutrientes (macronutrientes, açúcares, ácidos gordos e de tocoferóis) e não-nutrientes (ácidos orgânicos e ácidos fenólicos); a bioatividade dos extratos metanólicos foi avaliada em termos de potencial antioxidante e a confirmação de não-toxicidade testada numa cultura primária de células de fígado de porco. Em relação a *M. conica*, foi também estudada a atividade antimicrobiana.

*Lactarius citriolens, Lactarius turpis, Leucopaxillus candidus e Morchella conica*

## 1. Introdução

### 1.1. Caracterização das amostras

Atualmente são reconhecidos seis reinos de seres vivos, que substituem os cinco reinos até há pouco reconhecidos da classificação de Whittaker. Os fungos, durante muito tempo classificados dentro do reino vegetal, foram incluídos pela primeira vez num Reino à parte, por Whittaker, em 1969, e mantém-se na atualidade como um reino autónomo, tal como as bactérias, os protozoários, os cromistas, as plantas e os animais (Cavalier-Smith, 2004). Estes incluem os cogumelos, bolores, mofo e leveduras, assim como outros organismos menos conhecidos (Alexopoulos et al., 1996).

Os fungos apresentam semelhanças ultraestruturais com as plantas, sobretudo a nível celular (paredes celulares, vacúolos). Assemelham-se aos animais pelo facto de carecerem de plastos (nível ultra estrutural), pela presença de quitina parietal e substâncias especiais de reserva (glucídicas, por exemplo sob a forma de glicogénio) ou pela síntese de substâncias semelhantes às que o nosso organismo produz (nível químico). Atualmente estão excluídos deste reino alguns grupos capazes de fagocitar (Courtecuisse & Duhem, 2005).

O reino dos fungos reúne características distintivas fundamentais. São eucariotas, heterotróficos, desenvolvem um sistema vegetativo difuso, ramificado e tubular. Entre as suas características próprias está a presença de alguns açúcares especiais (trealose, manitol, raros em outros organismos) e outras particularidades químicas, a diversidade e complexidade dos seus ciclos biológicos, a nutrição por absorção e a possibilidade de reprodução sexuada ou assexuada (Courtecuisse & Duhem, 2005).

Apesar da grande heterogeneidade do reino Fungi, destacam-se características essenciais no que concerne ao seu sistema vegetativo. O organismo fúngico carece de organização em tecidos e órgãos. O seu corpo vegetativo, também designado talo é formado por células alargadas organizadas em filamentos que recebem o nome de hifas (Courtecuisse & Duhem, 2005).

Em termos estruturais, é comum dividir os fungos em dois grupos: unicelulares e filamentosos. Os fungos filamentosos existem em maior quantidade na natureza. Os

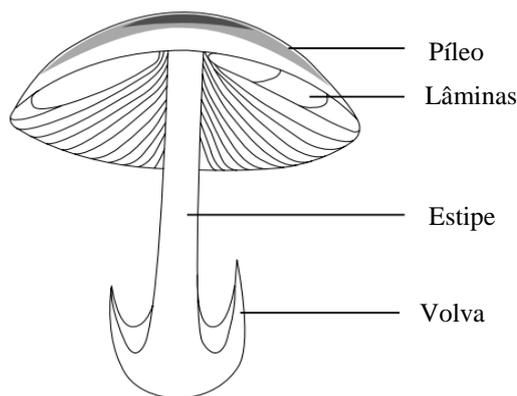
filamentos são estruturas tubulares designadas de hifas, que crescem principalmente nas extremidades ou em regiões especializadas. Em algumas espécies, através de ramificações, por meio de anastomose ou fusão de hifas, é formada uma rede de filamentos – o micélio (Chang & Miles, 2004).

Para que se possam reproduzir, os fungos produzem células especiais, os esporos. Estes podem ser produzidos diretamente sobre o micélio ou, mais frequentemente em estruturas especiais, os esporóforos. Os esporóforos apresentam variadíssimas formas, tamanhos, complexidade e, os mais conhecidos são os produzidos pelos fungos “superiores”, como as morchelas, as trufas os boletos ou as amanitas, no entanto existem inúmeras espécies que produzem esporóforos microscópicos (Courtecuisse & Duhem, 2005). Nos cogumelos, a camada portadora de esporos é designada por himénio (Chang & Miles, 2004).

Os cogumelos são corpos de frutificação de fungos distintos, suficientemente grandes para serem visualizados a olho nu e apanhados à mão (Chang & Miles, 1992). O termo “cogumelo” corresponde a um corpo de frutificação (carpóforo, micocarpo) com desenvolvimento, geralmente acima do solo. Um corpo de frutificação é formado a partir do micélio subterrâneo (hifas) pelo processo de frutificação (Kalac, 2009).

Após a formação do micélio e seu depósito de reservas, este é capaz de originar cogumelos. Uma vez estabelecidas condições favoráveis ao seu desenvolvimento, algumas hifas unem-se para formar estruturas complexas que se desenvolvem gradualmente em corpos de frutificação. Quando estes corpos frutíferos estão diferenciados mas não completamente desenvolvidos (depois de terem o píleo e estipe, mas antes do píleo expandir), denominam-se de botões. Segue-se o alongamento do estipe empurrando o píleo para a superfície. Por fim o píleo abre e o véu, se presente, rompe-se formando o anel e/ou volva, expondo as lâminas, os poros ou tubos onde se formam os esporos (Arora, 1986).

Relativamente ao tipo de cogumelo (corpo de frutificação) mais frequente, este é constituído por píleo (chapéu), lâminas (constituindo o himénio) e estipe (**Figura 1**). São exemplo as espécies *Lactarius turpis*, *Lactarius citriolens* e *Leucopaxillus candidus* (**Figura 2**). Algumas espécies de cogumelos podem apresentar volva ou ainda um anel (Chang & Miles, 2004).



**Figura 1.** Estrutura mais comum de um corpo de frutificação (Chang & Miles, 2004).

No entanto, existem espécies que não apresentam estipe. Outras não apresentam o himénio nas lâminas, mas sim em poros ou tubos. Existem ainda espécies cujo corpo de frutificação é em forma de funil com dobras, semelhante às lâminas, na parte de baixo do corpo. Estas dobras constituem a camada himenial (Chang & Miles, 2004).

A camada himenial pode, no entanto, não estar exposta. Nestes casos, os esporos formados permanecem em estruturas internas, os ascos (Arora, 1986; Courtecuisse & Duhem, 2005). O corpo de frutificação de *Morchella conica* distingue-se pelo estipe oco e pílio cónico semelhante a uma esponja (**Figura 2**) (Masaphy, 2005).



**Figura 2.** *Lactarius turpis* Fr. observando-se píleo, lâminas e estipe (Web 1). *Lactarius citriolens* Pouzar observando-se píleo, lâminas e estipe (Web 2). *Leucopaxillus candidus* (Bres.) Singer observando-se píleo, lâminas e estipe (Web 3). *Morchella conica* Pers. observando-se píleo e estipe (Web 4).

Sob o ponto de vista fisiológico os fungos são heterotróficos no que diz respeito ao carbono. Ou seja surgem em locais com carbono orgânico. O seu comportamento em relação ao azoto é variável, por vezes são autotróficos (absorvem azoto mineral) e outras heterotróficos (necessitam de azoto orgânico), sendo este elemento indispensável. Existem outros elementos necessários na vida dos fungos: oxigénio (no entanto existem fungos anaeróbios, especialmente na microflora associada ao sistema digestivo dos ruminantes), hidrogénio, fósforo, potássio, magnésio, enxofre, manganês, cobre, ferro, zinco, vitaminas, entre outros. Sabe-se também que os fungos têm necessidade de água, sobretudo durante uma parte do seu ciclo de desenvolvimento. Também os parâmetros térmicos e luminosos intervêm na sua fisiologia (Courtecuisse & Duhem, 2005).

Os fungos possuem um grande potencial metabólico devido às suas numerosas reações enzimáticas. Deste modo, podem adaptar-se a diversos ambientes. Além disso, sintetizam diversas moléculas, algumas das quais bastante tóxicas para o homem, podendo mesmo ser mortíferas, no entanto produzem outras que demonstram ser benéficas (Courtecuisse & Duhem, 2005).

Os fungos desempenham também um papel fundamental nos ecossistemas naturais e no equilíbrio biológico. Algumas espécies são saprófitas, subsistindo em matéria morta ou em decomposição (folhas mortas e resíduos vegetais ou animais mortos, excrementos, entre outros). Outras são parasitas, alimentando-se de organismos vivos e prejudicam o seu hospedeiro (que pode ser um animal, vegetal ou outro fungo). Por fim, ao longo da evolução, outras espécies desenvolvem-se em simbiose, que consiste na união a outro organismo (autotrófico) formando uma associação mutuamente benéfica. Os melhores exemplos são os líquenes e as micorrizas. Os líquenes resultantes da associação entre fungos e algas ou cianobactérias, são bioindicadores no que concerne à contaminação atmosférica, em especial em relação ao SO<sub>2</sub>, em que é possível saber com exatidão as taxas de contaminação numa determinada zona em função das espécies presentes. As micorrizas, associações entre fungos e raízes de plantas, surgem em abundância na natureza. O micélio, para além de proporcionar uma melhor absorção da água e sais minerais, também contribui para a resistência face a doenças, uma vez que atuam como antagonistas químicos de parasitas, predadores e outros competidores. Também existe a possibilidade de algumas espécies em certas

condições serem parasitas e em outras saprófitas, como é o caso *Armillariella mellea* (Arora, 1986; Courtecuisse & Duhem, 2005).

O reino dos fungos encontra-se atualmente dividido em sete filós: *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota*, *Neocallimastigomycota*, *Blastocladiomycota*, *Microsporidia* e *Glomeromycota* (Hibbet et al, 2007).

Os *Ascomycota* são vulgarmente conhecidos como fungos de saco ou ascomicetes (Kirk et al., 2008). Estes fungos formam esporos meióticos chamados ascósporos, envolvidos por uma estrutura semelhante a um saco chamada asco. Este filo inclui o género *Morchella*, alguns cogumelos e trufas, leveduras unicelulares e muitos fungos filamentosos que vivem como saprófitas, parasitas, e simbiontes mutualistas (Samuels, 2006). Uma vez que os produtos da meiose são retidos no asco, os ascomicetes têm sido usados para elucidar os princípios da genética e da hereditariedade (Radford & Parish, 1997).

Os fungos pertencentes ao filo *Basidiomycota* são vulgarmente chamados fungos de bastão ou basidiomicetes, produzem basidiósporos em estruturas chamadas basídios. A maioria dos cogumelos comuns pertence a este grupo (Valverde et al., 1995) bem como espécies comensais humanas do género *Malassezia* (Zisova, 2009), e o patogénico oportunista humano, *Cryptococcus neoformans* (Perfect, 2006).

O filo *Chytridiomycota*, também conhecido como quitrídios, apresenta uma distribuição mundial. Produzem zoósporos capazes de movimento ativo através de fases aquosas, com um único flagelo, o que levou os taxonomistas antigos a classificá-los como protistas. As filogenias moleculares sugerem que são um grupo basal divergente dos outros filós de fungos (James et al, 2006a).

Os *Neocallimastigomycota*, anteriormente colocados no filo *Chytridomycota*, são organismos anaeróbicos, que vivem no sistema digestivo de grandes mamíferos herbívoros e possivelmente em outros ambientes terrestres e aquáticos. Não têm mitocôndrias mas contêm hidrogenossomas de origem mitocondrial e formam zoósporos que são posteriormente uniflagelados ou poliflagelados (Hibbet et al, 2007).

Os *Blastocladiomycota* são saprófitas, bem como parasitas de fungos, algas, plantas e invertebrados, e podem ser facultativamente anaeróbios. São parentes

próximos dos *Chytridiomycota*, no entanto, os blastocladiomicetes apresentam meiose espórica (James et al, 2006b).

O filo *Microsporidia*, parasitas unicelulares de animais e protistas, surge de uma análise filogenética, são fungos endobióticos altamente derivados (vivem nos tecidos de outra espécie) e bastante recentes (Gill & Fast, 2006; James et al., 2006a). No entanto reconhece-se que é necessária uma análise adicional para clarificar as relações evolutivas deste grupo (Hibbet et al, 2007).

Por fim, os fungos pertencentes ao filo *Glomeromycota* formam micorrizas arbusculares, uma forma de simbiose na qual hifas fúngicas invadem células das raízes de plantas e ambas as espécies beneficiam do aumento resultante do fornecimento de nutrientes. Todas as espécies conhecidas se reproduzem assexuadamente (Redecker & Raab, 2006). Em 2001 foi elevado ao estatuto de filo e atualmente substitui o filo *Zygomycota* (Schussler et al., 2001).

## **1.2. Valor nutricional de cogumelos silvestres**

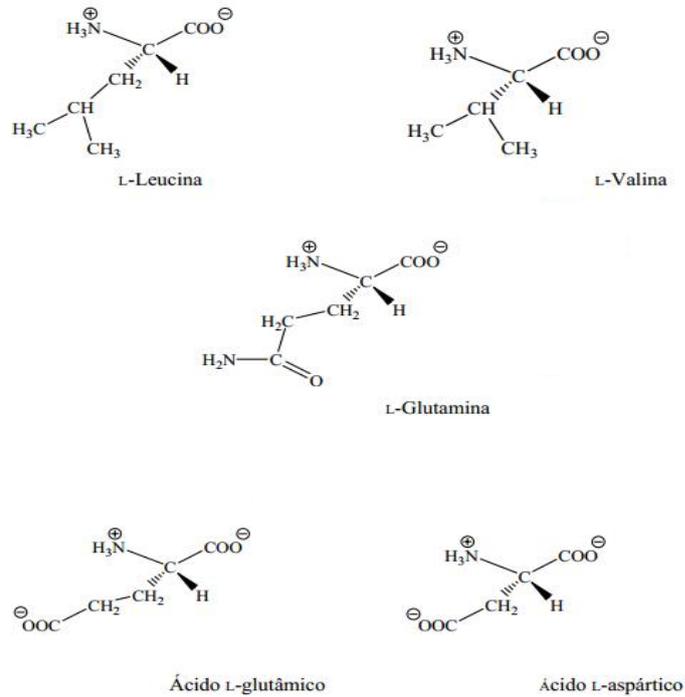
Há vários séculos que os cogumelos silvestres fazem parte da dieta humana devido às suas características organolépticas (textura e sabor), e nutricionais (Manzi et al., 2001; Román et al., 2006). Os cogumelos possuem excelente valor nutricional, com baixos teores lipídicos e grandes quantidades de hidratos de carbono e de proteínas, apresentando, também, muitos dos aminoácidos essenciais (Mattila et. al., 2000; Furlani & Godoy, 2005). Além do seu teor proteico, são também uma fonte importante de vitaminas, fósforo e minerais como o ferro (Barros et al., 2008a). As espécies de cogumelos comestíveis são, de facto, altamente nutritivas e daí serem comparadas com a carne, ovos e leite uma vez que revelam uma composição em aminoácidos semelhante à das proteínas animais (Longvah & Deosthale, 1998).

O conhecimento da composição e valor nutricional dos cogumelos utilizados na alimentação, em especial dos silvestres, é limitado quando comparado com o dos vegetais e cogumelos medicinais. No entanto, nos últimos 10-15 anos, tem-se verificado um aumento significativo de artigos originais (Kalac, 2013). Neste sentido, os cogumelos têm sido valorizados como uma fonte importante de vitaminas lipossolúveis

(vitaminas A, D, E e K) e ácidos gordos polinsaturados (PUFA) (Marcincák et al., 2005). A avaliação da composição nutricional passa pela determinação de teores em proteínas, lípidos, cinzas, hidratos de carbono e perfil individual de açúcares (Barros et al., 2008a).

Alguns nutrientes podem ser designados nutracêuticos quando a sua utilização/ingestão conduz a benefícios para a saúde através da prevenção ou tratamento de doenças. Os nutracêuticos podem ser nutrientes isolados, suplementos alimentares, alimentos geneticamente modificados, produtos naturais ou produtos processados como os cereais, sopas ou bebidas (Rathee et al., 2012). Alguns exemplos de nutracêuticos nutritivos são as fibras dietéticas, ácidos gordos polinsaturados, proteínas, péptidos, aminoácidos, acetoácidos, minerais, vitaminas antioxidantes e outros antioxidantes (Andlauer & Furst, 2002; Kruger & Mann, 2003).

De um modo geral, os cogumelos apresentam um alto teor proteico. No entanto, existe alguma variação dependendo da espécie em causa ou do estado de maturação (Longvah & Deosthale, 1998). As proteínas constituem uma importante componente funcional dos cogumelos, verificando-se um crescente interesse no seu potencial farmacêutico (Wong et al., 2010). De todas as proteínas presentes nos cogumelos, as lectinas são provavelmente as mais investigadas estando comprovada a sua ação antiproliferativa, antitumoral e imunomoduladora (Xu et al., 2011). O conteúdo em aminoácidos essenciais de cogumelos é aproximadamente 34 a 47%. Os aminoácidos mais abundantes em cogumelos incluem a leucina, valina, glutamina, ácido glutâmico e ácido aspártico (**Figura 3**) (Ferreira, 2011).



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

Para a maioria dos alimentos o teor de proteína é determinado pelo método de Kjeldahl e é calculado utilizando-se um fator de correção a partir do conteúdo de azoto total presente (Breene, 1990; Kalac 2013). O fator 6,25 assume que as proteínas contêm 16% de azoto e que são totalmente digeríveis. Esse fator despreza quantidades de compostos azotados não proteicos presentes em alimentos e que são, na grande maioria, insignificantes. Os cogumelos, porém, possuem uma quantidade significativa de compostos azotados não proteicos, na forma de quitina, nas suas paredes celulares, e tais compostos não são digeríveis. Para não superestimar o conteúdo proteico de cogumelos o fator 4,38 é adotado, pois esse valor assume que apenas 70% dos compostos azotados existentes no cogumelo sejam digeríveis pelo organismo humano ( $0,70 \times 6,25 = 4,38$ ) (Breene, 1990). Esse fator recomendado pode não representar o valor correto para a proteína em cogumelos, já que pode haver diferenças entre espécies para o teor de

quitina, amónia e outros compostos azotados não proteicos (Ranzani & Sturion, 1998). No entanto, é o fator mais recomendado para estas matrizes alimentares.

Vários trabalhos publicados na literatura internacional e alguns nacionais, a maioria utilizando metodologia descrita pela “Association of Official Analytical Chemists, AOAC” (Cunniff, 1997), descrevem e corroboram o alto valor proteico dos cogumelos. Alguns deles avaliam a composição em termos de aminoácidos (Hadar & Cohen-Arazi, 1986; Senatore et al., 1988; Ranzani & Sturion, 1998; Wang et al., 2001).

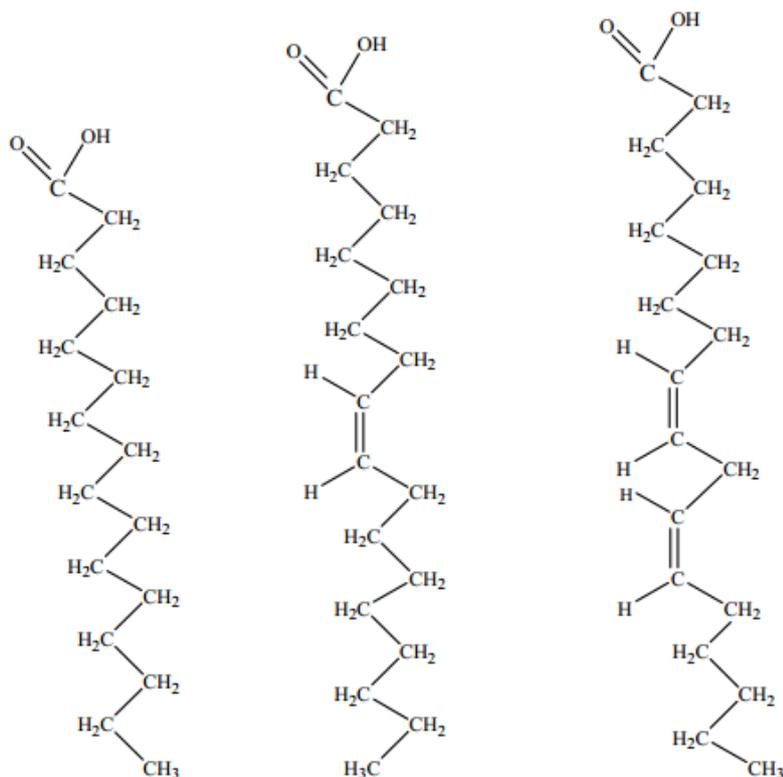
Os lípidos são compostos orgânicos formados por carbono, hidrogénio e oxigénio, podendo ter na sua constituição ácidos gordos de diversas massas moleculares. Cada molécula de ácido gordo possui no extremo da cadeia um grupo COOH, extremo  $\Delta$ , que lhe dá a função de ácido carboxílico e no extremo oposto,  $\omega$ , um grupo metilo (CH<sub>3</sub>) não funcional (Ferreira, 1994; Gómez, 2011). Podem-se classificar de acordo com a presença de ligações duplas na cadeia carbonada (saturados, monoinsaturados ou polinsaturados), o número da posição da primeira ligação ( $\omega$ -3,  $\omega$ -6 e  $\omega$ -9) e configuração das duplas ligações (*cis* e *trans*) (Gómez, 2011). Nos alimentos, a grande maioria dos ácidos gordos têm número par de átomos de carbono, apesar de também existirem alguns em número ímpar. O comprimento da cadeia é muito variável, desde 4 a mais de 24 carbonos (Ferreira, 1994).

Os lípidos são biomoléculas simples como colesterol e outros esteroides, ou complexas, nomeadamente fosfolípidos ou triacilglicéridos (Quintas et al., 2008).

Os lípidos desempenham um papel importante no corpo humano, funcionando como hormonas ou seus precursores, auxiliando no processo digestivo e constituindo uma fonte de energia metabólica. Também fazem parte de membranas biológicas atuando como componentes estruturais e funcionais, como constituintes da bainha de mielina e isolantes térmicos (Burtis & Ashwood, 1996). Os ácidos gordos polinsaturados da família  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 possuem propriedades biológicas, mesmo em baixas concentrações (Gibney et al., 2002) e são precursores biossintéticos dos eicosanóides (ex. prostaglandinas). Estas moléculas de sinalização controlam vários sistemas no corpo humano, mostrando efeitos em doenças cardiovasculares, níveis de triglicéridos, pressão arterial e artrite (Voet & Voet, 2004). Nos fungos, são componentes celulares vitais com função de armazenamento e fazendo parte de

componentes membranares e organelares. Em alguns fungos, os principais ácidos gordos surgem na membrana fosfolipídica e incorporados em triacilgliceróis (Suutari, 1995). O ácido linoleico é também precursor do oct-1-en-3-ol, conhecido como “álcool dos fungos”, o principal componente aromático na maioria dos fungos e que contribui para o sabor dos cogumelos (Maga, 1981).

O conteúdo total lipídico em cogumelos é geralmente baixo, cerca de 2 a 6% da massa seca (Kalac, 2009). Dezenas de ácidos gordos foram identificados na fração lipídica dos cogumelos (Kalac, 2013). Na sua composição, prevalecem os ácidos gordos polinsaturados, constituindo cerca de 75% do total de ácidos gordos, sendo o ácido linoleico ( $18:2\Delta^{9,12}$ ) e oleico ( $18:1\Delta^9$ ) os mais significativos (Ribeiro et al., 2009), já o palmítico (C16:0) é o ácido gordo saturado maioritário (**Figura 4**) (Ferreira, 2011; Rathee et al., 2012). No entanto, é de salientar que a composição de ácidos gordos nos cogumelos é variável de acordo com a espécie (Yilmaz, 2006).



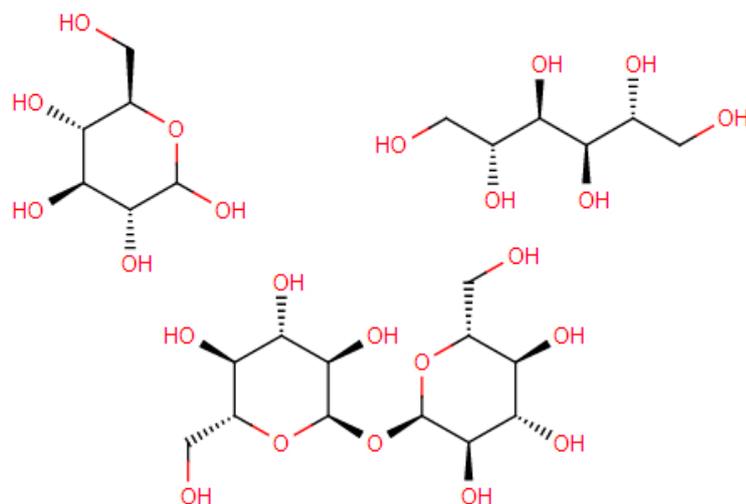
**Figura 4.** Estrutura química do ácido palmítico (16:0), ácido oleico ( $18:1\Delta^9$ ) e ácido linoleico ( $18:2\Delta^{9,12}$ ) (Ferreira, 2011).

Geralmente, a análise de ácidos gordos a partir de lípidos é realizada por cromatografia em fase gasosa (GC) e envolve a pré-derivatização dos ácidos gordos em compostos menos polares e mais voláteis, de modo a que possam ser eluídos a temperaturas razoáveis, sem decomposição térmica ou rearranjo molecular ao longo da coluna de GC. O procedimento mais comum consiste na hidrólise e metilação dos ácidos gordos combinados de modo a formar os respetivos ésteres metílicos (FAMES) na presença de um ácido catalítico (León-Guzmán et al., 1997; Ribeiro et al., 2009).

Os hidratos de carbono, também designados glúcidos ou glícidos são compostos de carbono, hidrogénio e oxigénio, em que estes últimos elementos se encontram em proporção semelhante à da água (2 de H para 1 de O); nas formas simples são açúcares com sabor doce mais ou menos pronunciado. Estas formas simples têm de 3 a 7 átomos de carbono. São as substâncias orgânicas mais abundantes na nossa alimentação e encontram-se largamente distribuídas nos tecidos dos animais e das plantas, predominando, sob a forma de reservas (Ferreira, 1994).

Os hidratos de carbono são macronutrientes também presentes nos cogumelos. O interesse em caracterizar polissacáridos solúveis em água é recente. Estes componentes obtidos a partir dos corpos de frutificação de cogumelos despertam interesse devido à sua capacidade de inibir o crescimento de tumores (Chang & Miles, 2004).

O grupo dos hidratos de carbono compreende vários compostos como os açúcares (monossacáridos e derivados, e oligossacáridos) e polissacáridos estruturais e de reserva (glucanos) (Kalac, 2013). Excluindo o teor em água, os hidratos de carbono são os principais constituintes presentes nos cogumelos sendo responsáveis por fornecer energia (Gern et al., 2008; Wang et al., 2014). A glucose, o manitol e a trealose são, respetivamente, o monossacárido, o álcool derivado de açúcar e oligossacárido maioritários em cogumelos (**Figura 5**) (Kalac, 2009; Ferreira, 2011; Kalac, 2013).



**Figura 5.** Estrutura química da glucose (Web 5), manitol (Web 6) e trealose (Web 7).

O manitol, a glucose e o glicogénio são hidratos de carbono de fácil digestão presentes em cogumelos (Wang et al., 2014). No entanto são os hidratos de carbono não digeríveis os encontrados em maior quantidade em cogumelos, maioritariamente oligossacáridos e polissacáridos além do amido como a quitina, os β-glucanos e os mananos (Cheung, 2010). É possível encontrar polissacáridos com função de reserva ou estrutural. O glicogénio é o polissacárido de reserva em cogumelos (Kalac, 2013), já a quitina, polímero da N-acetilglicosamina, é um polissacárido estrutural importante encontrado na parede celular do cogumelo (Gern et al., 2008).

A fibra alimentar pertence ao grupo de hidratos de carbono não digeríveis pelas enzimas digestivas do homem e interfere no processo digestivo. Classificam-se, quanto à sua solubilidade em água, como fibras solúveis e insolúveis sendo compostas por celulose, hemiceluloses, gomas, pectinas e mucilagens. Devido aos efeitos fisiológicos das fibras alimentares, nomeadamente a diminuição dos níveis séricos de glucose e colesterol, alguns autores dedicaram-se a quantificar a fibra alimentar em cogumelos (Manzi et al., 2004; Furlani & Godoy, 2005).

A maioria dos trabalhos analíticos encontrados na literatura calcula o teor de hidratos de carbono em cogumelos por diferença através da equação: Hidratos de carbono (g) = 100 – (proteínas + gordura + cinzas), no entanto, a espécie condiciona a quantidade total nestes constituintes e esses valores incluem as fibras (Bautista-Justo et al., 1998; Manzi et al., 2001; Yang et al., 2001; Martín-Belloso & Llanos-Barriobero, 2001; Furlani & Godoy, 2005).

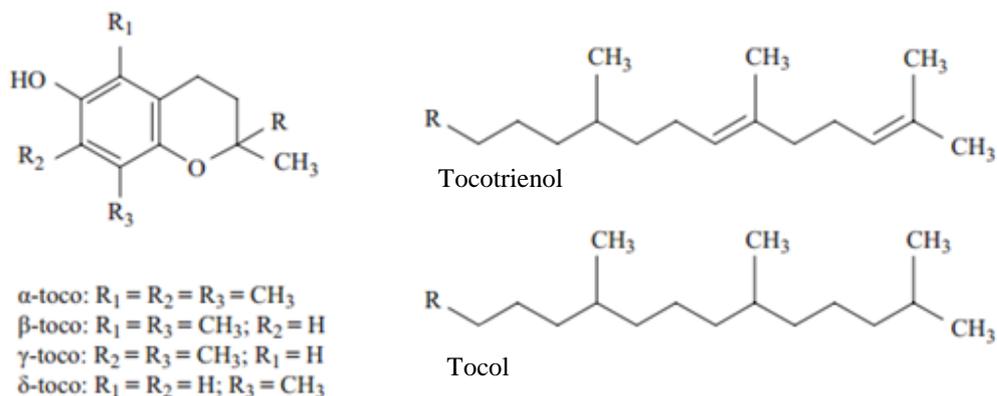
Por fim, a contribuição energética é determinada com base na equação: Energia (kcal) =  $4 \times (\text{proteínas} + \text{hidratos de carbono}) + 9 \times (\text{lípidos})$ , em que uma porção de 100 g de cogumelo tem, em média, uma contribuição energética de 30 kcal (127 kJ) (Ferreira, 2011).

### 1.3. Moléculas bioativas em cogumelos silvestres

O interesse pela descoberta de compostos bioativos de origem natural surgiu nas últimas duas décadas, impulsionado pelo aumento do número de artigos científicos que demonstram a eficácia de tais compostos contra várias doenças. As aplicações em ciência e tecnologia de alimentos também sofreram essa evolução, principalmente devido à evidência crescente da correlação entre dieta e algumas doenças crônicas (Herrero et al., 2013).

O consumo de cogumelos tem vindo a aumentar devido às suas propriedades organolépticas (Sadler, 2003), nutricionais (Kalac, 2009) e também, pela abundância em compostos bioativos (Ferreira et al., 2009). São exemplo de compostos bioativos presentes em cogumelos os tocoferóis (Barros et al. 2008a; Heleno et al., 2010), compostos fenólicos (Barros et al., 2009; Vaz et al., 2011) e ácidos orgânicos (Barros et al., 2013), alguns deles também responsáveis pelo potencial nutracêutico deste alimento (Barros et al., 2008a).

Vitamina E é um termo frequentemente utilizado para designar uma família de compostos quimicamente relacionada, comumente chamados de tocoferóis e tocotrienóis, que têm em comum na sua estrutura um núcleo fenólico bicíclico, o cromanol, e uma cadeia lateral isoprénica (Ferreira, 1994; Heleno et al., 2010). Os tocoferóis apresentam estrutura monofenólica (Silva & Jorge, 2011). Os tocóis possuem cadeia saturada ligada ao anel e são denominados tocoferóis. Já os tocotrienóis, possuem cadeia insaturada (Silva & Jorge, 2011). A vitamina E compreende quatro isoformas distintas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ -tocoferol, e os quatro tocotrienóis correspondentes (**Figura 6**) (Ferreira et al., 2009).



**Figura 6.** Estrutura química dos tocoferóis e tocotrienóis (Silva & Jorge, 2011).

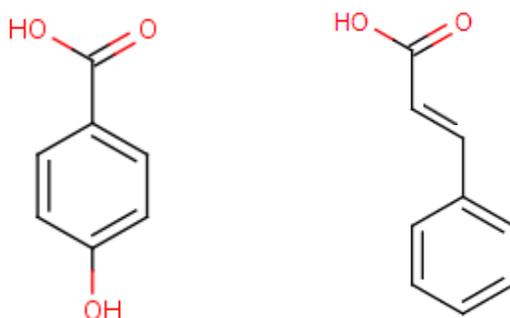
A vitamina E tem a capacidade de impedir a propagação das reações em cadeia induzidas pelos radicais livres nas membranas biológicas. Os danos oxidativos podem ser inibidos pela ação antioxidante dessa vitamina, juntamente com a glutatona, a vitamina C e os carotenóides, constituindo um dos principais mecanismos da defesa endógena do organismo (Bianchi & Antunes, 1999). Esta vitamina é um importante antioxidante lipofílico que mostrou efeitos positivos em sistemas vivos contrariando o envelhecimento (Agostinucci et al., 2002), o fortalecimento do sistema imunológico e reduzindo o risco de cancro (Lee & Wan, 2000), a carga viral em pessoas infectadas pelo HIV (Allard et al., 1998) e é, ainda, utilizada no tratamento da doença de Parkinson (Itoh et al., 2006).

Vários resultados de estudos de tocoferóis presentes em cogumelos têm sido divulgados. Barros et al. (2008b), apresentam um método de determinação que não inclui saponificação mas sim a adição de um antioxidante para evitar a oxidação dos tocoferóis, protegendo as amostras da luz e do calor, seguido de análise de HPLC-fluorescência.

Os compostos fenólicos e ácidos orgânicos são conhecidos por influenciar as propriedades organolépticas de matrizes alimentares. Além disso, estes compostos podem estar envolvidos na proteção contra várias doenças, devido ao seu potencial antioxidante (Ribeiro et al., 2007).

Os compostos fenólicos são um grupo de moléculas provenientes do metabolismo secundário das plantas, sendo produtos finais da via do xiquimato e acetato (Gómez, 2011).

Os compostos fenólicos compreendem um vasto grupo de moléculas caracterizadas pela presença de um anel aromático com, pelo menos, um grupo hidroxilo substituinte e uma cadeia lateral (Gómez, 2011). Estes podem variar desde moléculas simples (ácidos fenólicos, fenilpropanóides, flavonóides) até compostos altamente polimerizados (lenhinas, melaninas, taninos) (Bravo, 1998). Em particular, os ácidos fenólicos podem ser subdivididos em dois grupos principais, ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos (**Figura 7**) (Liu, 2004). O primeiro grupo é composto pelos ácidos benzóicos, que possuem sete átomos de carbono (C6-C1) e são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza (Soares, 2002). Os ácidos hidroxibenzóicos incluem o *p*-hidroxibenzóico, protocatéquico, vanílico, siríngico e gálico. Estes apresentam-se frequentemente na forma ligada e são tipicamente um componente de estruturas complexas como lenhinas e taninos hidrolizáveis. Também é possível encontrá-los ligados a derivados de açúcar e ácidos orgânicos em plantas utilizadas na alimentação (Liu, 2004). O segundo grupo, é constituído pelos ácidos cinâmicos com nove átomos de carbono (C6-C3) (Soares, 2002). Os ácidos hidroxicinâmicos incluem o *p*-cumárico, cafeico, ferúlico e sinápico. Nas fontes naturais, são encontrados principalmente esterificados com moléculas pequenas, como por exemplo, ácidos quínico ou tartárico, bem como ligados a componentes estruturais da parede celular tais como celulose, lenhina, e proteínas através de ligações de éster (Liu, 2004).



**Figura 7.** Estrutura química do ácido hidroxibenzóico (esquerda) (Web 8) e hidroxicinâmico (direita) (Web 9).

Nos cogumelos, os ácidos fenólicos são os principais compostos fenólicos encontrados (Ferreira et al., 2009). Estes compostos são responsáveis por um vasto número de efeitos biológicos que incluem a atividade antibacteriana, anti-inflamatória, antialérgica, hepatoprotetora, antitrombótica, antiviral, antitumoral e ações vasodilatadoras (Soobrattee et al., 2005).

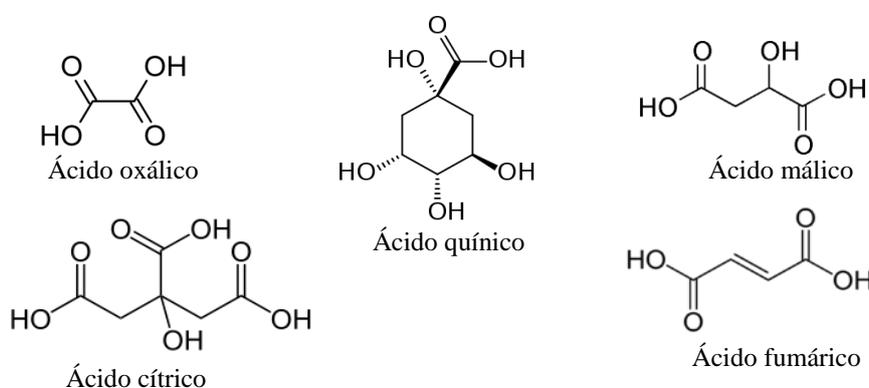
O perfil individual de compostos fenólicos pode ser obtido por HPLC acoplada a detetor de fotódodos (HPLC-DAD) ou através de um detetor de ultravioleta (HPLC-UV), ou então por cromatografia gasosa-espetrometria de massa com monitorização de íão selecionado (GC-MS SIM) (Ferreira et al., 2009).

Os ácidos orgânicos são compostos de baixa massa molecular que se caracterizam por conter um ou mais grupos carboxilo na sua estrutura, o que lhes confere propriedades físico-químicas específicas, nomeadamente na perceção das características do sabor dos alimentos (Gómez, 2011). Estes desempenham um papel determinante na manutenção da qualidade de frutos e vegetais e características organoléticas, e têm sido utilizados como controlo da qualidade dos mesmos (Cámara et al., 1994). A sua natureza e concentração influenciam as características organoléticas dos cogumelos (Valentão et al., 2005; Ribeiro et al., 2006).

Os ácidos orgânicos são sintetizados sobretudo a nível mitocondrial através do ciclo dos ácidos tricarboxílicos ou ciclo de Krebs. Estão presentes na mitocôndria e são armazenados em vacúolos, sendo a sua excreção dependente de determinadas funções fisiológicas (López-Bucio et al., 2000). Estes, exercem um papel importante no equilíbrio osmótico das plantas assim como no ajuste e controlo do excesso de cationes no meio. Também atuam como agente regulador no caso de défice nutricional nas plantas, tolerância a metais e defesa frente a agentes patogénicos (Gómez, 2011).

Alguns destes ácidos revelam um papel protetor contra várias doenças devido à sua atividade antioxidante (tal como o caso dos ácidos tartárico, málico, cítrico ou succínico), sendo capazes de quelatar metais ou deslocalizar a carga eletrónica proveniente de radicais livres (López-Bucio et al., 2000; Seabra et al., 2006).

Alguns estudos descrevem ácidos orgânicos em cogumelos, nomeadamente em corpos frutíferos e micélios de diferentes espécies (Valentão et al., 2005; Ribeiro et al., 2006; Rotzoll et al., 2006; Ribeiro et al., 2007; Ribeiro et al., 2008a; Ribeiro et al., 2008b; Carvajal et al., 2012). Nas espécies de cogumelos comestíveis, é possível encontrar ácidos orgânicos nomeadamente, os ácidos oxálico, quínico, málico, cítrico e fumárico (**Figura 8**). O estudo de Barros et al. (2013) contribuiu muito para o conhecimento do perfil de ácidos orgânicos em espécies de cogumelos silvestres comestíveis. Tendo em vista a otimização na determinação de ácidos orgânicos, os mesmos autores propõem HPLC com detetor de fotodíodos (HPLC-DAD) para a sua análise.



**Figura 8.** Estrutura química dos ácidos cítrico, oxálico (Web 10), quínico (Web 11), málico (Web 12), cítrico (Web 13) e fumárico (Web 14).

#### 1.4. Bioatividade de cogumelos silvestres

Os cogumelos têm vindo a desempenhar um papel importante em vários aspetos da atividade humana (Bala et al., 2011). Para além do seu reconhecimento como alimento nutritivo, são uma importante fonte de compostos biologicamente ativos de valor medicinal (Breene, 1990).

Várias espécies de cogumelos têm vindo a ser estudadas pela comunidade científica com o intuito de desenvolver novas alternativas terapêuticas, e os resultados têm comprovado as suas propriedades bioativas (Lindequist et al., 2005). Os cogumelos são uma fonte rica em nutracêuticos (Çaglarirmak, 2007; Elmastas et al., 2007; Ribeiro et al., 2007) responsáveis pelas sua atividade antioxidante (Mau et al., 2002; Lo & Cheung, 2005; Barros et al., 2007b), antitumoral (Wasser & Weis, 1999) e

antimicrobiana (Smânia et al., 1995; Hirasawa et al., 1999; Hatvani, 2001; Barros et al., 2007c; Turkoglu et al., 2007).

A formação de radicais livres está associada ao metabolismo normal do organismo, mas está também relacionada com doenças degenerativas como o cancro. A ingestão de antioxidantes exógenos de fontes como frutas e vegetais pode minimizar a ação dos radicais livres e, conseqüentemente, reduzir os riscos dessas doenças. Por isso, nos últimos anos, o aumento do consumo de fontes naturais de antioxidantes e os estudos desses compostos têm sido observados (Alvarez-Parrilla et al., 2007).

Para uma substância ser definida como antioxidante deve prevenir ou retardar a oxidação, mesmo estando em baixa concentração (<1%, geralmente de 1-1000 mg/L) relativamente ao substrato a ser oxidado e, além disso, deve formar radicais estáveis após a reação (Borguini & Torres, 2006; Valgimigli & Pratt, 2012). Os antioxidantes estão em constante atividade nos organismos vivos, necessitando estar em quantidades suficientes para neutralizar os efeitos tóxicos dos radicais livres que são constantemente produzidos (Dubost et al., 2007). Quando se verifica um desequilíbrio entre as moléculas oxidantes e antioxidantes, resultando na indução de danos celulares causados pelos radicais livres, estamos perante o stresse oxidativo (Sies, 1993). Os radicais livres são átomos, moléculas ou iões com eletrões desemparelhados que são altamente instáveis e reativos. Eles derivam de três elementos: oxigénio, azoto e enxofre, criando, assim, espécies reativas de oxigénio (ROS), espécies reativas de azoto (RNS) e espécies reativas de enxofre (RSS) (Carocho & Ferreira, 2013). As ROS incluem radicais livres como o anião superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroperóxido ( $HO_2^{\cdot}$ ), radical hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ), óxido nítrico (NO), mas também outras espécies como o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), oxigénio singlete ( $^1O_2$ ), ácido hipocloroso (HOCl) e peróxido de nitrato ( $ONOO^{\cdot}$ ). As RNS derivam do NO quando reagem com o  $O_2^{\cdot-}$ , formando  $ONOO^{\cdot}$ . As RSS formam-se através da reação de ROS com tióis (Lu et al., 2010).

Estas espécies são produzidas no metabolismo normal da mitocôndria, mas também através de xantina oxidase, peroxissomas, processos inflamatórios, fagocitose, vias oxidativas do ácido araquidónico, isquemia e exercício físico. As condições externas também promovem a produção de espécies reativas; são exemplo desses fatores o fumo, poluentes ambientais, radiação, medicamentos, pesticidas, solventes industriais e o ozono (Lobo et al., 2010).

Os principais alvos de ROS, RNS e RSS são proteínas, moléculas de DNA (ácido desoxirribonucleico) e RNA (ácido ribonucleico), açúcares e lípidos (Lu et al., 2010; Craft et al., 2012).

A oxidação dos lípidos existentes nas membranas celulares é um processo muito frequente no corpo humano. Esta reação é gerada pelo excesso de ROS, em particular radicais hidroxilos, através de um mecanismo radicalar em cadeia, formando-se compostos tóxicos como os peróxidos lipídicos, o malonaldeído, mono-hidroxi-peróxidos ou 4-hidroxinonal. A peroxidação lipídica, além de causar sérios danos no corpo humano, é a principal causa da deterioração dos alimentos afetando a cor, aroma (formação de moléculas nocivas à saúde, voláteis e não voláteis), textura e valor nutricional (Belitz & Grosch, 1987).

O corpo humano possui um sistema complexo de enzimas naturais, e defesas antioxidantes não enzimáticas que neutralizam os efeitos prejudiciais dos radicais livres e outros oxidantes (Alam et al., 2013).

As defesas antioxidantes enzimáticas podem ser classificadas em dois grupos: as primárias e secundárias. As defesas antioxidantes primárias previnem a formação ou neutralizam os radicais livres e incluem a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. As defesas secundárias são constituídas pela glutathione reductase e glucose-6-fosfato-desidrogenase. As defesas antioxidantes não enzimáticas retardam a reação de autooxidação por meio da complexação de metais, remoção de oxigénio, decomposição dos hidroperóxidos com formação de compostos mais estáveis e regeneração dos antioxidantes enzimáticos. Estão presentes em maior quantidade e incluem vitaminas, cofatores enzimáticos, compostos de azoto e péptidos (Gordon, 1990; Carochi & Ferreira, 2013).

Os radicais livres são responsáveis por causar um grande número de patologias incluindo o cancro (Kinnula & Crapo, 2004), doenças cardiovasculares (Singh & Jialal, 2006), distúrbios neuronais (Sas et al., 2007), doença de Alzheimer (Smith et al., 2000), défice cognitivo ligeiro (Guidi et al., 2006), doença de Parkinson (Bolton et al., 2000), doença hepática induzida pelo álcool (Arteel, 2003), colite ulcerosa (Ramakrishna et al., 1997), aterosclerose (Upston et al., 2003) e, também, envelhecimento.

A proteção contra os radicais livres pode ser aumentada pela introdução de antioxidantes na dieta e, conseqüente papel na prevenção de várias doenças. Os antioxidantes podem ser de grande vantagem para a melhoria da qualidade de vida, impedindo ou adiando o aparecimento de doenças degenerativas. Além disso, eles têm também um potencial na redução dos custos na prestação de cuidados de saúde (Alam et al., 2013). De facto, os antioxidantes podem ajudar o sistema de defesa endógeno, assumindo uma grande importância como possíveis agentes protetores, reduzindo danos oxidativos. Neste contexto, a possibilidade de incluir cogumelos, que contêm significativas quantidades de fitoquímicos bioativos, na nossa dieta pode fornecer benefícios de saúde desejáveis, além da nutrição básica (Ferreira et al., 2009).

O desenvolvimento de antibióticos tem sido uma das conquistas científicas mais importantes dos últimos 70 anos. Estes compostos atuam de várias formas, interferem nos processos metabólicos ou nas estruturas do organismo (Fuchs, 2004). O mecanismo de ação destes fármacos está principalmente relacionado com interferências na síntese da parede celular, modificação da permeabilidade da membrana plasmática, interferências na replicação de cromossomas, ou na síntese de proteínas (Tenover, 2006). A parede celular é responsável pela forma e rigidez das células bacterianas, atuando como uma barreira osmótica (Koch, 2003). O teor de peptidoglicano na parede de célula varia entre 10% e 60% para bactérias Gram-negativo e bactérias Gram-positivo, respetivamente (Opal & Cohen, 1999; Ginsburg, 2002).

Apesar da enorme diversidade de compostos antibacterianos, a resistência bacteriana face aos antibióticos de primeira escolha tem vindo a aumentar drasticamente (Alves et al., 2012). Doenças que eram facilmente erradicadas são hoje em dia uma problemática devido ao aumento da resistência aos antibióticos (Peres-Bota et al., 2003; Alves et al., 2012). A associação entre microrganismos multirresistentes e as infeções hospitalares suscitam a necessidade urgente para encontrar soluções (Pittet, 2005). Em 2010, a Organização Mundial de Saúde aconselhou todos os países a implementar procedimentos de controlo para a propagação de bactérias multirresistentes a fármacos, com destaque para os riscos associados à ausência de terapias alternativas contra esses microrganismos (Web 15). Portanto, a descoberta de novas substâncias antimicrobianas eficazes contra microrganismos patogénicos resistentes aos fármacos convencionais é crucial (Finch, 1998; Kunin, 1993; Alves et al., 2012).

A investigação em cogumelos é extensa e centenas de espécies demonstraram um amplo espectro de atividades farmacológicas, incluindo atividade antimicrobiana. De facto, é possível encontrar documentos que demonstram efetividade de extratos contra bactérias e fungos (Hearst et al. 2009, Alves et al., 2012; Heleno et al., 2013). As propriedades antimicrobianas de cogumelos podem ser avaliadas pelo método de difusão em agar ou pelo método de microdiluição. No entanto, o método de microdiluição proporciona resultados mais semelhantes às das constatações clínicas (Kalemba & Krunicka, 2003).

Wasser & Weiss (1999), definiram os cogumelos como um recurso medicinal não tóxico com benefícios sob o ponto de vista fisiológico. Os seus extratos podem modular a resposta imunitária do hospedeiro (Lee & Nishikawa, 2003). No entanto, são escassos os dados na literatura acerca da toxicidade de cogumelos (Orsine et al., 2012).

Num estudo de Novaes et al. (2007), os investigadores observaram que a administração do extrato aquoso de *Agaricus sylvaticus* em doses superiores às usadas nos protocolos terapêuticos em humanos, apresenta toxicidade muito baixa, quando realizados testes de toxicidade clínica, bioquímica e histopatológica em ratos saudáveis.

Bellini et al. (2008), observaram que as frações metanólicas da espécie *Agaricus blazei* testadas não ofereceram proteção química e que todas as frações se apresentaram potencialmente mutagénicas no teste de HGPRT (hipoxantina-guanina fosforribosil-transferase).

Yoshioka et al. (2010), avaliaram a toxicidade do extrato obtido a partir do micélio de *Lentinula edodes* em ratos Wistar, com doses diárias de 2000 mg/kg, durante 28 dias. Nenhum efeito toxicológico significativo foi observado nos exames de hematologia, bioquímica sérica, peso dos órgãos absolutos e relativos, autópsia e histopatologia. Consequentemente, o nível sem efeitos adversos foi superior a 2000 mg/kg/dia nas condições do estudo mencionado.

Orsine et al. (2012), verificaram que o cogumelo *A. sylvaticus* não apresentava toxicidade, comprovando ser seguro para o consumo humano. Nesse estudo, foram realizados testes utilizando-se o extrato aquoso não fracionado do cogumelo, e a toxicidade foi avaliada observando-se qual a concentração letal (CL<sub>50</sub>) por meio de atividade hemolítica em eritrócitos humanos.

Heleno et al. (2014), verificaram que a espécie *Coprinopsis atramentaria* não apresenta toxicidade. Nesse estudo, foram realizados testes utilizando-se o extrato metanólico do cogumelo, e a toxicidade foi avaliada observando-se qual a concentração capaz de inibir o crescimento de metade (GI<sub>50</sub>) de células primárias de fígado de porco pelo método colorimétrico da sulforodamina B (SRB).

A toxicidade é um dos parâmetros cruciais para a avaliação de resposta biológica e do potencial lesivo que pode causar a morte de células ou tecidos, sendo hoje o primeiro teste de escolha usado para quase todas as novas substâncias (Gonçalves et al., 2008). Os métodos *in vitro* são uma ferramenta importante na avaliação do risco toxicológico. Estes métodos para além de serem úteis na previsão da evolução de cancro, também podem fornecer dados preditivos a longo prazo acerca da toxicidade em órgãos alvo como a fibrose pulmonar e lesões hepáticas, nefrotoxicidade e neurotoxicidade (Eisenbrand et al., 2002).

## 1.5. Objetivos

O presente trabalho teve como principais objectivos avaliar o valor nutricional, bem como compostos e propriedades bioativas de cogumelos silvestres: *Lactarius turpis* Fr., *Lactarius citriolens* Pouzar, *Leucopaxillus candidus* (Bres.) Singer e *Morchella conica* Pers., provenientes do Nordeste de Portugal. No caso da última espécie, foram analisadas amostras provenientes de Portugal e da Sérvia.

O seu valor nutricional foi obtido após determinação da humidade, proteínas, lípidos, hidratos de carbono e cinzas. A sua composição química foi também estudada nomeadamente em mono e oligossacáridos (açúcares) por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI), ácidos gordos por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de ionização de chama (GC-FID), ácidos orgânicos e compostos fenólicos por cromatografia ultra rápida acoplada a um detetor de fotodíodos (UFLC-PDA) e tocoferóis por HPLC-fluorescência.

As propriedades antioxidantes foram avaliadas através do efeito captador de radicais livres, poder redutor e inibição da peroxidação lipídica. *M. conica* também foi avaliada pelo seu potencial antimicrobiano face a bactérias Gram positivo e Gram

negativo, e microfungos. Também foi confirmada a ausência de citotoxicidade dos extratos.

*Lactarius citriolens, Lactarius turpis, Leucopaxillus candidus e Morchella conica*

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Amostragem das espécies de cogumelos

As amostras silvestres de *Morchella conica*, *Lactarius citriolens*, *Lactarius turpis* e *Leucopaxillus candidus* foram recolhidas em Bragança (Nordeste de Portugal). *Morchella conica* também foi recolhida na Floresta de Levipoca, perto de Belgrado (Sérvia), entre Outubro e Novembro de 2012. As autentificações foram feitas pela Dra. Anabela Martins (Instituto Politécnico de Bragança) e pela Dra. Jasmina Glamočlija (Instituto de Pesquisa Biológica, Belgrado). Exemplares representativos foram depositados no herbário da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, em Portugal e na Unidade de Coleção Fúngica do Laboratório de Micologia, do Departamento de Fisiologia Vegetal, Instituto de Pesquisa Biológica "Siniša Stanković", Belgrado, Sérvia.

Todas as amostras foram imediatamente liofilizadas (FreeZone 4.5, Labconco, Kansas City, MO, EUA - amostras de Portugal - e LH Leybold, Lyovac GT2, Frenkendorf, Switzerland - amostra da Sérvia), reduzidas a pó (20 mesh), misturadas de forma a obter amostras homogéneas e armazenadas num exsiccador, protegidas da luz, até análise posterior.

### 2.2. Padrões e Reagentes

Os solventes acetato de etilo 99,8%, acetonitrilo 99,9% e *n*-hexano 95%, grau HPLC, foram fornecidos pela Fisher Scientific (Lisboa, Portugal). A mistura padrão com 37 ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) (referência 47885-U) foi adquirida da Sigma (St. Louis, EUA), assim como outros isómeros individuais de ácidos gordos, padrões de açúcares (D(-)-frutose, D(-)-manitol, D(+) rafinose penta-hidratada, e D(+)-trealose), de tocoferóis (isoformas  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -), de compostos fenólicos (ácidos gálico, *p*-hidroxibenzóico, *p*-coumárico, protocatéquico e cinâmico), de ácidos orgânicos (ácidos L(+)-ascórbico, cítrico, málico, oxálico, chiquímico, succínico, fumárico e quínico) e o trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico. A mistura racémica de tocol, 50 mg/mL, foi comprada da Matreya (PA, EUA). O 2,2-Difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) foi obtido da Alfa Aesar (Ward Hill, EUA). O

dimetilsulfoxido (DMSO) (Merck KGaA, Alemanha) foi utilizado como solvente nos ensaios antimicrobianos. O soro fetal bovino (FBS), a solução salina de Hank's, a solução de aminoácidos não essenciais (2 mM), as soluções de penicilina/estreptomicina (100 U/mL e 100 µg/mL, respetivamente), o meio DMEM de Hyclone (Logan, EUA), o ácido acético, a elipticina, a sulforodamina B (SRB), o azul tripano, o ácido tricloroacético (TCA) e o Tris (2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol) foram também adquiridos à Sigma (Saint Louis, EUA). O metanol e outros produtos químicos eram de grau analítico e foram adquiridos a partir de fontes comuns. A água foi tratada com um sistema de purificação de água Milli-Q (TGI Pure Water Systems, EUA).

## **2.3. Composição química e nutricional**

### **2.3.1. Determinação de macronutrientes**

As amostras foram analisadas quanto à composição química, nomeadamente, humidade, proteínas, lípidos, hidratos de carbono e cinzas de acordo com os procedimentos oficiais de análises (AOAC, 1995). O teor proteico ( $N \times 4,38$ ) presente nas amostras foi estimado pelo método macro-Kjeldahl; o teor lipídico foi determinado após extração em Soxhlet com éter de petróleo de uma massa conhecida de amostra; as cinzas foram determinadas por incineração a  $600 \pm 15$  °C; os hidratos de carbono foram calculados por diferença: Hidratos de Carbono =  $100 - (g \text{ proteínas} + g \text{ cinzas} + g \text{ lípidos})$ . A energia total foi calculada através da seguinte equação: Energia (kcal) =  $4 \times (g \text{ proteínas} + g \text{ hidratos de carbono}) + 9 \times (g \text{ lípidos})$ .

### **2.3.2. Determinação de açúcares livres**

Os açúcares livres foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI), seguindo o procedimento implementado no laboratório de Química e Bioquímica Aplicada da Escola Superior Agrária de Bragança (Helena et al., 2009). Adicionou-se 1 mL de padrão interno PI (rafinose, 5 mg/mL) à amostra liofilizada (1g) e extraiu-se com 40 mL de etanol 80% durante 30 min. A suspensão resultante foi centrifugada a 15000g durante 10 min. Seguidamente, procedeu-se à filtração e evaporação do etanol (evaporador rotativo Büchi R-210). O sobrenadante foi lavado 3 vezes sucessivas com 10 mL de éter etílico. Após concentração a 40 °C, o resíduo sólido foi dissolvido em

água num volume final de 5 mL, filtrado através de um filtro de 0,22 µm, seguidamente transferido para um frasco âmbar e analisado. O volume de amostra injetado foi de 10 µL. O sistema integrado no equipamento de HPLC possui uma bomba (Knauer, Smartline 1000), sistema desgaseificador (Smartline manager 5000), amostrador automático (AS-2057 Jasco) e um detetor de RI (Knauer, smartline 2300). A separação cromatográfica foi conseguida com uma coluna NH<sub>2</sub> Eurospher 100-5 (4,6 × 250 mm, 5 µm, Knauer) operando a 30 °C (forno 7971 R Grace). A fase móvel foi água desionizada/acetonitrilo, 70:30 (v/v) com um fluxo de 1 mL/min. Os dados foram analisados utilizando o software Clarity 2.4 (DataApex). Os compostos foram identificados por comparação cromatográfica com padrões e a quantificação foi realizada usando o método do padrão interno. Os resultados foram expressos em g por 100 g de massa seca.

### 2.3.3. Determinação de ácidos gordos

Os ácidos gordos foram determinados por cromatografia gasosa através de um detetor de ionização de chama (GC-FID), de acordo com o procedimento otimizado e implementado no Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada da Escola Superior Agrária de Bragança (Helena et al., 2009), após um processo de transesterificação: os ácidos gordos foram metilados com 5 mL de metanol:ácido sulfúrico:tolueno 2:1:1 (v/v/v), durante pelo menos 12h num banho a 50 °C e a 160 rpm; de seguida, adicionaram-se 3 mL de água desionizada para obter uma separação de fases. Recuperaram-se os FAME adicionando 3 mL de éter dietílico e agitando no vórtex. Fez-se passar o sobrenadante por uma microcoluna com sulfato de sódio anidro, com o objetivo de eliminar a água, e colocou-se a amostra num frasco com Teflon. Antes de injeção, filtrou-se a amostra com um filtro de nylon da Milipore 0,2 µm. O equipamento utilizado foi o GC DANI 1000 com um injetor *split/splitless*, um detetor FID e uma coluna Macherey-Nagel (30 m × 0,32 mm ID × 0,25 µm *df*). A temperatura do FID foi de 260 °C. O programa de temperatura do forno foi o seguinte: a temperatura inicial da coluna foi 50 °C, durante 2 min; em seguida, aumentou-se a temperatura a 30 °C/min até 125 °C, 5 °C/min até 160 °C, 20 °C/min até 180°C, 3 °C/min até 200 °C, 20 °C/min até 220 °C que foi mantida por 15 min. O gás de transporte (hidrogénio) tinha um caudal de 0,4 mL/min (0,61 bar), medido a 50 °C. Utilizou-se um modo de injeção *split* (1:40) a 250 °C. O volume de amostra injetado foi de 1 µL. A identificação dos ácidos gordos foi feita por comparação dos tempos de retenção relativos das amostras com os picos

dos padrões de FAME. Os resultados foram processados usando o software Clarity 4.0.1.7 (DataApex 1.7) e expressos em percentagem relativa de cada ácido gordo.

#### **2.3.4. Determinação de tocoferóis**

A quantidade de tocoferóis presente nas amostras foi determinada seguindo um protocolo previamente otimizado e implementado no Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada da Escola Superior Agrária de Bragança (Heleno et al., 2010). Uma solução de BHT (2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol) em hexano (10 mg/ml; 100 µL) e o padrão interno (PI) de tocol em hexano (50 µg/mL; 250 µL) foram adicionados às amostras liofilizadas antes do procedimento de extração. As amostras, com uma massa aproximada de 500 mg, foram homogeneizadas com 4 mL de metanol num vórtex durante cerca de 1 min. Subsequentemente, adicionou-se 4 mL de hexano e homogeneizou-se novamente no vórtex (durante 1 min). De seguida, adicionou-se 2 mL de solução saturada de NaCl, homogeneizou-se a mistura durante 1 min, centrifugou-se (centrífuga refrigerada Centurion K24OR, 5 min, 6185 rpm) e transferiu-se, cuidadosamente, o sobrenadante para um frasco. A amostra foi extraída mais duas vezes com hexano. Os extratos foram levados à secura utilizando uma corrente de azoto, dissolvidos em 1 mL de *n*-hexano, desidratados com sulfato de sódio anidro, filtrados através de um filtro (0,22 µm), transferidos para frascos âmbar e analisados por HPLC. As análises foram realizadas pelo sistema de HPLC descrito anteriormente, conectado a um detetor de fluorescência (FP-2020; Jasco), programado para excitação a 290 nm e emissão a 330 nm. A separação cromatográfica foi feita com uma coluna de Poliamida II (250 × 4,6 mm) de fase normal (YMC Waters) a 30 °C. A fase móvel era uma mistura de hexano e acetato de etilo (70:30,v/v) com um fluxo de 1 mL/min e volume de amostra injetado foi de 20 µL. Os compostos foram identificados através de comparação cromatográfica com padrões. A quantificação foi baseada na resposta do sinal fluorescente, usando o método do padrão interno. A quantidade de tocoferóis foi expressa em µg por 100 g de massa seca.

#### **2.3.5. Determinação de ácidos orgânicos**

Os ácidos orgânicos foram determinados por cromatografia líquida ultra rápida (UFLC, Shimadzu 20A series, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) acoplado a um detetor de fotodíodos (PDA). Procedeu-se à extração da amostra (1,5 g) com ácido metafosfórico (25 mL, 25 °C, 150 rpm, 45 min) e filtrou-se em papel Whatman nº4.

Imediatamente antes da análise cromatográfica a amostra foi novamente filtrada em filtros de nylon de 0,2  $\mu\text{m}$ . Este procedimento foi otimizado e validado pelo grupo de investigação onde se inseriu este trabalho (Barros et al., 2013). A análise foi realizada num UFLC Shimadzu serie 20A (Shimadzu Coperation). A separação foi conseguida numa coluna C18 Sphereclone (Phenomenex) de fase reversa (5 $\mu\text{m}$ , 250x4,6 mm i.d.), termostaticada a 35 °C. A eluição foi feita com ácido sulfúrico (3,6 mM) com fluxo de 0,8 mL/min. A deteção foi levada a cabo pelo PDA, usando 215 e 245 nm (para o ácido ascórbico) como comprimentos de onda preferenciais. Os ácidos orgânicos foram quantificados por comparação da área dos seus picos registados, com as curvas de calibração obtidas pelos padrões comerciais de cada composto. Os resultados foram expressos em g por 100 g de massa seca.

### **2.3.6. Determinação de ácidos fenólicos e compostos relacionados**

Os ácidos fenólicos foram determinados recorrendo ao equipamento de UFLC supramencionado e ao procedimento de extração e análise de acordo com autores do grupo de investigação onde este trabalho se insere (Reis et al., 2012). A amostra liofilizada (1,5 g) foi extraída com 30 mL de metanol:água (80:20, v/v; 30 mL) a -20°C durante 1,5h. O extrato foi filtrado e o resíduo re-extraído com 30 mL da mesma solução metanol:água. Os extratos combinados foram evaporados a 35°C até remoção completa do metanol. A fase aquosa foi lavada com éter dietílico (2  $\times$  20 mL) e acetato de etilo (2  $\times$  20 mL). Seguidamente foi adicionado sulfato de sódio anidro às fases aquosas combinadas e filtradas por papel de filtro Whatman n°4 e levadas à total evaporação do solvente e redissolução em metanol:água (82:20, v/v), de acordo com o descrito por Barros et al. (2009). Os extratos (1 mL) foram filtrados em discos descartáveis LC de 0,22  $\mu\text{m}$ . A análise foi efetuada no UFLC já mencionado. A eluição utilizada foi: (A) 0,1% de ácido fórmico em água, (B) acetonitrilo. Estabeleceu-se um gradiente de 10% B para 15% B durante 5 min, 15-20% B durante 5 min, 25-35% durante 10 min, 50% de B isocrático durante 10 min, e reequilíbrio da coluna utilizando um fluxo de 0,5 mL/min. A deteção esteve a cabo de um detetor de fotodíodos (PDA), utilizando o comprimento de onda preferencial de 280 nm. Os compostos fenólicos foram caracterizados de acordo com os seus tempos de retenção e UV em comparação com padrões comerciais. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  por g de massa seca.

## **2.4. Bioatividade dos extratos metanólicos das amostras**

### **2.4.1. Preparação dos extratos**

Cada amostra liofilizada (1 g) foi extraída com 40 mL de metanol em agitação durante 1h e seguidamente filtrada através de filtros de papel Whatman N°4. O resíduo foi novamente extraído com 20 mL de metanol durante 1h e filtrado. A combinação dos extratos foi evaporada a 40°C (evaporador rotativo Büchi R-210, Suíça) para remoção total do solvente e redissolução em *a*) metanol para ensaios de atividade antioxidante (20 mg/mL), *b*) solução de DMSO 5% para ensaios de atividade antimicrobiana (100 mg/mL), e *c*) água destilada para ensaios de citotoxicidade numa linha primária de células de fígado de porco (8 mg/mL).

### **2.4.2. Ensaios de atividade antioxidante**

A avaliação da atividade antioxidante das amostras foi realizada por ensaios *in vitro* implementados no Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada da Escola Superior Agrária de Bragança (Reis et al., 2012). Realizaram-se diluições sucessivas a partir da solução mãe (20 mg/mL), de forma a serem testadas diferentes concentrações e determinar valores de EC<sub>50</sub> (concentração de extrato correspondente a 50% de atividade antioxidante ou a 0,5 de absorvância no ensaio de poder redutor), obtidos a partir dos gráficos de percentagem de potencial antioxidante (ensaio de DPPH, β-caroteno/linoleato e TBARS) ou a absorvância a 690 nm (ensaio de Ferricianeto/Azul da Prússia) em função da concentração do extrato. Utilizou-se o trolox como controlo positivo.

### **2.4.3. Ensaio de Folin-Ciocalteu**

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

#### **2.4.4. Ensaio de Ferricianeto/Azul da Prússia**

As soluções dos extratos com diferentes concentrações (0,5 mL) foram misturadas com tampão fosfato de sódio (0,5 mL, 200 mmol/L, pH 6,6) e ferricianeto de potássio (1% m/v, 0,5 mL). A mistura foi incubada a 50 °C durante 20 min e depois adicionou-se ácido tricloroacético (10%, 0,5 mL). De seguida, a mistura (0,8 mL) foi colocada numa microplaca de 48 poços, assim como, a água desionizada (0,8 mL) e o cloreto de ferro (0,1% w/v; 0,16 mL) sendo, posteriormente, medida a absorvância a 690 nm. A leitura da absorvância da solução foi medida recorrendo a um Leitor de microplacas (Bio-Tek ELX800 Instruments, EUA).

#### **2.4.5. Ensaio da atividade captadora de radicais DPPH**

Este ensaio foi realizado no Leitor de microplacas supramencionado. A mistura de reação em cada um dos 96 poços da microplaca consistia em soluções dos extratos com diferentes concentrações (30 µL) e solução metanólica de radicais DPPH (270 µL a uma concentração de  $6 \times 10^{-5}$  mol/L). A mistura permaneceu ao abrigo da luz durante 30 min (até estabilização dos valores de absorvância). A redução do radical DPPH foi avaliada medindo a absorvância a 515 nm. A atividade captadora do radical (ACR) foi calculada pela percentagem de descoloração de DPPH utilizando a seguinte equação:

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

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

#### **2.4.6. Ensaio de inibição de descoloração de $\beta$ -caroteno/linoleato**

A solução de  $\beta$ -caroteno foi preparada por dissolução de  $\beta$ -caroteno (2 mg) em clorofórmio (10 mL). A partir desta solução, pipetaram-se 2 mL para um balão de fundo redondo. Após remoção do clorofórmio da solução de  $\beta$ -caroteno a 40 °C sob vácuo, procedeu-se à adição de ácido linoleico (40 mg), emulsificador Tween 80 (400 mg) e água destilada (100 mL) agitando vigorosamente. Transferiram-se alíquotas (4,8 mL) desta emulsão para diferentes tubos de ensaio contendo soluções dos extratos com diferentes concentrações (0,2 mL). Os tubos foram agitados e incubados num banho a 50 °C. Logo após a adição da emulsão a cada tubo, foi determinado o tempo zero de absorvância (470 nm). Foi preparado um branco, idêntico às amostras mas desprovido

de  $\beta$ -caroteno. A inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$[(A_{470} T_{120}/A_{470} T_0) \times 100], \text{ onde:}$$

$A_{470} T_{120}$  corresponde ao valor de absorvância obtido 2 h após incubação e  $A_{470} T_0$  ao valor de absorvância inicial.

#### **2.4.7. Ensaio de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

O tecido cerebral de porco (obtido de animais abatidos oficialmente) foi dissecado e homogeneizados num tubo de Falcon com solução tampão Tris-HCl (20 mM, pH 7,4), em gelo, para obter um homogeneizado cerebral 1:2 w/v que foi centrifugado a 3000g durante 10 min. Uma alíquota (100  $\mu$ L) do sobrenadante foi levada a incubação com as diferentes concentrações das amostras em solução (200  $\mu$ L) na presença de FeSO<sub>4</sub> (10 mM, 100  $\mu$ L) e ácido ascórbico (0,1 mM, 100  $\mu$ L) à temperatura de 37 °C durante 1 h. A reação foi parada pela adição de ácido tricloroacético (28% w/v, 500  $\mu$ L), seguido de ácido tiobarbitúrico (TBA, 2%, w/v, 380  $\mu$ L), e a mistura foi aquecida a 80 °C durante 20 min. A remoção das proteínas precipitadas foi efetuada por centrifugação a 3000g durante 10 min e, a intensidade da cor do sobrenadante formada pelo complexo malondialdeído (MDA)-TBA foi determinada pela sua absorvância a 532 nm. O rácio de inibição (%) foi calculado recorrendo à seguinte fórmula:

$$\text{Rácio de inibição (\%)} = [(A-B)/A] \times 100\%, \text{ em que:}$$

A e B correspondem à absorvância do controlo e da amostra em solução, respetivamente.

#### **2.4.8. Ensaios de atividade antibacteriana**

Para estes ensaios utilizaram-se bactérias Gram negativo: *Escherichia coli* (ATCC 35210), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Enterobacter cloacae* (ATCC 35030), e bactérias Gram positivo: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus cereus* (clinical isolate), *Micrococcus flavus* (ATCC 10240), e *Listeria monocytogenes* (NCTC 7973). Os microrganismos obtiveram-se no laboratório de Micologia, Departamento de Fisiologia de Plantas,

Instituto de Investigação Biológica “Siniša Stanković”, Universidade de Belgrado, Sérvia.

As concentrações mínimas inibitórias do crescimento (MIC) e bactericidas (MBC) foram determinadas pelo método de microdiluição (Espinel-Ingroff, 2001). Utilizou-se uma cultura de bactérias fresca (obtida por incubação durante a noite) que foi ajustada no espectrofotómetro para uma concentração de  $1 \times 10^5$  UFC/mL. Esta UFC/mL requerida corresponde a uma suspensão determinada espectrofotometricamente a 625 nm (OD625). As diluições do inóculo foram submetidas a cultura em meio sólido para verificar a ausência de contaminação e a viabilidade do inóculo. Diferentes diluições do extrato metanólico foram efetuadas em poços de microplacas contendo 100  $\mu$ L de *Tryptic Soy Broth* (TSB) e depois, foi adicionado 10  $\mu$ L de inóculo a cada poço. As microplacas incubaram durante 24 h a 37 °C. Os valores de MIC das amostras foram detetados pela adição de 40  $\mu$ L de cloreto de iodonitrotetrazólio (INT) (0,2 mg/mL) e incubação a 37 °C durante 30 min. A concentração mais baixa que produziu uma inibição significativa (cerca de 50%) do crescimento bacteriano em comparação com o controlo positivo foi definida como MIC. As concentrações mínimas inibitórias (MICs) obtidas no teste de suscetibilidade às várias bactérias face aos extratos foram determinadas também por um ensaio colorimétrico que avalia viabilidade microbiana que se baseia na redução da cor do INT e comparação com o controlo positivo de cada estirpe bacteriana (CSLI, 2006; Tsukatani et al., 2012). Os valores de MBC (concentração mínima bactericida) foram determinado por subcultura de 10  $\mu$ L em microplacas que continham 100  $\mu$ L de TSB. A concentração mais baixa que demonstrou o não crescimento depois desta subcultura foi considerada a MBC. A estreptomicina e a ampicilina foram utilizadas como controlos positivos. O controlo negativo foi DMSO 5%.

#### **2.4.9. Ensaio de atividade antifúngica**

Para os bioensaios antifúngicos, foram utilizados os seguintes microfungos: *Aspergillus ochraceus* (ATCC 12066), *Aspergillus versicolor* (ATCC 11730), *Aspergillus niger* (ATCC 6275), *Trichoderma viride* (IAM 5061), *Penicillium funiculosum* (ATCC 36839), *Penicillium aurantiogriseum* (isolado de alimentos). Os organismos foram obtidos do Laboratório de Micologia, Departamento de Fisiologia de Plantas, Instituto de Pesquisa Biológica “Siniša Stanković”, Belgrado, Sérvia. As

micromicetas foram mantidas em agar malte (MA) e as culturas foram armazenadas a 4 °C e sub-cultivadas mensalmente (Booth, 1971).

Os esporos fúngicos foram lavados da superfície das placas de agar com solução salina (0,85%) estéril contendo Tween 80 (v/v). A suspensão dos esporos foi ajustada com solução salina estéril para uma concentração aproximada de  $1.0 \times 10^5$  num volume final de 100 µL/poço. O inóculo foi guardado a 4 °C para utilização posterior. As diluições do inóculo foram submetidas a cultura em MA sólido para verificar a ausência de contaminação e verificar a viabilidade do inóculo.

A determinação das MICs foi realizada pela técnica de diluições em placa utilizando microplacas de 96 poços. Os extratos em estudo foram dissolvidos em DMSO 5% e adicionados ao meio de caldo de malte com inóculo fúngico. As microplacas incubaram 72 h a 28 °C. As MIC foram definidas pelas concentrações mais baixas em que se verificou crescimento (ao microscópio binocular). As concentrações mínimas fungicidas (MFCs) foram determinadas por subculturas em série de 2 µL em microplacas que continham 100 µL de caldo de malte por poço e posterior incubação durante 72h a 28 °C. As MFC foram definidas pelas concentrações mais baixas em que se verificou crescimento, indicando a morte de 99,5% do inóculo inicial. O DMSO 5% foi utilizado como controlo negativo, enquanto o bifonazol e o cetoconazol foram usados como controlos positivos.

#### **2.4.10. Ensaios de citotoxicidade em células de fígado**

A cultura de células foi preparada a partir de um fígado de porco recém-colhido obtido num matadouro local. Esta foi designada por PLP2. Os tecidos do fígado foram lavados em solução salina de Hank contendo 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina e divididos em explantes de  $1 \times 1 \text{ mm}^3$ . Alguns destes explantes foram colocados em frascos de tecidos de 25 cm<sup>2</sup> com suplementação DMEM com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de aminoácidos não essenciais, 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina, seguindo-se uma incubação a 37 °C com atmosfera húmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O meio foi mudado a cada 2 dias. A cultura das células foi continuada com monitorização direta a cada 2-3 dias utilizando um microscópio de contraste de fase (Icon Eclipse Ts 100). Depois da confluência, as células foram transferidas para uma placa de 96 poços com uma densidade de  $1,0 \times 10^4$  células/poço, e colocadas em cultura em meio DMEM com 10% de SFB (sulforrodamina B), 100 U/mL

de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Abreu et al., 2011). Para tal, retirou-se o meio de cultura da caixa de cultura com as células PLP2. Adicionou-se o meio de lavagem (HBSS, 2 mL) e, após a sua remoção, adicionou-se tripsina (1,5 mL). A caixa de cultura foi colocada na incubadora durante 3 min para desagregação das células. Adicionou-se rapidamente meio de cultura (3 mL) para inativar a tripsina. Pipetou-se a suspensão celular para um tubo de falcon estéril para centrifugar a 1200 rpm durante 5 min. Retiraram-se 50 µL de suspensão e adicionaram-se 50 µL de solução de azul tripano para contagem do número de células numa câmara de Neubauer. Seguidamente, adicionaram-se 5 diluições das amostras (10 µL) em cada poço, juntamente com o volume de células calculado para a densidade pretendida. Perfez-se o volume de cada poço com meio de cultura. As microplacas foram seladas e guardadas na incubadora durante 48 h até ao teste da SRB. Neste teste, adicionou-se a cada poço ácido tricloroacético frio (TCA, 10%; 100 µL), incubando-se de seguida durante 60 min a 4 °C. As microplacas foram lavadas com água destilada e secas. A solução de SRB (0,1 em 1% ácido acético; 100 µL) foi adicionada a cada poço. A placa incubou à temperatura ambiente durante 30 min. Seguidamente, lavou-se a placa com ácido acético (1%) para remover o excesso de SRB e secou-se. A SRB foi solubilizada com 10 mM de Tris (200 µL, pH 7,4) num agitador de microplacas (Stat Fax-2100). A absorvância foi medida a 540 nm no leitor de microplacas referido anteriormente. Os resultados foram expressos em valores de GI<sub>50</sub> (concentração de amostra que inibe 50% do crescimento celular). O controlo positivo utilizado foi a elipticina. Todas as experiências foram realizadas em ambiente asséptico numa câmara de fluxo laminar vertical (TLStar, AV-30/70).

## 2.5. Análises estatísticas

Foram utilizadas três amostras de cada espécie e todos os ensaios foram realizados em triplicado. Os resultados foram expressos em valor médio e desvio padrão (DP) e analisados recorrendo a um teste *t*-student porque havia menos de três grupos de resultados, com  $\alpha=0,05$ . No caso da atividade antimicrobiana, os resultados foram analisados recorrendo a análises de variâncias (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey's HSD com  $\alpha=0,05$ . Este tratamento estatístico foi realizado pelo programa SPSS v. 22.0.

Apenas os resultados de *L. candidus* não estiveram sujeitos a análise estatística uma vez que esta espécie foi estudada isoladamente.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Nutrientes, não nutrientes e bioatividade de *Morchella conica* silvestre de diferentes origens

A composição nutricional das amostras de *M. conica* está representada na **Tabela 1**. Não se verificaram diferenças significativas no que concerne ao teor em gordura. A amostra Sérvia demonstrou valores mais elevados de proteínas (10,08 g/100 g dw) e hidratos de carbono (80,54 g/100 g dw). No entanto, a amostra Portuguesa apresentou maior teor em cinzas (14,62 g/ 100 g dw). A contribuição energética da amostra sérvia foi também superior (386,51 g/100 g dw).

Em relação à composição em açúcares livres, a frutose foi detetada em ambas as amostras e na mesma concentração (0,21 g/100 g dw, **Tabela 1**). O manitol e a trealose, que também são bastante comuns em cogumelos, foram detetados em ambas as amostras (3,30-4,99 g/100 g dw, **Figura 9A**), sendo a amostra Sérvia a que revelou o maior conteúdo total de açúcares livres (9,53 g/100 g dw). O manitol, um álcool derivado de açúcar, tem metade das calorias de um açúcar e apresenta metade da doçura, e como é pouco absorvido pelo organismo, não eleva os níveis de insulina tanto como o açúcar e também não promove a cárie dentária. Este açúcar é também importante no suporte e expansão do corpo de frutificação (Dikeman et al., 2005).

Os ácidos gordos quantificados em maior quantidade em *M. conica* (**Tabela 1**) foram o ácido palmítico (C16:0), o ácido esteárico (C18:0), o ácido oleico (C18:1n9) e o ácido linoleico (C18:2n6), estando os ácidos gordos saturados (SFA, ácidos palmítico e esteárico) presentes em menores quantidades (1,50 - 10,84%). O ácido oleico (MUFA) foi encontrado em maiores percentagens na amostra portuguesa (20,49%), enquanto que o ácido linoleico (PUFA) foi o ácido gordo maioritário em ambas as amostras (63,26 - 67,10%). A amostra Portuguesa foi rica em SFA (14,44%) e MUFA (21,48), no entanto foi a amostra Sérvia que apresentou maior teor em PUFA (67,49%). Os PUFA, especialmente a família de ácidos gordos n-3, alegadamente exercem um efeito protetor contra o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e inflamatórias (Fürst & Kuhn, 2000; Fang et al., 2002). Em particular, o ácido linoleico desempenha um papel

importante na prevenção de doenças cardiovasculares em adultos, no desenvolvimento do cérebro e da retina em lactantes (Simopoulos, 1991; Senter et al., 1994; Künsch et al., 1999) e na prevenção de danos no ADN (Kok et al., 2003).

**Tabela 1.** Macronutrientes, açúcares livres, ácidos gordos e tocoferóis dos corpos de frutificação de *M. conica* expressos em massa seca (média  $\pm$  DP).

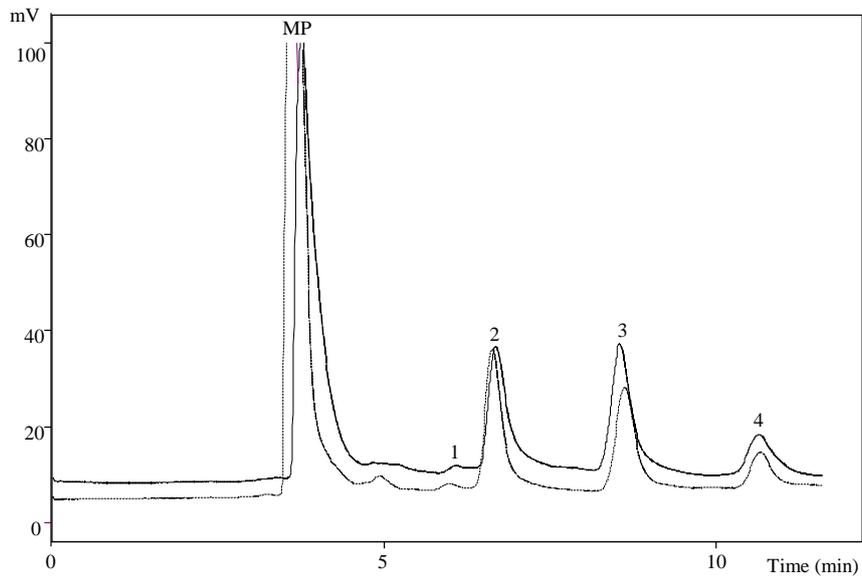
	<i>Morchella conica</i> (Portugal)	<i>Morchella conica</i> (Sérvia)	Valor de <i>p</i> <i>t</i> -Student
Lípidos (g/100 g)	2,81 $\pm$ 0,02	2,67 $\pm$ 0,10	0,025
Proteínas (g/100 g)	7,53 $\pm$ 0,45	10,08 $\pm$ 0,28	0,001
Cinzas (g/100 g)	14,62 $\pm$ 0,37	6,71 $\pm$ 0,40	<0,001
Hidratos de carbono (g/100 g)	75,04 $\pm$ 0,36	80,54 $\pm$ 0,26	<0,001
Energia (kcal/100 g)	355,58 $\pm$ 1,14	386,51 $\pm$ 1,47	<0,001
Frutose (g/100 g)	0,21 $\pm$ 0,02	0,21 $\pm$ 0,04	0,864
Manitol (g/100 g)	3,30 $\pm$ 0,32	4,45 $\pm$ 0,05	0,001
Trealose (g/100 g)	4,99 $\pm$ 0,26	4,87 $\pm$ 0,01	0,315
Açúcares totais (g/100 g)	8,50 $\pm$ 0,55	9,53 $\pm$ 0,02	0,022
C16:0	10,84 $\pm$ 1,30	10,30 $\pm$ 0,17	0,370
C18:0	2,39 $\pm$ 0,20	1,50 $\pm$ 0,02	<0,001
C18:1n9	20,49 $\pm$ 2,22	18,87 $\pm$ 0,10	0,150
C18:2n6	63,26 $\pm$ 3,96	67,10 $\pm$ 0,23	0,077
SFA (percentagem relativa)	14,44 $\pm$ 1,59	12,66 $\pm$ 0,17	0,053
MUFA (percentagem relativa)	21,48 $\pm$ 2,20	19,85 $\pm$ 0,07	0,145
PUFA (percentagem relativa)	64,09 $\pm$ 3,79	67,49 $\pm$ 0,24	0,093
$\alpha$ -Tocoferol ( $\mu$ g/100 g)	6,19 $\pm$ 1,69	1,39 $\pm$ 0,20	<0,001
$\beta$ -Tocoferol ( $\mu$ g/100 g)	19,97 $\pm$ 1,67	nd	-
$\gamma$ -Tocoferol ( $\mu$ g/100 g)	nd	nd	-
$\delta$ -Tocoferol ( $\mu$ g/100 g)	nd	3,88 $\pm$ 0,50	-
Tocoferóis totais ( $\mu$ g/100 g)	26,16 $\pm$ 3,36	5,27 $\pm$ 0,70	<0,001

nd- não detetado.

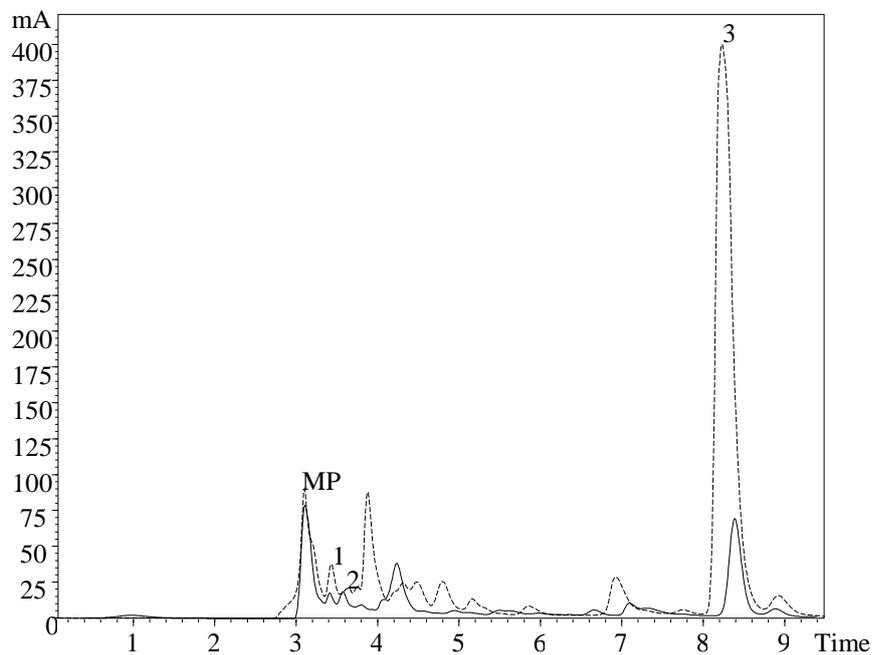
A isoforma  $\alpha$ -tocoferol foi detetada em ambas as amostras estando presente em maior quantidade na Portuguesa (6,19  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ; **Tabela 1**). Por outro lado, o  $\beta$ -tocoferol esteve apenas presente na amostra Portuguesa (19,97  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) e o  $\delta$ -tocoferol apenas na amostra da Sérvia (3,88  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ). A amostra Portuguesa foi a que revelou o maior teor total em tocoferóis (26,16  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ). A vitamina E é encontrada em grande quantidade nos lípidos, e algumas evidências sugerem que esta vitamina previne ou minimiza o dano causado pelos radicais livres associados a algumas doenças específicas, tais como o cancro, artrite, cataratas e envelhecimento (Morrissey et al., 1994; Heinonen et al., 1998). Evidências recentes sugerem que a vitamina E reduz a doença de Alzheimer e a demência (Devore et al., 2010; Mangialasche et al., 2010) e que possui ação neuroprotetora contra a neurotoxicidade periférica provocada pela cisplatina (Pace et al., 2010). A vitamina E tem a capacidade de prevenir a propagação de reações em cadeia induzidas pelos radicais livres nas membranas biológicas (Traber & Packer, 1995).

Relativamente ao perfil em ácidos orgânicos de *M. conica*, foi possível quantificar três compostos distintos (**Tabela 2**), nomeadamente os ácidos oxálico, quínico e fumárico (**Figura 9B**). A espécie silvestre proveniente de Portugal foi a que revelou a maior concentração em ácidos oxálico e fumárico (0,19 g/100 g e 0,56 g/100 g, respetivamente), enquanto a amostra Sérvia apresentou mais ácido quínico (0,88 g/100 g). A amostra Portuguesa demonstrou maior conteúdo total de ácidos orgânicos (1,56 g/100 g). No que concerne aos ácidos fenólicos, as amostras estudadas revelaram a presença dos ácidos gálico, protocatéquico, *p*-hidroxibenzóico e *p*-cumárico, e também o composto relacionado ácido cinâmico (**Tabela 2**). Os ácidos gálico e *p*-hidroxibenzóico apenas estiveram presentes na amostra silvestre Sérvia (1,83 mg/100 g e 55,17 g/100 g, respetivamente). Os ácidos protocatéquico e *p*-cumárico foram encontrados em maiores concentrações na amostra Portuguesa (20,82 mg/100 g e 2,48 g/100 g, respetivamente). O composto relacionado ácido cinâmico apenas foi encontrado na amostra Sérvia (12,89 mg/100 g). Puttaraju et al. (2006) não encontraram os ácidos *p*-hidroxibenzóico e cinâmico numa amostra da Índia, mas o grupo de investigação encontrou outros seis compostos: ácido tânico, gentísico, vanílico, siríngico e ferúlico. Analisando estes resultados podemos concluir que a amostra silvestre da Sérvia foi mais rica em ácidos fenólicos (64,11 mg/100 g) quando comparada com a Portuguesa (23,30 mg/100 g). Os compostos fenólicos,

nomeadamente os ácidos fenólicos, estão entre as substâncias bioativas mais potentes e úteis terapêuticamente, proporcionando benefícios para a saúde associados à redução do risco de doenças crónicas e degenerativas (Luximon-Ramma et al., 2003, 2005; Soobrattee et al., 2005).



**A**



**B**

**Figura 9.** Perfil individual de açúcares de *M. conica* de Portugal (----) e da Sérvia (—) (A): 1- frutose, 2- manitol, 3- trealose, 4- rafinose (PI); e (B) ácidos orgânicos: 1- ácido oxálico, 2- ácido quínico, 3- ácido fumárico. MP- fase móvel.

**Tabela 2.** Ácidos orgânicos e compostos fenólicos dos corpos de frutificação de *M. conica* expressos em massa seca (média  $\pm$  DP).

	<i>Morchella conica</i> (Portugal)	<i>Morchella conica</i> (Sérvia)	Valor de <i>p</i> <i>t</i> -Student
Ácido oxálico (g/100 g)	0,19 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01	<0,001
Ácido quínico (g/100 g)	0,81 $\pm$ 0,03	0,88 $\pm$ 0,03	0,017
Ácido fumárico g/100 g)	0,56 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01	<0,001
Ácidos orgânicos totais (g/100 g)	1,56 $\pm$ 0,03	1,04 $\pm$ 0,05	<0,001
Ácido gálico ( $\mu$ g/100g )	nd	1,83 $\pm$ 0,00	-
Ácido protocatéquico ( $\mu$ g/100 g)	20,82 $\pm$ 0,09	4,96 $\pm$ 0,02	<0,001
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico ( $\mu$ g/100 g)	nd	55,17 $\pm$ 0,35	-
Ácido <i>p</i> -Coumárico	2,48 $\pm$ 0,01	2,15 $\pm$ 0,00	0,001
Ácidos fenólicos totais ( $\mu$ g/100 g)	23,30 $\pm$ 0,05	64,11 $\pm$ 0,34	<0,001
Ácido cinâmico ( $\mu$ g/100 g)	nd	12,89 $\pm$ 0,11	-

nd- não detetado.

Analisando os resultados do potencial antioxidante (**Tabela 3**), as amostras de *M. conica* (extratos metanólicos) de Portugal revelaram maior poder redutor avaliado através dos ensaios de *Folin-Ciocalteu* (32,84 mg EAG/g extrato) e Ferricianeto/Azul da Prússia ( $EC_{50}=1,16\pm 0,01$  mg/mL). O conteúdo em fenóis totais, determinado pelo ensaio de *Folin-Ciocalteu*, foi diferente de outros resultados em amostras provenientes da Turquia (25,38  $\mu$ g EAG/mg extrato - Gursoy et al., 2009 e 20,64 mg EAG/g extrato - Ozturk et al., 2010). Ambos os extratos das amostras da Turquia tiveram menores quantidades em fenóis totais quando comparados com as amostras silvestres de Portugal e da Sérvia. No entanto, Turkoglu et al. (2006) descreveram uma quantidade total de fenóis em *M. conica* de 41,93  $\mu$ g/mg de equivalentes de pirocatecol em extratos etanólicos. Na Índia, Puttaraju et al. (2006), também estudaram extratos aquosos e metanólicos. Nesse estudo, os autores descrevem o poder redutor avaliado pelo ensaio Ferricianeto/Azul da Prússia (16,9 $\pm$ 0,01 mg/g extrato aquoso e 4,6 $\pm$ 0,01 mg/g extrato metanólico) e pelo ensaio Folin-Ciocalteu (3,90 $\pm$ 0,25 mg de EAG/g de amostra em extrato aquoso e 8,62 $\pm$ 0,38 mg de EAG/g extrato metanólico). Gursoy et al. (2009), estudaram o poder redutor de extratos metanólicos apresentando a absorvância a 700 nm. A amostra portuguesa também revelou uma elevada atividade captadora de radicais, uma vez que apresenta menores valores de  $EC_{50}$  no ensaio de DPPH ( $EC_{50}=3,56\pm 0,09$  mg/mL). Esta atividade foi também anteriormente reportada por Turkoglu et al. (2006)

em extratos etanólicos ( $EC_{50}=267 \mu\text{g/mL}$ ) e Puttaraju et al. (2006), em extratos aquosos e metanólicos ( $EC_{50}=5,00\pm 0,31$  e  $1,60\pm 0,33 \text{ mg/mL}$ , respectivamente) obtidos de amostras da Índia. Além disso, Gursoy et al. (2009) descreveram 43,27% de inibição de radicais DPPH pelo extrato com  $2,0 \text{ mg/mL}$ , enquanto Ozturk et al. (2010) reportaram 43,72% de inibição pelo extrato etanólico a  $20 \text{ mg/mL}$ . Assim, as amostras indianas (Puttaraju et al., 2006) demonstraram maior atividade do que as amostras aqui estudadas ( $EC_{50}=3,56\pm 0,09$  e  $9,28\pm 1,78 \text{ mg/mL}$ , amostra Portuguesa e Sérvia, respectivamente). No entanto, a amostra da Turquia (Turkoglu et al., 2006) exibiu a maior atividade antioxidante de todas. A amostra Sérvia mostrou a maior inibição da peroxidação lipídica, uma vez que apresentou o menor valor de  $EC_{50}$  para os ensaios de  $\beta$ -caroteno/linoleato e TBARS ( $EC_{50}=0,77\pm 0,10$  e  $0,34\pm 0,09 \text{ mg/mL}$ , respectivamente). Turkoglu et al (2006), demonstraram que aproximadamente  $40 \mu\text{g/mL}$  inibiam 50% da oxidação no ensaio de  $\beta$ -caroteno/linoleato. Puttaraju et al (2006) também realizaram um estudo de inibição lipídica com o ensaio de TBARS. Gursoy et al. (2009) revelaram que  $0,5 \text{ mg/mL}$  de extrato de *M. conica* inibia 82,38% de peroxidação lipídica através do método de  $\beta$ -caroteno-linoleato-ácido. Comparando os resultados dos autores citados, verificamos que as amostras do presente estudo revelam menor inibição de peroxidação lipídica.

Os extratos metanólicos Portugueses e da Sérvia das amostras silvestres de *M. conica* apresentaram atividade antibacteriana contra todas as bactérias testadas (**Tabela 4**). Ambos os extratos revelaram maior potencial contra *Bacillus cereus* (MIC -  $0,70$  e  $0,95 \text{ mg/mL}$ ; MBC -  $0,95$  e  $1,87 \text{ mg/mL}$ ); a amostra Portuguesa apresentou os mesmos resultados de MIC e MBC contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium*. Os resultados com menor atividade antibacteriana para ambas amostras foram obtidos contra *Escherichia coli* e *Enterobacter cloacae* (MIC -  $5,62$  e  $7,5 \text{ mg/mL}$ ; MBC -  $7,5$  e  $15,0 \text{ mg/mL}$ ); a amostra da Sérvia apresentou também os mesmos resultados contra *Micrococcus flavus*. O extrato metanólico obtido da amostra Portuguesa (MIC -  $0,70$ - $5,62 \text{ mg/mL}$ ; MBC -  $0,95$ - $7,5 \text{ mg/mL}$ ), demonstrou no geral, maior potencial antibacteriano relativamente ao extrato da Sérvia (MIC -  $0,95$ - $7,5 \text{ mg/mL}$ ; MBC -  $1,87$ - $15,0 \text{ mg/mL}$ ). Os dois extratos possuem a mesma atividade contra *Listeria monocytogenes* (MIC -  $3,75 \text{ mg/mL}$ ; MBC -  $7,5 \text{ mg/mL}$ ). No caso de *Pseudomonas aeruginosa*, a amostra Portuguesa apresentou maior atividade quando comparada com o antibiótico comercial ampicilina (MBC -  $0,95$  e  $1,24 \text{ mg/mL}$ , respectivamente).

**Tabela 3.** Atividade antioxidante dos extratos metanólicos de *M. conica* (média  $\pm$  DP).

	Ensaio	<i>Morchella conica</i> (Portugal)	<i>Morchella conica</i> (Sérvia)	Valor de <i>p</i> <i>t</i> -Student
Poder redutor	<i>Folin-ciocalteu</i> (mg EAG/g extrato)	32,84 $\pm$ 1,13	26,38 $\pm$ 0,39	<0,001
	Ferricianeto/Azul da Prússia (EC <sub>50</sub> ; mg/mL)	1,16 $\pm$ 0,01	1,88 $\pm$ 0,06	<0,001
Atividade captadora de radicais	Atividade captadora DPPH (EC <sub>50</sub> ; mg/mL)	3,56 $\pm$ 0,09	9,28 $\pm$ 1,78	<0,001
Inibição da peroxidação lipídica	$\beta$ -caroteno/linoleato (EC <sub>50</sub> ; mg/mL)	2,47 $\pm$ 0,42	0,77 $\pm$ 0,10	<0,001
	TBARS (EC <sub>50</sub> ; mg/mL)	0,55 $\pm$ 0,03	0,34 $\pm$ 0,09	<0,001

Relativamente à atividade antifúngica (**Tabela 4**), o maior potencial foi relativo a *Trichoderma viride* (MIC – 0,78-1,56 mg/mL; MFC – 1,56-3,12 mg/mL). A menor atividade antifúngica foi obtida contra *Aspergillus fumigatus* (MIC – 6,25-12,5 mg/mL e MFC – 6,25-0,20 mg/mL), *Penicillium aurantiogriseum* (MIC – 6,25-12,5 mg/mL e MFC – 12,5-25,0 mg/mL), e *Aspergillus ochraceus* (MIC – 3,12-12,5 mg/mL e MFC – 6,25-12,5 mg/mL) com as amostras Portuguesa e Sérvia, respetivamente. A amostra de Portugal foi a que no geral apresentou maior atividade antifúngica. Além do mais, esta amostra demonstrou ser mais eficiente contra *Trichoderma viride* do que o cetoconazol (comparação de MICs). Existem poucos estudos relativos à atividade antimicrobiana da *M. conica*, e todos foram realizados usando o método de difusão em agar. Turkoglu et al. (2006), descreveram que não existiu inibição do extrato etanólico contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Ozturk et al. (2010) também estudaram a inibição de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus*, sem obter resultados positivos com os extratos etanólicos de *M. conica*. As nossas amostras apresentaram atividade contra as três espécies.

Como os extratos metanólicos demonstraram atividade antioxidante e antimicrobiana, foi importante garantir a ausência de citotoxicidade contra as células do fígado, que são consideradas o melhor modelo *in vitro* para estudos de citotoxicidade humana. O estudo não revelou toxicidade nas culturas primárias de fígado PLP2, uma

vez que os valores de  $GI_{50}$  obtidos ( $> 400 \mu\text{g/mL}$ ) foram maiores que a maior concentração testada. O controlo positivo de elipticina apresentou um  $GI_{50}=2,06 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$ .

**Tabela 4.** Atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos metanólicos de *M. conica* e de antibióticos de referência (mg/mL) (média ± DP).

Bactéria	<i>Morchella conica</i> (Portugal) MIC/MBC	<i>Morchella conica</i> (Sérvia) MIC/MBC	Estreptomicina MIC/MBC	Ampicilina MIC/MBC
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,87±0,04 <sup>c</sup> /3,75±0,02 <sup>b</sup>	3,75±0,08 <sup>d</sup> /7,50±0,07 <sup>c</sup>	0,04±0,00 <sup>a</sup> /0,09±0,03 <sup>a</sup>	0,25±0,02 <sup>b</sup> /0,37±0,01 <sup>a</sup>
<i>Bacillus cereus</i>	0,70±0,02 <sup>c</sup> /0,95±0,02 <sup>c</sup>	0,95±0,03 <sup>d</sup> /1,87±0,02 <sup>d</sup>	0,09±0,003 <sup>a</sup> /0,17±0,00 <sup>a</sup>	0,25±0,02 <sup>b</sup> /0,37±0,01 <sup>b</sup>
<i>Micrococcus flavus</i>	1,87±0,04 <sup>b</sup> /3,75±0,05 <sup>b</sup>	7,5±0,10 <sup>c</sup> /15,0±0,0 <sup>c</sup>	0,17±0,01 <sup>a</sup> /0,34±0,01 <sup>a</sup>	0,25±0,00 <sup>a</sup> /0,37±0,01 <sup>a</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i>	3,75±0,08 <sup>c</sup> /7,5±0,02 <sup>b</sup>	3,75±0,05 <sup>c</sup> /7,50±0,01 <sup>b</sup>	0,17±0,007 <sup>a</sup> /0,34±0,00 <sup>a</sup>	0,37±0,007 <sup>b</sup> /0,49±0,01 <sup>a</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,70±0,02 <sup>b</sup> /0,95±0,02 <sup>b</sup>	7,5±0,007 <sup>c</sup> /15,0±0,00 <sup>d</sup>	0,17±0,01 <sup>a</sup> /0,34±0,01 <sup>a</sup>	0,74±0,003 <sup>b</sup> /1,24±0,09 <sup>c</sup>
<i>Salmonella typhimurium</i>	0,70±0,07 <sup>c</sup> /0,95±0,02 <sup>b</sup>	3,75±0,08 <sup>d</sup> 7,50±0,10 <sup>c</sup>	0,17±0,007 <sup>a</sup> /0,34±0,007 <sup>a</sup>	0,37±0,00 <sup>b</sup> / 0,49±0,01 <sup>a</sup>
<i>Escherichia coli</i>	5,62±0,10 <sup>b</sup> /7,50±0,10 <sup>b</sup>	7,5±0,10 <sup>c</sup> /15,0±0,20 <sup>c</sup>	0,17±0,01 <sup>a</sup> /0,34±0,01 <sup>a</sup>	0,25±0,01 <sup>a</sup> /0,49±0,02 <sup>a</sup>
<i>Enterobacter cloacae</i>	5,62±0,10 <sup>b</sup> /7,50±0,10 <sup>b</sup>	7,5±0,00 <sup>c</sup> /15,0±0,20 <sup>c</sup>	0,26±0,02 <sup>a</sup> /0,52±0,00 <sup>a</sup>	0,37±0,01 <sup>a</sup> /0,74±0,02 <sup>a</sup>
Fungo	<i>Morchella conica</i> (Portugal) MIC/MFC	<i>Morchella conica</i> (Sérvia) MIC/MFC	Bifonazole MIC/MBC	Cetoconazole MIC/MBC
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	6,25±0,02 <sup>b</sup> /12,5±0,20 <sup>b</sup>	12,5/±0,20 <sup>c</sup> /25,00±0,30 <sup>c</sup>	0,15±0,02 <sup>a</sup> /0,20±0,00 <sup>a</sup>	0,20±0,00 <sup>a</sup> /0,50±0,02 <sup>a</sup>
<i>Aspergillus versicolor</i>	6,25±0,08 <sup>b</sup> /6,25±0,08 <sup>b</sup>	12,5±0,20 <sup>c</sup> /12,5±0,20 <sup>c</sup>	0,10±0,00 <sup>a</sup> /0,20±0,00 <sup>a</sup>	0,20±0,02 <sup>a</sup> /0,50±0,02 <sup>a</sup>
<i>Aspergillus ochraceus</i>	3,12±0,04 <sup>c</sup> /6,25±0,08 <sup>c</sup>	12,5±0,20 <sup>d</sup> /12,5±0,00 <sup>d</sup>	0,15±0,02 <sup>a</sup> /0,20±0,02 <sup>a</sup>	1,50±0,00 <sup>b</sup> /2,00±0,10 <sup>b</sup>
<i>Aspergillus niger</i>	1,56±0,01 <sup>b</sup> /3,12±0,04 <sup>c</sup>	6,25±0,08 <sup>c</sup> /6,25±0,08 <sup>d</sup>	0,15±0,00 <sup>a</sup> /0,20±0,00 <sup>a</sup>	0,20±0,01 <sup>a</sup> /0,50±0,02 <sup>b</sup>
<i>Trichoderma viride</i>	0,78±0,007 <sup>b</sup> /1,56±0,00 <sup>c</sup>	1,56±0,05 <sup>d</sup> /3,12±0,04 <sup>d</sup>	0,15±0,00 <sup>a</sup> /0,20±0,01 <sup>a</sup>	1,00±0,10 <sup>c</sup> /1,00±0,10 <sup>b</sup>

MIC- Concentração mínima inibitória do crescimento; MBC- Concentração mínima bactericida; MFC- Concentração mínima fungicida. Em cada linha, diferentes letras indicam diferenças significativas  $p<0,05$ ).

### **3.2. Expansão do conhecimento do género *Lactarius* relativamente à composição química e atividade antioxidante**

A composição em macronutrientes dos corpos frutíferos de *L. citriolens* e *L. turpis* encontram-se apresentados na **Tabela 5**. *L. turpis* demonstrou valores mais altos de proteínas (13,06 g/100 g dw), cinzas (7,21 g/100 g dw) e hidratos de carbono (77,68 g/100 g dw), contudo, a contribuição energética de *L. citriolens* foi superior (398,89 kcal/100 g dw), devido ao seu elevado conteúdo em gorduras (5,37 g/100 g dw). Foi possível encontrar informação de outras espécies do mesmo género, nomeadamente *L. deliciosus* (Barros et al, 2007e, Barros et al., 2007d, Barros et al., 2007a; Yin & Zhou, 2008; Egwim et al., 2011; Akata et al., 2012; Faravin et al., 2013; Fernandes et al., 2013; Kalogeropoulos et al., 2013), *L. hatsudake* (Yin & Zhou, 2008), *L. piperatus* (Barros et al, 2007e), *L. quieticolor* (Agrahar-Murugkar & Subbulakshmi, 2005), *L. salmonicolor* (Heleno et al., 2009; Akata et al., 2012), *L. sanguifluus* (Kavishree et al., 2008; Kalogeropoulos et al., 2013), *L. semisanguifluus* (Kalogeropoulos et al., 2013) e *L. volemus* (Yin & Zhou, 2008). Todas as espécies apresentaram hidratos de carbono e proteínas como macronutrientes maioritários, e algumas delas com contribuições energéticas semelhantes (317,05 – 389 kcal/100 g dw) (Heleno et al., 2009; Fernandes et al., 2013).

Através da observação do perfil em macronutrientes do género, pode concluir-se que duas das espécies estudadas têm características semelhantes a espécies comestíveis. No entanto, existem relatos da presença de necatorina, um composto altamente mutagénico em *L. turpis* (Suortti et al., 1983; Suortti, 1984) e a possibilidade de envenenamento, manifestado por problemas gastrointestinais (Mishra, 2005). Por esse motivo, *L. turpis* é considerado não comestível (Phillips, 2006). Relativamente a *L. citriolens*, como raramente é encontrado, este deverá ser consumido com precaução (Phillips, 2006).

**Tabela 5.** Macronutrientes, açúcares livres, ácidos gordos e tocoferóis dos corpos de frutificação de *L. citriolens* e *L. turpis* expressos em massa seca (média ± DP).

	<i>Lactarius citriolens</i>	<i>Lactarius turpis</i>	Valor de <i>p</i> <i>t</i> -Student
Lípidos (g/100 g)	5,37 ± 0,30	2,06 ± 0,27	<0,001
Proteínas (g/100 g)	10,89 ± 0,33	13,06 ± 0,29	<0,001
Cinzas (g/100 g)	6,99 ± 0,23	7,21 ± 0,12	0,109
Hidratos de carbono (g/100 g)	76,76 ± 0,35	77,68 ± 0,35	0,033
Energia (kcal/100 g)	398,89 ± 1,74	381,47 ± 1,29	<0,001
Manitol (g/100 g)	8,31 ± 0,30	19,21 ± 0,45	<0,001
Trealose (g/100 g)	0,45 ± 0,01	0,33 ± 0,03	<0,001
Açúcares totais (g/100 g)	8,76 ± 0,29	19,54 ± 0,47	<0,001
C16:0	5,35 ± 0,01	8,02 ± 0,09	<0,001
C18:0	40,58 ± 0,41	12,60 ± 0,83	<0,001
C18:1n9	25,00 ± 0,78	26,29 ± 0,98	0,065
C18:2n6	22,46 ± 0,03	48,55 ± 0,14	<0,001
SFA (percentagem relativa)	51,85 ± 0,70	23,73 ± 1,00	<0,001
MUFA (percentagem relativa)	25,42 ± 0,78	27,18 ± 0,98	0,026
PUFA (percentagem relativa)	22,74 ± 0,08	49,09 ± 0,01	<0,001
α-Tocoferol (µg/100 g)	20,43 ± 1,27	45,84 ± 5,61	<0,001
β-Tocoferol (µg/100 g)	70,65 ± 7,45	14,79 ± 1,54	<0,001
γ-Tocoferol (µg/100 g)	4,69 ± 0,70	72,32 ± 7,44	<0,001
δ-Tocoferol (µg/100 g)	5,28 ± 0,42	nd	-
Tocoferóis totais (µg/100 g)	101,05 ± 7,30	132,94 ± 11,50	<0,001

nd- não detetado.

Na análise da composição em açúcares livres, foram detetados o manitol e a trealose em ambas as amostras (**Tabela 5; Figura 10A**). *L. turpis* e *L. citriolens* revelaram conteúdo maioritário em manitol (19,21 g/100 g dw) e trealose (0,45 g/100 g dw), respetivamente. A amostra de *L. turpis* apresentou o maior teor total de açúcares livres (19,54 g/100 g dw). Tanto quanto se sabe, existem apenas estudos Portugueses no que concerne ao teor de açúcares livres em *Lactarius ssp.*, todos eles pertencentes ao grupo de investigação onde o presente trabalho foi inserido, nomeadamente as espécies *L. bertillonii* (Heleno et al., 2012), *L. deliciosus* (Barros et al., 2007e, Barros, Baptista et al., 2007d, Barros et al., 2007a; Fernandes et al., 2013), *L. hepaticus* (Reis et al., 2011b), *L. piperatus* (Barros et al., 2007e), *L. quietus* (Reis et al., 2011a), *L. salmonicolor* (Heleno et al., 2009) e *L. vellereus* (Heleno et al., 2012). Todas as

espécies mencionadas apresentaram manitol e trealose, com a exceção do estudo de Fernandes et al. (2013) que também descreveu frutose mas em pequenas quantidades (0,18 g/100 g dw). De facto, o manitol, um álcool derivado de açúcar, e a trealose, um oligossacárido, são os açúcares mais representativos em cogumelos (Barros et al., 2007d; Kalac, 2009). O manitol tem metade das calorias do açúcar e devido ao seu conteúdo em manitol, os cogumelos são usados por pacientes diabéticos (Hamano, 1997). A trealose é um açúcar comum nos corpos frutíferos imaturos e funciona como reserva, que pode ser metabolizada quando o corpo frutífero se encontra em maturação (Koide et al., 2000). Os ácidos gordos identificados em maiores quantidades em ambas as espécies foram o palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1n9) e o linoleico (C18:2n6) (**Tabela 5; Figura 10B**). Relativamente aos ácidos gordos saturados (SFA), o palmítico foi o encontrado em maior percentagem em *L. turpis* (8,02%), enquanto em *L. citriolens* foi o esteárico (40,58%). O ácido oleico (MUFA) e o ácido linoleico (PUFA) foram detetados em maior quantidade em *L. turpis* (26,29% e 48,55%) respetivamente. *L. citriolens* é rico em SFA (51,85%), embora, a amostra de *L. turpis* apresentou maior valor em MUFA (27,18%) e PUFA (49,09%). Tal como o observado em *L. citriolens*, existem mais espécies com o ácido esteárico (C18:0) como ácido gordo maioritário, tais como, *L. aurantiacus* (Carvalho et al., 2014), *L. bertillonii* (Heleno et al., 2012), *L. deliciosus* (Fernandes et al., 2013; Barros et al., 2007e; Öztürk et al., 2014), *L. salmonicolor* (Heleno et al., 2009), *L. piperatus* (Barros et al., 2007e) e *L. vellereus* (Heleno et al., 2012). No entanto, tal como acontece na amostra estudada de *L. turpis*, o ácido linoleico (C18:2) é o maior ácido gordo em outras espécies de *Lactarius*, nomeadamente *L. deliciosus* (Kavishree et al., 2008; Kalogeropoulos et al., 2013), *L. hepaticus* (Reis et al., 2011b), *L. quietus* (Reis et al., 2011a), *L. rufus* (Karlinski et al., 2007), *L. salmonicolor* (Ergönül et al., 2013), *L. sanguifluus* (Kavishree et al., 2008; Kalogeropoulos et al., 2013), *L. semisanguifluus* (Kalogeropoulos et al., 2013), *L. thejogalus* (Karlinski et al., 2007), *L. volemus* (Reis et al., 2011a). Apenas um estudo apresenta o ácido oleico como ácido gordo maioritário, sendo numa amostra Portuguesa de *L. deliciosus* (Barros et al., 2007a). O ácido esteárico já foi descrito como tendo grande atividade antibacteriana pois apresentou muita eficiência contra bactérias Gram positivo e Gram negativo (Gutiérrez, 2005). O ácido linoleico é um precursor conhecido de 1-octen-3-ol, o álcool dos fungos, que é o principal composto aromático da maioria dos fungos (Maga, 1981).

Em relação a tocoferóis, ambas as amostras apresentam as isoformas  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ - (**Tabela 5; Figure 10C**), As isoformas  $\alpha$ - e  $\gamma$ - são as mais abundantes em *L. turpis* (45,84  $\mu\text{g}/100\text{ g dw}$  e 72,32  $\mu\text{g}/100\text{ g dw}$ , respetivamente). Por outro lado, em *L. citriolens* o  $\beta$ -tocoferol foi o mais abundante (70,65 $\mu\text{g}/100\text{ g dw}$ ). Esta foi também a única amostra que apresentou  $\delta$ -tocoferol (5,28  $\mu\text{g}/100\text{ g dw}$ ). A amostra de *L. turpis* foi a que revelou maior conteúdo de tocoferóis totais (132,94  $\mu\text{g}/100\text{ g dw}$ ). Tanto quanto se sabe, apenas existem estudos portugueses onde são apresentados os conteúdos em tocoferóis em *Lactarius spp.*. A isoforma principal, e o seu total variaram, estando entre 15 $\mu\text{g}/100\text{ g}$  e 316  $\mu\text{g}/100\text{g}$  (Helena et al., 2010; Helena et al., 2012). Além de evitar a peroxidação lipídica, a vitamina E parece exercer efeitos sobre outros fatores de risco cardiovascular incluindo a redução da adesão e agregação plaquetária (Steiner, 1991).

Em relação ao perfil de ácidos orgânicos, foi possível identificar e quantificar quatro compostos diferentes (**Tabela 6; Figura 11A**), nomeadamente ácido oxálico, quínico, málico e fumárico. O cogumelo silvestre *L. turpis* foi o que revelou maior concentração em ácido oxálico (0,10  $\text{g}/100\text{ g dw}$ ) enquanto *L. citriolens* apresentou maiores concentrações em ácidos málico e fumárico (3,36  $\text{g}/100\text{ g dw}$  e 0,50  $\text{g}/100\text{ g dw}$ , respetivamente). O ácido quínico apenas esteve presente em *L. citriolens* e foi este quem obteve maior valor total de ácidos orgânicos (4,10  $\text{g}/100\text{ g dw}$ ). Tanto quanto se sabe, existem apenas dois estudos relativos a ácidos orgânicos em *Lactarius spp.*, *L. deliciosus* de origens diferentes de Portugal, e *L. volemus*, com o ácido málico como maioritário (Valentão et al., 2007; Barros et al., 2013). A determinação de ácidos orgânicos é importante, pois estes influenciam as propriedades organoléticas das matrizes alimentares (Barros et al., 2013).

Em relação a ácidos fenólicos, as amostras estudadas relevam a presença dos ácidos gálico e *p*-hidroxibenzóico, e também o composto relacionado ácido cinâmico (**Tabela 6; Figura 11B**). O ácido gálico foi apenas encontrado em *L. turpis* (0,08  $\text{mg}/100\text{ g dw}$ ). Contudo, foi *L. citriolens* que apresentou maiores quantidades de ácido *p*-hidroxibenzóico (0,15  $\text{mg}/100\text{ g dw}$ ) e do composto relacionado ácido cinâmico (0,15  $\text{mg}/100\text{ g dw}$ ). Através desta análise podemos concluir que a amostra silvestre de *L. turpis* é rica em compostos fenólicos (0,20  $\text{mg}/100\text{ g dw}$ ) quando comparada com *L. citriolens* (0,15  $\text{mg}/100\text{ g dw}$ ). É difícil estabelecer um perfil para o género. De facto, os compostos fenólicos presentes em diferentes espécies não são os mesmos, variando

também o principal composto. Em relação aos ácidos fenólicos em *Lactarius spp.*, o ácido *p*-hidroxibenzóico foi o principal ácido em *L. deliciosus* (Barros et al., 2009), *L. salmonicolor* (Vaz et al., 2011) e *L. volemus* (Reis et al., 2011a); o ácido *o*-cumárico (Kalogeropoulos et al., 2013), ácido homogentísico (Palacios et al., 2011) e o ácido tânico (Puttaraju et al., 2006) foram também reportados como principais compostos em amostras de *L. deliciosus* e *L. volemus*. O ácido protocatéquico foi o ácido fenólico maioritário para *L. volemus* (Özyürek et al., 2014). O mesmo ácido fenólico foi o maioritário em *L. vellereus* (Heleno et al., 2012); foi encontrada ainda catequina em *L. deterrimus* (Münzenberger, et al, 2013) e *L. vellereus* (Dogan & Aydin, 2013); o ácido *o*-cumárico foi o ácido fenólico maioritário em *L. semisanguifluus* (Kalogeropoulos et al., 2013). O ácido *p*-OH-fenilacético foi o ácido fenólico com maior concentração na amostra de *L. sanguifluus* (Kalogeropoulos et al., 2013), embora Puttaraju et al., (2006) tenham apresentado o ácido tânico como o principal para a mesma espécie. Relativamente ao composto relacionado ácido cinâmico, este foi encontrado em *L. aurantiacus* (Vaz et al., 2011), *L. bertillonii* (Heleno et al., 2012) e *L. quietus* (Reis et al., 2011a). De facto, o género *Lactarius spp.* é rico em compostos fenólicos, os quais têm sido apontados como benéficos para a saúde.

Através da análise dos resultados do poder antioxidante (**Tabela 7**), o extrato metanólico de *L.turpis* revelou o maior poder redutor através do ensaio de *Folin-Ciocalteu* (22,02 mg EAG/g extrato) e do ensaio de Ferricianeto/Azul da Prússia ( $EC_{50}=1,53$  mg/mL). A mesma amostra demonstrou também a maior atividade captadora de radicais livres, uma vez que obteve o menor valor de  $EC_{50}$  no ensaio de DPPH (4,18 mg/mL). *L. turpis* apresentou ainda a maior inibição da peroxidação lipídica nos ensaios de  $\beta$ -caroteno/linoleato ( $EC_{50}=4,92$  mg/mL) e de TBARS ( $EC_{50}=0,57$  mg/mL).

O maior conteúdo total de fenóis observados no género, medido através do ensaio *Folin-Ciocalteu*, foi reportado no estudo de Orhan & Üstün, (2011), numa amostra de *L. deliciosus* (51,27 mg EAG/g). A mesma espécie ( $EC_{50}=500$   $\mu$ g/mL; Orhan & Üstün, 2011) e *L. bertillonii* ( $EC_{50}=1,63$  mg/mL; Heleno et al., 2012) demonstraram o maior poder redutor. Em relação à atividade captadora de radicais livres, a maior capacidade foi descrita por Unekwu et al., (2014) numa amostra de *L. deliciosus* ( $EC_{50}= 300$   $\mu$ g/mL). Finalmente, em relação à inibição da peroxidação

lipídica, a maior atividade antioxidante obtida foi em *L. deliciosus* ( $IC_{50}=148,0 \mu\text{g/mL}$ ) através do ensaio  $\beta$ -caroteno/linoleato (Öztürk et al., 2014) e em *L. bertillonii* ( $EC_{50}=1.21 \text{ mg/mL}$ ) no ensaio de TBARS (Helena et al., 2012). Ambas as amostras demonstraram baixos valores de  $EC_{50}$  no ensaio de TBARS, sendo *L. turpis* a espécie com maior potencial antioxidante do género, quando medido através deste ensaio. Os antioxidantes podem ajudar na defesa do sistema endógeno, desempenhando um papel importante como potencial agentes protetores, reduzindo os danos provocados pelos radicais livres e prevenindo eventos relacionados com o envelhecimento e doenças como a diabetes, cancro e cirrose (Ferreira et al., 2009).

**Tabela 6.** Ácidos orgânicos e compostos fenólicos dos corpos de frutificação de *L. citriolens* e *L. turpis* expressos em massa seca (média  $\pm$  DP).

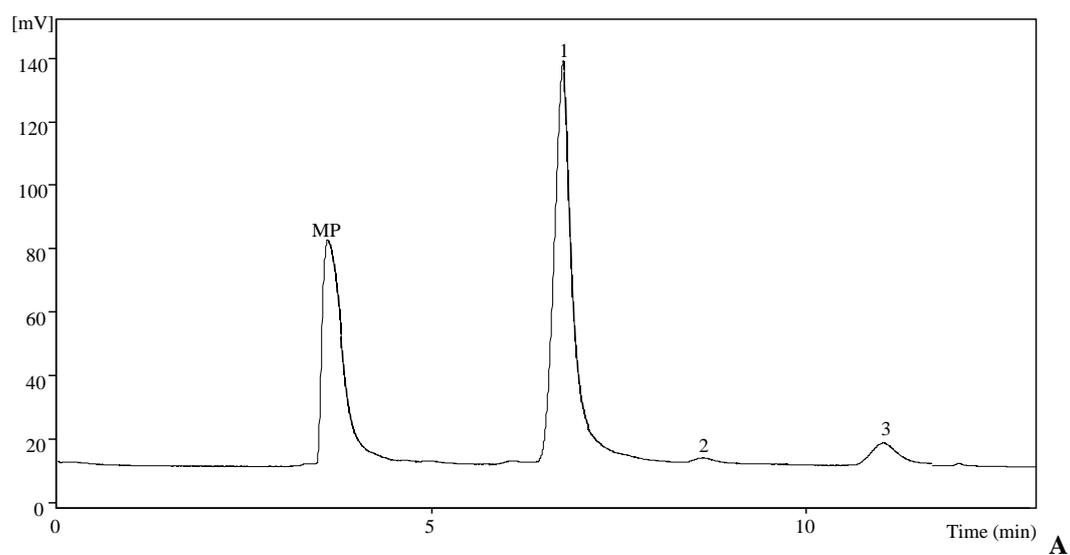
	<i>Lactarius citriolens</i>	<i>Lactarius turpis</i>	Valor de <i>p</i> <i>t</i> -Student
Ácido oxálico (g/100 g)	0,06 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01	<0,001
Ácido quínico (g/100 g)	0,18 $\pm$ 0,06	nd	-
Ácido málico (g/100g)	3,36 $\pm$ 0,03	2,96 $\pm$ 0,19	0,008
Ácido fumárico (g/100 g)	0,50 $\pm$ 0,02	0,24 $\pm$ 0,00	<0,001
Ácidos orgânicos totais (g/100 g)	4,10 $\pm$ 0,06	3,30 $\pm$ 0,19	<0,001
Ácido gálico (mg/100g )	nd	0,08 $\pm$ 0,00	-
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico (mg/100 g)	0,15 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,00	0,002
Ácidos fenólicos totais (mg/100 g)	0,15 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,01	<0,001
Ácido cinâmico (mg/100 g)	0,15 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,00	<0,001

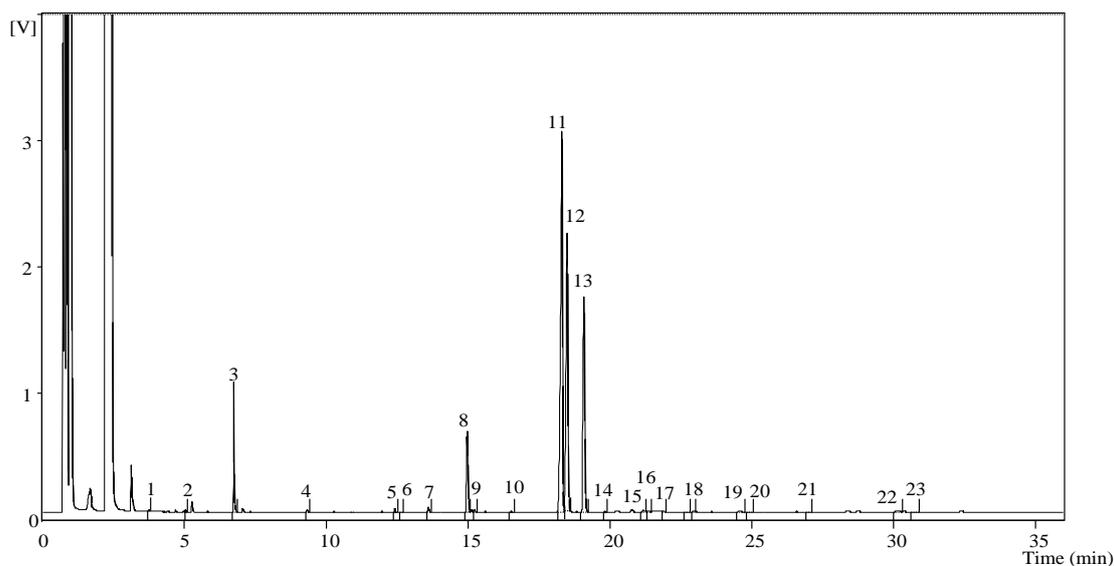
nd- não detetado.

Como os extratos metanólicos apresentaram atividade antioxidante, foi importante garantir a ausência de citotoxicidade contra células do fígado, que são consideradas o melhor modelo *in vitro* para estudo de citotoxicidade humana. Apesar de existirem relatos da presença de compostos tóxicos no corpo frutífero de *L. turpis*, os extratos preparados não apresentaram toxicidade na cultura primária de fígado PLP2. O controlo positivo de elipticina apresentou  $GI_{50}=2,06 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$ .

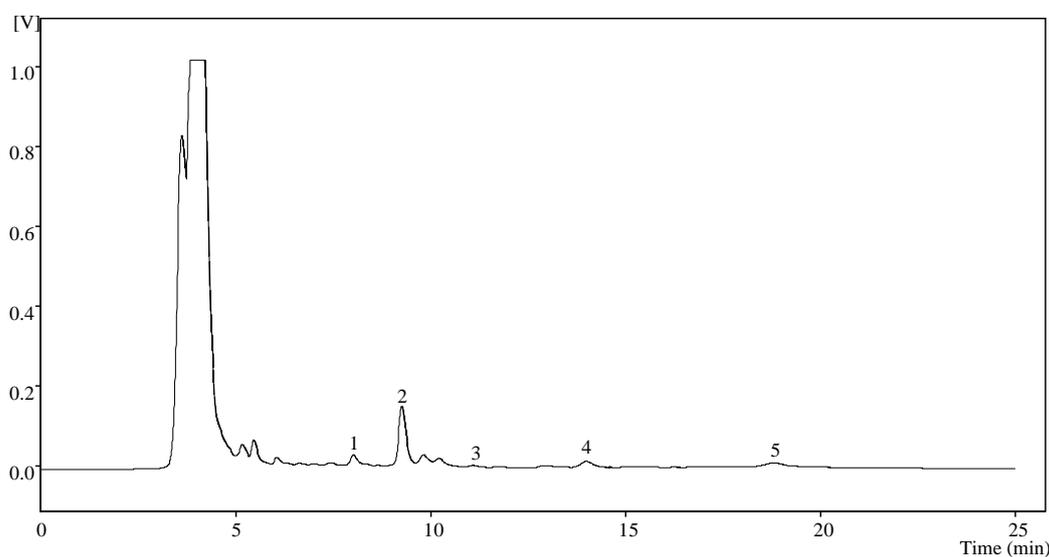
**Tabela 7.** Atividade antioxidante dos extratos metanólicos de *L. citriolens* e *L. turpis* (média ± DP).

	Ensaio	<i>Lactarius citriolens</i>	<i>Lactarius turpis</i>	Valor de <i>p</i> <i>t</i> -Student
Poder redutor	<i>Folin-ciocalteu</i> (mg EAG/g extrato)	13,13 ± 0,17	22,02 ± 0,09	<0,001
	Ferricianeto/Azul da Prússia (EC <sub>50</sub> ; mg/mL)	2,61 ± 0,13	1,53 ± 0,02	<0,001
Atividade captadora de radicais	Atividade captadora DPPH (EC <sub>50</sub> ; mg/mL)	15,77 ± 0,27	4,18 ± 0,04	<0,001
Inibição da peroxidação lipídica	β-caroteno/linoleato (EC <sub>50</sub> ; mg/mL)	6,21 ± 0,24	4,92 ± 0,27	<0,001
	TBARS (EC <sub>50</sub> ; mg/mL)	0,82 ± 0,03	0,57 ± 0,02	<0,001



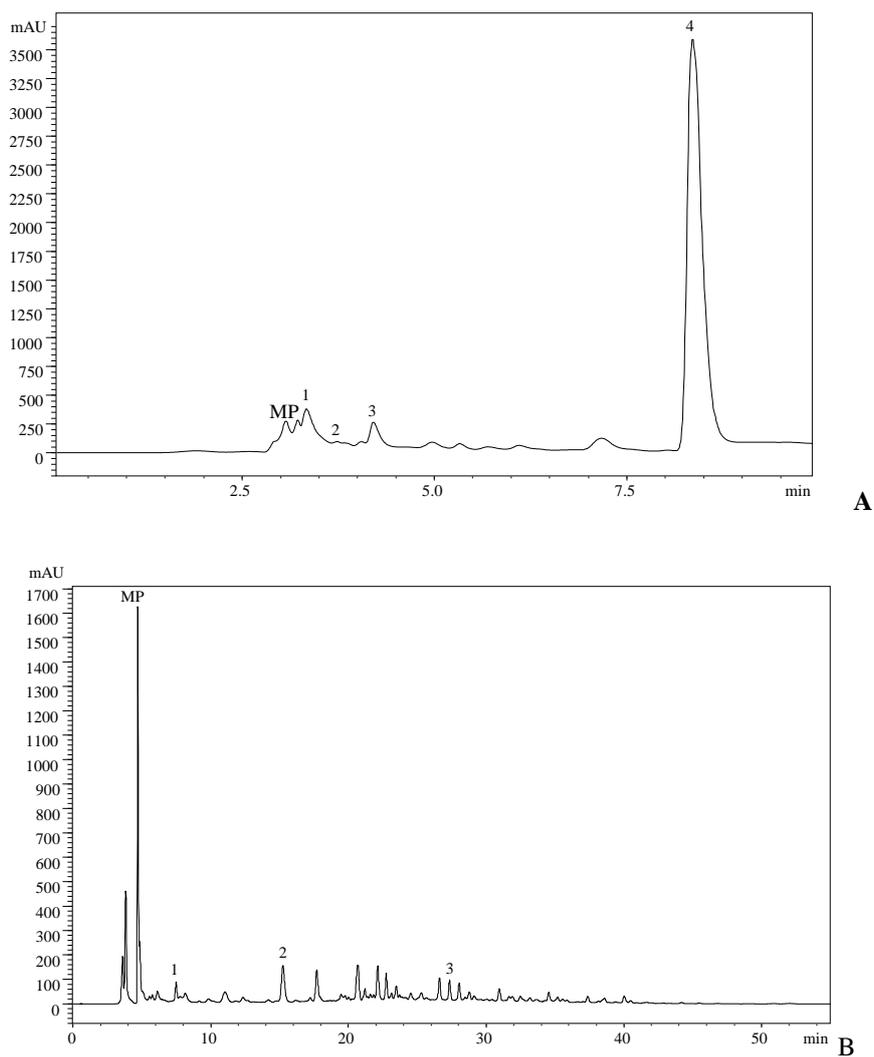


**B**



**C**

**Figura 10.** Perfil individual de açúcares (A) de *L. turpis*: 1- manitol, 2- trealose, 3- rafinose (CI); ácidos gordos (B) de *L. citriolens*: 1- ácido caprílico (C6:0); 2- ácido caprílico (C8:0); 3- ácido cáprico (C10:0); 4- ácido laurico (C12:0); 5- ácido mirístico (C14:0); 6- ácido miristoleico (C14:1); 7- ácido pentadecanóico (C15:0); 8- ácido palmítico (C16:0); 9- ácido palmitoleico (C16:1); 10- ácido heptadecanóico (C17:0); 11-ácido esteárico (C18:0); 12- ácido oleico (C18:1n9c); 13- ácido linoleico (C18:2n6c); 14- ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3n3c); 15-ácido araquidónico (C20:0); 16-ácido ecosanóico (C20:1c); 17- ácido cis-11,14-eicosadienóico (C20:2c); 18- ácido cis-11, 14, 17-eicosatrienóico e ácido heneicosanóico (C20:3n3+C21:0); 19- ácido cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (C20:5n3); 20- ácido beénico (C22:0); 21- ácido tricosanoico (C23:0); 22- ácido lignocérico (C24:0); 23- ácido nervónico (C24:1); e tocoferóis (C) de *L. turpis*: 1-  $\alpha$ -tocoferol, 2- BHT, 3-  $\beta$ -tocoferol, 4-  $\gamma$ -tocoferol, 5- tocol (CI). MP- fase móvel.



**Figura 11.** Perfil individual de ácidos orgânicos (A) de *L. citriolens*: 1- ácido oxálico, 2- ácido quínico, 3- ácido málico, 4-ácido fumárico; e ácidos fenólicos (B) de *L. turpis*: 1- ácido gálico; 2- ácido *p*-hidroxibenzóico; 3- ácido cinâmico. MP- fase móvel.

### 3.3. O que ainda não foi descrito sobre o cogumelo silvestre *Leucopaxillus candidus* (Bres.) Singer

A composição em macronutrientes do corpo de frutificação *L. candidus* está apresentada na **Tabela 8**. Este demonstrou altos níveis de hidratos de carbono (70,35 g/100 g dw) e proteínas (19,91 g/100 g dw), apresentando uma contribuição energética de 976,70 kcal/100 g dw.

Relativamente à composição em açúcares livres, frutose, manitol e trealose foram detetados em *L. candidus* (7,04 g total em açúcares/100 g) (**Tabela 8**). O manitol foi o açúcar maioritariamente presente (5,62 g/100 g), seguido pela trealose (1,09 g/100 g) e a frutose (0,33 g/100 g). Barros et al. (2007a), também descreveram o manitol e a trealose em *L. giganteus*, sendo a trealose o açúcar predominante (0,50 g/100 g dw). O manitol presente em cogumelos foi já descrito como promotor de um efeito inibitório sobre a enzima angiotensina I convertase (ACE) e diminuidor da pressão arterial em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (Hagiwara et al., 2005). A trealose é um importante componente nos esporos dos fungos, e a sua hidrólise é um acontecimento importante durante a germinação precoce e serve presumivelmente como uma fonte de carbono para síntese de glucose e obtenção de energia (Thevelein, 1984). A trealose também preserva as proteínas instáveis durante a secagem (Carpender e Crowe, 1989). Pelo contrário, a ingestão dietética de frutose parece ter aumentado o potencial de ganho de peso, síndrome de resistência à insulina, hiperinsulinemia, hipertensão e hiperlipidemia em modelos animais (Elliot et al., 2002). A amostra estudada apresentou baixo conteúdo em frutose, existindo então pouca probabilidade de produzir este tipo de efeitos.

Os ácidos gordos quantificados em maiores quantidades em *L. candidus* (**Tabela 8**) foram os ácidos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1n9) e linoleico (C18:2n6).

No que concerne aos ácidos gordos saturados (SFA), o ácido palmítico foi encontrado em maior percentagem (8,03%). O ácido oleico (ácido gordo monoinsaturado - MUFA) e o ácido linoleico (ácido gordo polinsaturado - PUFA) foram encontrados em maiores percentagens na amostra de *L. candidus* (36,58% e 49,02%, respetivamente). Consequentemente, esta amostra foi mais rica em PUFA

(49,88%), do que MUFA (37,39%) e SFA (12,73%). Em *L. giganteus* os PUFA foram também predominantes (46,67%, maioritariamente ácido linoleico - 46,18%) sobre os SFA (19,25%, maioritariamente ácido palmítico - 13,46% e ácido esteárico - 2,11%) (Barros et al., 2007a). Os alimentos ricos em PUFA n-3 conferem efeitos de proteção cardíaca, diminuição da pressão arterial, prevenção do desenvolvimento de hipertensão e diminuição da agregação plaquetária (Tapiero et al., 2002).

**Tabela 8.** Macronutrientes, açúcares livres, ácidos gordos e tocoferóis dos corpos de frutificação de *Leucopaxillus candidus* expressos em massa seca (média  $\pm$  DP).

<i>Leucopaxillus candidus</i>	
Lípidos (g/100 g)	1,74 $\pm$ 0,04
Proteínas (g/100 g)	19,91 $\pm$ 0,21
Cinzas (g/100 g)	8,00 $\pm$ 0,13
Hidratos de carbono (g/100 g)	70,35 $\pm$ 0,29
Energia (kcal/100 g)	376,70 $\pm$ 0,17
Frutose (g/100 g)	0,33 $\pm$ 0,01
Manitol (g/100 g)	5,62 $\pm$ 0,06
Trealose (g/100 g)	1,09 $\pm$ 0,00
Açúcares totais (g/100 g)	7,04 $\pm$ 0,07
C16:0	8,03 $\pm$ 0,67
C18:0	2,69 $\pm$ 0,04
C18:1n9	36,58 $\pm$ 1,53
C18:2n6	49,02 $\pm$ 0,59
SFA (percentagem relativa)	12,73 $\pm$ 0,61
MUFA (percentagem relativa)	37,39 $\pm$ 1,55
PUFA (percentagem relativa)	49,88 $\pm$ 0,93
$\alpha$ -Tocoferol ( $\mu$ g/100 g)	13,73 $\pm$ 1,65
$\beta$ -Tocoferol ( $\mu$ g/100 g)	33,35 $\pm$ 5,02
$\gamma$ -Tocoferol ( $\mu$ g/100 g)	3,09 $\pm$ 0,98
$\delta$ -Tocoferol ( $\mu$ g/100 g)	7,17 $\pm$ 0,83
Tocoferóis totais ( $\mu$ g/100 g)	57,34 $\pm$ 1,56

No que concerne aos tocoferóis, a amostra apresentou as isoformas  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ - (**Tabela 8**). O  $\beta$ -tocoferol esteve presente em maior quantidade (33,35  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ), seguido pelas isoformas  $\alpha$ - (13,73  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ),  $\delta$ - (7,17  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) e  $\gamma$ - (3,09  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ). A totalidade em tocoferóis para *L. candidus* foi 57,34  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ . A vitamina E é considerada um dos mais potentes antioxidantes lipossolúveis para retardar ou prevenir algumas doenças degenerativas relacionadas com o envelhecimento (Niki e Traber, 2012). Além da sua natureza antioxidante, a vitamina E tem sido reportada por aumentar a resposta imunitária (Pae et al., 2012).

Relativamente ao perfil em ácidos orgânicos, foi possível identificar e quantificar dois diferentes compostos (**Tabela 9**), nomeadamente os ácidos oxálico (0,41 g/100 g) e fumárico (0,40 g/100 g).

No que concerne aos ácidos fenólicos, a amostra estudada revelou a presença dos ácidos *p*-hidroxibenzóico (0,71 g/100 g) e *p*-coumárico (0,58 g/100 g), e também o composto relacionado ácido cinâmico (0,12 g/100 g) (**Tabela 9**). Diferentes autores descreveram o perfil em ácidos orgânicos de *L. giganteus*, uma outra espécie pertencente ao mesmo género. Ribeiro et al. (2008) estudaram a influência de diferentes fontes de azoto no perfil de ácidos orgânicos por HPLC-UV, referindo o ácido cítrico como o ácido orgânico maioritário presente (90-96%). Barros et al. (2013) utilizaram UFLC-PDA (cromatografia líquida ultra rápida acoplada a um detetor de fotodíodos), e descreveram o ácido málico como o ácido orgânico maioritário (60,25 g/100 g). No que concerne ao perfil de compostos fenólicos, Barros et al. (2009) estudaram a constituição fenólica em várias espécies, no entanto, os autores não foram capazes de detetar nenhum composto na amostra de *L. giganteus*. Os compostos fenólicos e os ácidos orgânicos contribuem para as propriedades organoléticas de matrizes alimentares (Vaughan e Geissler, 1997). Além do mais, estes compostos podem estar envolvidos na proteção face a diversas doenças (Silva et al., 2004). Por exemplo, Son et al. (2000) descreveram que concentrações milimolares de ácido oxálico têm uma forte atividade antiescurecimento, e Ribeiro et al. (2008) descreveram o ácido fumárico como um importante composto devido às suas propriedades antioxidante, antimicrobiana e acidificante. Contudo, o ácido oxálico é encontrado nos organismos vivos sob a forma de sal de cálcio, e o oxalato de cálcio é o principal componente dos cálculos renais e

pode ser absorvido diretamente pelo intestino apesar da sua insolubilidade (Ribeiro et al., 2008a).

**Table 9.** Ácidos orgânicos e compostos fenólicos dos corpos de frutificação de *Leucopaxillus candidus* expressos em massa seca (média ± DP).

	<i>Leucopaxillus candidus</i>
Ácido oxálico (g/100 g)	0,41 ± 0,09
Ácido fumárico (g/100 g)	0,40 ± 0,00
Ácidos orgânicos totais (g/100 g)	0,81 ± 0,10
Ácido <i>p</i> -Hydroxibenzóico (µg/100 g)	0,71 ± 0,01
Ácido <i>p</i> -Coumárico (µg/100 g)	0,58 ± 0,01
Ácidos Fenólicos totais (µg/100 g)	1,29 ± 0,01
Ácido Cinâmico (µg/100 g)	0,12 ± 0,00

Analisando os resultados do potencial antioxidante (**Tabela 10**), o extrato metanólico de *L. candidus* revelou um forte poder redutor quando avaliado pelos ensaios de *Folin-Ciocalteu* (20,11 mg GAE/g extrato) e Ferricianeto/Azul da Prússia (EC<sub>50</sub>=1,04 mg/mL), e também uma interessante capacidade captadora de radicais mensurada pelo ensaio de DPPH (EC<sub>50</sub>=2,26 mg/mL). A inibição da peroxidação lipídica foi avaliada pelos ensaios de β-caroteno/linoleato (EC<sub>50</sub>=2,01 mg/mL) e TBARS (2,98 mg/mL). *L. giganteus* é uma espécie pertencente ao mesmo gênero que foi descrita como possuindo atividade antioxidante (Barros et al., 2007b). O poder redutor foi avaliado através dos ensaios de *Folin-Ciocalteu* (6,29 mg GAE/g extrato) e Ferricianeto/Azul da Prússia (EC<sub>50</sub>=1,71 mg/mL), demonstrando-se que *L. giganteus* teve um poder redutor inferior ao de *L. candidus*. No entanto, o mesmo estudo dos autores demonstrou melhores resultados no que concerne à atividade captadora de radicais avaliada pelo ensaio de DPPH (EC<sub>50</sub>=1,44 mg/mL). Relativamente à inibição da peroxidação lipídica, os autores apenas utilizaram o ensaio de β-caroteno/linoleato (EC<sub>50</sub>=2,00 mg/mL), reportando resultados similares aos apresentados no presente trabalho.

Uma vez que o extrato metanólico apresentou atividade antioxidante, foi importante garantir a ausência de citotoxicidade contra as células do fígado, que é considerado o melhor modelo *in vitro* para estudos de citotoxicidade humana. O extrato

não revelou toxicidade na cultura primária de células de fígado PLP2, enquanto o controlo positivo, a elipticina, demonstrou um  $GI_{50} = 2,06 \pm 0,03$  mg / mL.

**Table 10.** Atividade antioxidante dos extratos metanólicos de *Leucopaxillus candidus* (média  $\pm$  DP).

	Ensaio	<i>Leucopaxillus candidus</i>
Poder redutor	<i>Folin-ciocalteu</i> (mg EAG/g extrato)	20,11 $\pm$ 0,81
	Ferricianeto/Azul da Prússia (EC <sub>50</sub> ; mg/mL)	1,04 $\pm$ 0,01
Atividade captadora de radicais	Atividade captadora DPPH (EC <sub>50</sub> ; mg/mL)	2,26 $\pm$ 0,04
	$\beta$ -caroteno/linoleato (EC <sub>50</sub> ; mg/mL)	2,01 $\pm$ 0,39
Inibição da peroxidação lipídica	TBARS (EC <sub>50</sub> ; mg/mL)	2,98 $\pm$ 0,28

No que concerne ao ensaio de *Folin-Ciocalteu*, maiores valores significam maior poder reutor; para os outros ensaios, os resultados são apresentados em valor de EC<sub>50</sub>, o que significa que maiores valores correspondem a menor poder redutor ou atividade antioxidante. EC<sub>50</sub>: A concentração do extrato corresponde a 50% da atividade antioxidante ou 0,5 da absorvância para para o ensaio de Ferricianeto/Azul da Prússia.

*Lactarius citriolens, Lactarius turpis, Leucopaxillus candidus e Morchella conica*

## 4. Considerações Finais

No presente trabalho, fez-se a caracterização química e estudou-se o valor nutricional e bioatividade *in vitro* dos seguintes cogumelos silvestres: *Morchella conica*, *Lactarius citriolens*, *Lactarius turpis* e *Leucopaxillus candidus*. Todas as espécies foram recolhidas em Bragança e *M. conica* também foi recolhida na Sérvia.

A amostra de *M. conica* da Sérvia revelou o mais elevado teor em açúcares livres, PUFA e compostos fenólicos, já a amostra Portuguesa revelou maiores concentrações de SFA, MUFA, tocoferóis e ácidos orgânicos. O extrato metanólico da amostra Portuguesa revelou o maior potencial antioxidante (com exceção da inibição da peroxidação lipídica), e também apresentou a maior atividade antimicrobiana.

Nas espécies estudadas do género *Lactarius*, *L. citriolens* revelou a maior contribuição energética, maior concentração em SFA e em ácidos orgânicos, enquanto *L. turpis* foi mais rica em açúcares livres, MUFA e PUFA, tocoferóis e compostos fenólicos. O extrato metanólico de *L. turpis* apresentou a maior atividade antioxidante em todos os ensaios *in vitro*. As espécies comestíveis do género *Lactarius* são consideradas alimentos saudáveis, devido ao baixo teor em calorias e gordura, mas riqueza em proteínas e hidratos de carbono. O perfil de macronutrientes em *L. citriolens* e *L. turpis* é semelhante ao descrito para as espécies comestíveis do mesmo Género, apesar da presença de alguns compostos tóxicos que as tornam não recomendados para consumo. No entanto, as espécies estudadas têm várias moléculas interessantes com potencial bioativo, nomeadamente atividade antioxidante, que podem ser isoladas para serem utilizadas em medicamentos ou nutracêuticos.

*L. candidus* também mostrou ser uma espécie interessante quanto ao valor nutricional, com alto teor de proteínas e hidratos de carbono, mas baixos níveis de gordura e com predomínio de PUFA. O manitol foi o principal açúcar livre presente e  $\beta$ -tocoferol a principal isoforma de tocoferóis. Foi possível quantificar dois ácidos orgânicos, os ácidos oxálico e fumárico, em concentrações semelhantes, enquanto o ácido *p*-hidroxibenzóico foi o principal ácido fenólico; a amostra também revelou a presença de ácido cinâmico. O extrato metanólico também revelou atividade antioxidante.

Nenhum dos extratos estudados mostrou toxicidade em culturas primárias de células de fígado de porco.

Este é o primeiro trabalho que descreve a composição química das espécies de cogumelos em estudo, contribuindo assim para a inventariação e caracterização das mesmas. Apesar de algumas não serem consideradas comestíveis, possuem compostos de interesse nutracêutico. Além disso, como são uma fonte de vitaminas e antioxidantes, as espécies silvestres podem ser utilizadas na prevenção e monitorização de patologias relacionadas com o stresse oxidativo e envelhecimento.

## 5. Bibliografia

- Abreu, R.M.V., Ferreira, I.C.F.R., C. Calhella, R.C., Limad, R.T., Vasconcelos, M.H., Adega, F., Chaves, R., Queiroz M.J.R.P., 2011. Anti-hepatocellular carcinoma activity using human HepG2 cells and hepatotoxicity of 6-substituted methyl 3-aminothieno[3,2-b]pyridine-2-carboxylate derivatives: In vitro evaluation, cell cycle analysis and QSAR studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 46, 5800-5806.
- Agostinucci, K., Manfredi, T.G., Cosmas, A., Martin, K., Han, S.N., Wu, D., Sastre, J., Meydani, S.N., Meydani, M., 2002. Vitamin E and age alter liver mitochondrial morphometry. *Journal of Anti-Aging Medicine*. 5, 173-178.
- Agrahar-Murugkar, D., & Subbulakshmi, G., 2005. Nutritional value of edible wild mushrooms collected from the Khasi hills of Meghalaya. *Food Chemistry*, 89, 599-603.
- Ahmed M, Keeping JW, Macrides TA, Thaller V., 1978. Natural Acetylenes. Part 54. Polyacetylenes from fungal cultures of some Tricholomataceae and Corticiaceae species. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 1*: 1487-1489.
- Akata, I., Ergönul, B., & Kalyoncu, F., 2012. Chemical Compositions and Antioxidant Activities of 16 Wild Edible Mushroom Species Grown in Anatolia. *International Journal of Pharmacology*, 8, 134-138.
- Alam, N., Bristi, N.J., Rafiquzzaman, 2013. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 21, 143-152.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwell, M., 1996. *Introductory Mycology*. John Wiley and Sons editors, 4 ed., New York.
- Allard, J.P., Aghdassi, E., Chau, J., Tam, C., Kovacs, C.M., Salit, I.E., Walmsley, S.L., 1998. Effects of vitamin E and C supplementation on oxidative stress and viral load in HIV-infected subjects. *AIDS*. 12, 1653-1659.

- Alvarez-Parrilla, E., Rosa, L.A., Martínez, N.R., Aguilar, G.A.G., 2007. Total phenols and antioxidant activity of commercial and wild mushrooms from Chihuahua, Mexico. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 5, 329-334.
- Alves, M.J., Ferreira, I.C.F.R., Dias, J., Teixeira, V., Martins, A., Pintado, M., 2012. A review on antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds. *Planta Medica*, 78, 1707-1718.
- Andlauer, W., Furst, P., 2002. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. *Food Research International*. 35, 171-176.
- Arora, D., 1986. *Mushrooms Demystified*, 2 ed. Ten Speed Press, Berkeley.
- Arteel, G.E., 2003. Oxidants and antioxidants in alcohol induced liver disease. *Gastroenterology* 124, 778-790.
- Bala, N., Aitken, E.A.B., Fechner, N., Cusack, A., Steadman, K.J., 2011. Evaluation of antibacterial activity of Australian basidiomycetous macrofungi using a high-throughput 96-well plate assay. *Pharmaceutical Biology*, 49, 1-9.
- Barros L, Pereira C, Ferreira ICFR., 2013. Optimized analysis of organic acids in edible mushrooms from Portugal by Ultra Fast Liquid Chromatography and Photodiode Array Detection. *Food Analytical Methods* 6: 309-316.
- Barros, L., Baptista, P., Correia, D.M., Casal, S., Oliveira, B., Ferreira, I.C.F.R., 2007a. Fatty acid and sugar compositions, and nutritional value of five wild edible mushrooms from Northeast Portugal. *Food Chemistry*, 105, 140-145.
- Barros, L., Baptista, P., Correia, D.M., Morais, J.S., & Ferreira, I.C.F.R., 2007d. Effects of conservation treatment and cooking on the chemical composition and antioxidant activity of Portuguese wild edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4781-4788.
- Barros, L., Baptista, P., Estevinho, L.M., & Ferreira, I.C.F.R., 2007e. Effect of fruiting body maturity stage on chemical composition and antimicrobial activity of

- Lactarius sp. mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8766-8771.
- Barros, L., Calhella, R.C., Vaz, J.A., Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P., Estevinho, L.M., 2007c. Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms. *European Food Research and Technology*, 225, 151-156.
- Barros, L., Correia, D.M., Ferreira, I. C. F. R., Baptista, P., Santos-Buelga, C., 2008b. Optimization of the determination of tocopherols in *Agaricus* sp. Edible mushrooms by a normal phase liquid chromatographic method. *Food Chemistry*. 110, 1046-1050.
- Barros, L., Cruz, T., Baptista, P., Estevinho, L.M., Ferreira, I.C.F.R., 2008a. Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food and Chemical Toxicology*. 46, 2742-2747.
- 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 diferente Portuguese wild mushrooms species. *Food and Chemical Toxicology*. 47, 1076-1079.
- Barros, L., Ferreira, M.-J., Queirós, B., Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P., 2007b. Total phenols, ascorbic acid, ( $\beta$ -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 103, 413-419.
- Bautista-Justo, M., Alanis-Guzman, M.G., Gonzalez-de-Mejia, E., Garcia-Diaz, C.L., 1998. Composicion quimica de tres cepas mexicanas de setas (*Pleurotus ostreatus*). *Archivos latinoamericanos de nutrición*. 48, 359-363.
- Belitz, H.D., Grosch, W., 1987. *Food chemistry*. Springer Verlag, Berlin. New York.
- Bellini, M.F., Cabriotti, L.N., Terezan, A.P., Jordão, B.Q., Ribeiro, L.R., Mantovani, M.S., 2008. Cytotoxicity and genotoxicity of *Agaricus blazei* methanolic extract fractions assessed using gene and chromosomal mutation assays. *Genetics and Molecular Biology*. 31, 122-127.
- Benguría RL. (1985). *Mil Setas Ibericas*. Diputación Foral de Bizkaia, Spain.

- Bianchi, M.L.P., Antunes L.M.G., 1999. Free radicals and the main dietary antioxidants. *Revista de Nutrição*. 12, 123-130.
- Bolton, J.L., Trush, M.A., Penning, T.M., Dryhurst, G., Monks, T.J., 2000. Role of quinones in toxicology. *Chem. Chemical Research in Toxicology Res. Toxicol.* 13, 135-160.
- Booth, C., 1971. *Methods in microbiology*, 4 ed. Academic Press. New York-San Diego.
- Borguini, R.G., Torres, E.F.S., 2006. Tomatoes and tomato products as dietary sources of antioxidants. *Food Reviews International*. 25, 313-325.
- Bravo, L., 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*. 56, 317-333.
- Breene, W.M., 1990. Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. *Journal of Food Protection*. 53, 883-894.
- Burtis, C.A., Ashwood, E.R., 1996. *Tietz - Fundamentals of Clinical chemistry*. W. B. Saunders Company, 4 ed., Philadelphia.
- Çaglarirmak, N., 2007. The nutrients of exotic mushrooms (*Lentinula edodes* and *Pleurotus* species) and an estimated approach to the volatile compounds. *Food Chemistry*. 105, 1188-1194.
- Cámara, M.M., Díez, C., Torija, M.E., Cano, M.P., 1994. HPLC determination of organic acids in pineapple juices and nectars. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und – Forschung*. 198, 52-56.
- Carocho, M., Ferreira, I.C.F.R., 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*. 51, 15-25.
- Carpenter, J.F., Crowe, J.F., 1989. An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Biochemistry* 28: 3916-3922.

- Carvajal, A.E.S.S., Koehnlein, E.A., Soares, A.A., Eler, G.J., Nakashima, A.T.A., Bracht, A., Peralta, R.M., 2012. Bioactives of fruiting bodies and submerged culture mycelia of *Agaricus brasiliensis* (A. blazei) and their antioxidant properties. *LWT - Food Science and Technology*. 46, 493-499.
- Carvalho, L.M., Carvalho, F., Bastos, M.L., Baptista, P., Moreira, N., Monforte, A.R., Ferreira, A.C.S., & Pinho, P.G. (2014). Non-targeted and targeted analysis of toxic and edible mushrooms using gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *Talanta*, 118, 292-303.
- Cavalier-Smith, T., 2004. Only six kingdoms of life. *The Royal Society. Proceedings of the Royal Society of London*. 271, 1251-1262.
- Chang, S.T., Miles P.G., 2004. *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*. CRC Press, 2 ed., Boca Raton, London, New York, Washington DC.
- Cheung, P.C.K., 2010. The nutritional and health benefits of mushrooms. *Nutrition Bulletin*, 35, 292-299.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. 8 ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.
- Courtecuisse, R., Duhem, B., 2005. *Guía de los hongos de la Península Ibérica, Europa y Norte de África*. Ediciones Omega S.A., Barcelona.
- Craft, B.D., Kerrihard, A.L., Amarowicz, R., Pegg, R.B., 2012. Phenol-based antioxidants and their in vitro methods used for their assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 11, 148-173.
- Cunniff, P., 1997. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. AOAC International, 16 ed, Gaithersburg, M.D.

- Devore, E.E., Grodstein, F., van Rooij, F.J.A., Hofman, A., Stampfer, M.J., Witteman, J.C.M., Breteler, M.M.B., 2010. Dietary antioxidants and long-term risk of dementia. *Archives of neurology*, 67, 819-825.
- Dikeman, C.L. Bauer, L.L., Flickinger, E.A., Fahey, G.C.Jr., 2005. Effects of stage of maturity and cooking on the chemical composition of select mushroom varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1130-1138.
- Dogan, H.H., & Aydin, S., 2013. Some biological activities of *Lactarius vellereus* (Fr.) Fr. in Turkey. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 16, 1279-1286.
- Dubost, N.J., Ou, B., Beelman, R.B., 2007. Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushroom and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chemistry*. 105, 727-735.
- Egwin, E.C., Elem, R.C., & Egwuche, R.U., 2011. Proximate composition, phytochemical screening and antioxidant activity of ten wild edible Nigerian mushrooms. *American Journal of Food and Nutrition*, 1, 89-94.
- Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B.J., Boobis, A., Carere, A., Kevekordes, S., Lhuguenot, J.C., Pieters, R., Kleiner, J., 2002. Methods of in vitro toxicology. *Food and Chemical Toxicology*. 40, 193-236
- Elliott, S.S., Keim, N.L., Stern, J.S., Teff, K., Havel, P.J., 2002. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome<sup>1-3</sup>. *The American Journal of Clinical Nutrition* 76: 911-922.
- Elmastas, M., Isildak, O., Turkecul, I., Temur, N., 2007. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis*. 20, 337-345.
- Ergönül, P.G., Akata, I., Kalyoncu, F., & Ergönül, B., 2013. Fatty acid compositions of six wild edible mushroom species. *The Scientific World Journal*, 2013, Article ID 163964, 4 pages.

- Espinel-Ingroff, A., 2001. Comparison of the E-test with the NCCLS M38-P method for antifungal susceptibility testing of common and emerging pathogenic filamentous fungi. *Journal of Clinical Microbiology*. 39, 1360-1367.
- Fang, Y.Z., Yang, S., Wu, G., 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18, 872-879.
- Faravin, J., Foppa, T., Oliveira, L.P., & Locatelli, C., 2013. Avaliação físico química e nutricional do cogumelo *Lactarius deliciosus*: aplicabilidade como alimento e ativo farmacológico. *Revista Extensão em Foco*, 1, 59-64.
- Fernandes, A., António, A.L., Barreira, J.C.M., Botelho, M.L., Oliveira, M.B.P.P., Martins, A., & Ferreira, I.C.F.R., 2013. Effects of gamma irradiation on the chemical composition and antioxidant activity of *Lactarius deliciosus* L. wild edible mushroom. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 2895-2903.
- Ferreira, F.A.G., 1994. *Nutrição Humana*. Fundação Calouste Gulbenkian, 2ª edição, Lisboa.
- Ferreira, I.C.F.R., 2011. *Biomoléculas em cogumelos silvestres: Estudo de caso*. Universidade do Minho. 3-21.
- Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Abreu, R.M.V., 2009. Antioxidants in Wild Mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, 16, 1543-1560.
- Finch, R.G., 1998. Antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 42, 125-128.
- Florianowicz, T., 2000. Inhibition of growth and sporulation of *Penicillium expansum* by extracts of selected Basidiomycetes. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 69, 263-267.
- Fomina, M.A., Alexander, I.J., Colpaert, J.V., & Gadd, G.M., 2005. Solubilization of toxic metal minerals and metal tolerance of mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 37, 851-866.

- Fuchs, F.D., 2004. Farmacologia Clínica – Fundamentos da terapêutica Racional. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Fugmann, B., Steffan, B., & Steglich, W., 1984. Necatorone, an alkaloidal pigment from the gilled toadstool *Lactarius necator* (agaricales). *Tetrahedron Letters*, 25, 3575-3578.
- Furlani, R.P.Z., Godoy, H.T., 2005. Nutritional value of edible mushrooms: a revision. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. 64, 149-154.
- Fürst, P., Kuhn, K.S., 2000. Fish oil emulsions: what benefits can they bring? *Clinical Nutrition*, 19, 7-14.
- Gary J. Samuels, G.J., 2006. *Trichoderma: Systematics, the Sexual State, and Ecology*. *Phytopathology*. 96, 195-206.
- Gern, R.M.M., Wisbeck, E., Rampinelli, J.R., Ninow, J.L., Furlan, S.A., 2008. Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. *Bioresource Technology*. 99, 76-82.
- Gibney, M.J., Vorster, H.H., Kok, F.J., 2002. *Introduction to Human Nutrition*, Blackwell Science, Oxford.
- Gill, E.E., Fast, N.M., 2006. Assessing the microsporidia-fungi relationship: Combined phylogenetic analysis of eight genes. *Gene*. 375, 103-109.
- Ginsburg, I., 2002. Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. *Lancet Infectious Diseases*. 2, 171-179.
- Gómez, P.M., 2011. *Vegetales silvestres de uso alimentario. Determinación de compuestos bioactivos y valoración de la capacidad antioxidante*. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Gonçalves, T.S., Schmitt, V.M., Thomas, M., Souza, M.A.L., Menezes, L.M., 2008. Cytotoxicity of Two Autopolymerized Acrylic Resins Used in Orthodontics. *The Angle Orthodontist*. 78, 926-930.
- Gordon, M.H., 1990. *Food antioxidants*. Elsevier Applied Food Science Series, London.

- Guidi, I., Galimberti, D., Lonati, S., Novembrino, C., Bamonti, F., Tiriticco, M., Fenoglio, C., Venturelli, E., Baron, P., Bresolin, N., 2006. Oxidative imbalance in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. 27, 262-269.
- Gursoy, N., Sarikurkcu, C., Cengiz, M., Solak, M.H., 2009. Antioxidant activities, metal contents, total phenolics and flavonoids of seven *Morchella* species. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2381-2388.
- Gutiérrez, R.M.P., 2005. Actividad antimicrobiana de ácidos grasos aislados de *Tubifex tubifex*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 36, 5-10.
- Hadar, Y., Cohen-Arazi, E., 1986. Chemical composition of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* produced by fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. 51, 1352-1354.
- Hagiwara, S., Takahashi, M., Shen, Y., Kaihou, S., Tomiyama, T., Yazawa, Y., Tamai, Y., Sin, Y., Kazusaka, A., Terazawa M., 2005. A phytochemical in the edible Tamigi-take mushroom (*Pleurotus cornucopiae*), D-mannitol, inhibits ACE activity and lowers the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 69: 1603-1605.
- Hamano, H., 1997. Functional properties of sugar alcohols as low-calorie sugar substitutes. *Food Industry and Nutrition*, 2, 1-6.
- Hatvani, N., 2001. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 17, 71-74.
- Hearst, R., Nelson, D., McCollum, G., Millar, B.C., Maeda, Y., Goldsmith, C.E., Rooney, P.J., Loughrey, A., Rao, J.R., Moore, J.E., 2009. An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. *Complementary Therapies in Clinical Practice*. 15, 5-7.

- Heilmann-Clausen, J., Verbeken, A., & Vesterholt, J., 1998. The Genus *Lactarius* – Fungi of Northern Europe. Danish Mycological Society, 2nd ed, Tilst.
- Heinonen, O.P., Albanes, D., Virtamo, J., Taylor, P.R., Huttunen, J.K., Hartman, A.M., Haapakoski, J., Malila, N., Rautalahti, M., Ripatti, S., Maenpaa, H., Teerenhovi, L., Koss, L., Virolainen, M., Edwards, B.K., 1998. Prostate cancer and supplementation with alpha-tocopherol and beta-carotene: incidence and mortality in controlled trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 90, 440-446.
- Heleno, S.A., Barros, L., Martins, A., Queiroz, M.J.R.P., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I.C.F.R. (2012). Phenolic, polysaccharidic, and lipidic fractions of mushrooms from Northeastern Portugal: Chemical compounds with antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 4634-4640.
- Heleno, S.A., Barros, L., Sousa, M.J., Martins, A., & Ferreira, I.C.F.R., 2009. Study and characterization of selected nutrients in wild mushrooms from Portugal by gas chromatography and high performance liquid chromatography. *Microchemical Journal*, 93, 195-199.
- Heleno, S.A., Barros, L., Sousa, M.J., Martins, A., Ferreira, I.C.F.R., 2010. Tocopherols composition of Portuguese wild mushrooms with antioxidant capacity. *Food Chemistry*. 119, 1443-1450.
- Heleno, S.A., Ferreira, I.C.F.R., Calhelha, R.C., Esteves, A.P., Martins, A., Queiroz, M.J.R.P., 2014. Cytotoxicity of *Coprinopsis atramentaria* extract, organic acids and their synthesized methylated and glucuronate derivatives. *Food Research International*, 55, 170-175.
- Heleno, S.A., Ferreira, I.C.F.R., Esteves, A.P., Ćirić, A., Glamočlija, J., Martins, A., Soković, M., Queiroz, M.J.R.P., 2013. Antimicrobial and demelanizing activity of *Ganoderma lucidum* extract, p-hydroxybenzoic and cinnamic acids and their synthetic acetylated glucuronide methyl esters. *Food and Chemical Toxicology*, 58, 95-100.

- Herrero, M., Castro-Puyana, M., Mendiola, J.A., Ibañez, E., 2013. Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 43, 67-83.
- Hirasawa, M., Shouji, N., Neta, T., Fukushima, K., Takada, K., 1999. Three kinds of antibacterial substances from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Shiitake, an edible mushroom). *International Journal of Antimicrobial Agents*. 11, 151-157.
- Itoh, N., Masuo, Y., Yoshida, Y., Cynshi, O., Jishage, K., Niki, E., 2006.  $\gamma$ -Tocopherol attenuates MPTP-induced dopamine loss more efficiently than  $\alpha$ -tocopherol in mouse brain. *Neuroscience Letters*. 403, 136-140.
- James, T.Y., Kauff, F., Schoch, C.L., Matheny, P.B., Hofstetter, V., Cox, C.J., Celio, G., Gueidan, C., Fraker, E., Miadlikowska, J., Lumbsch, H.T., Rauhut, A., Reeb, V., Arnold, A.E., Amtoft, A., Stajich, J.E., Hosaka, K., Sung, G.H., Johnson, D., O'Rourke, B., Crockett, M., Binder, M., Curtis, J.M., Slot, J.C., Wang, Z., Wilson, A.W., Schüssler, A., Longcore, J.E., O'Donnell, K., Mozley-Standridge, S., Porter, D., Letcher, P.M., Powell, M.J., Taylor, J.W., White, M.M., Griffith, G.W., Davies, D.R., Humber, R.A., Morton, J.B., Sugiyama, J., Rossman, A.Y., Rogers, J.D., Pfister, D.H., Hewitt, D., Hansen, K., Hambleton, S., Shoemaker, R.A., Kohlmeyer, J., Volkmann-Kohlmeyer, B., Spotts, R.A., Serdani, M., Crous, P.W., Hughes, K.W., Matsuura, K., Langer, E., Langer, G., Untereiner, W.A., Lücking, R., Büdel, B., Geiser, D.M., Aptroot, A., Diederich, P., Schmitt, I., Schultz, M., Yahr, R., Hibbett, D.S., Lutzoni, F., McLaughlin, D.J., Spatafora, J.W., Vilgalys, R., 2006a. Reconstructing the early evolution of the fungi using a six gene phylogeny. *Nature*. 443, 818-822.
- James, T.Y., Letcher, P.M., Longcore, J.E., Mozley-Standridge, S.E., Porter, D., Powell, M.J., Griffith, G.W., Vilgalys, R., 2006b. A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota). *Mycologia*. 98, 860-871.
- Joshi, S., Vishwakarma, M.P., Mahar, R., & Bhatt, R.P., 2013. Medicinally important and edible species of genus *Lactarius* from Garhwal Himalaya, India. *Mycosphere*, 4, 714-720.

- Kalac, P., 2009. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry*, 113, 9-16.
- Kalac, P., 2013. A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93, 209-218
- Kalemba, D., Krunicka, A., 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10, 813-829.
- Kalogeropoulos, N., Yanni, A.E., Koutrotsios, G., & Aloupi, M., 2013. Bioactive microconstituents and antioxidant properties of wild edible mushrooms from the Island of Lesvos, Greece. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 378-385.
- Karlinski, L., Ravnskov, S., Kieliszewska-Rokicka, B., & Larsen, J., 2007. Fatty acid composition of various ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas of Norway spruce. *Soil Biology & Biochemistry*, 30, 854-866.
- Kavishree, S., Hemavathy, J., Lokesh, B.R., Shashirekha, M.N., & Rajarathnam, S., 2008. Fat and fatty acids of Indian edible mushrooms. *Food Chemistry*, 106, 597-602.
- Kinnula, V.L., Crapo, J.D., 2004. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radical Biology and Medicine*. 36, 718-744.
- Kirk, P., Cannon, P.F., Minter, D.W., Stalpers, J.A., 2008. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. 10 ed. CAB International, Wallingford.
- Koch, A.L., 2003. Bacterial wall as target for attack: past, present, and future research. *Clinical Microbiology Reviews*. 16, 673-687.
- Koide, R.T., Shumway, D.L., & Stevens, C.M., 2000. Soluble carbohydrates of red pine (*Pinus resinosa*) mycorrhizas and mycorrhizal fungi. *Mycological Research*, 104, 834-840.

- Kok, T.M.C.M., Zwingman, I., Moonen, E.J., Schilderman, P.A.E.L., Rhijnsburger, E., Haenen, G.R.M.M., Kleinjans, J.C.S., 2003. Analysis of oxidative DNA damage after human dietary supplementation with linoleic acid. *Food and Chemical Toxicology*, 41, 351-358.
- Kruger, C.L., Mann, S.W., 2003. Safety evaluation of functional ingredients. *Food and Chemical Toxicology*. 41, 793-805.
- Kunin, C.M., 1993. Resistance to antimicrobial drugs – a worldwide calamity. *Annals of Internal Medicine*. 118, 557-561.
- Künsch, U., Scharer, H., Conedera, M., Sassella, A., Jermini, M., Jelmini, G., 1999. Quality assessment of chestnut fruits. *Acta Horticulturae*, 494, 119-127.
- Lee, C.Y.J., Wan, J.M.F., 2000. Vitamin E supplementation improves cell-mediated immunity and oxidative stress of Asian men and women. *Journal of Nutrition*. 130, 2932-2937.
- Lee, I.S., Nishikawa, A., 2003. *Polyozellus multiplex*, a Korean wild mushroom, as a potent chemopreventive agent against stomach cancer. *Life Sciences*. 73, 3225-3234.
- León-Guzmán, M.F., Silva, I., López, M.G., 1997. Proximate chemical composition, free amino acid contents, and free fatty acid contents of some wild edible mushrooms from Querétaro, México, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45, 4329-4332.
- Lindequist, U., Niedermeyer, T.H.J., Julich, W.D., 2005. The pharmacological potential of mushrooms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2, 285-299.
- Liu, R.H., 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *Journal of Nutrition*. 134, 3479-3485.
- Liukkonen-Lilja, H., Kuusi, T., Laaksovirta, K., Lodenius, M., & Piepponen, S., 1983. The effect of lead processing works on the lead, cadmium and mercury contents

- of fungi. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung, 176, 120-123.
- Lo, K.M., Cheung, P.C.K., 2005. Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. *alba*. Food Chemistry. 89, 533-539.
- Lobo, V., Phatak, A., Chandra, N., 2010. Free radicals and functional foods: impact on human health. Pharmacognosy Reviews. 4, 118-126.
- Longvah, P., Deosthale, Y.G., 1998. Compositional and nutritional studies on edible wild mushroom from northeast India. Food Chemistry. 63, 331-334.
- López-Bucio, J., Nieto-Jacobo, M.F., Ramírez-Rodríguez, V., Herrera-Estrella, L., 2000. Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. Plant Science. 160, 1-13.
- Lu, J., Lin, P.H., Yao, Q., Chen, C., 2010. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. Journal of Cellular and Molecular Medicine. 14, 840-860.
- Lux, D., Kammerer, L., Riihm, W., & Wirth, E., 1995. Cycling of Pu, Sr, Cs, and other longliving radionuclides in forest ecosystems of the 30-km zone around Chernobyl. The Science of the Total Environment, 173/174, 375-384.
- Luximon-Ramma, A., Bahorun, T., Crozier, A., 2003. Antioxidant action and phenolic and vitamin C contents of common Mauritian exotic fruits. Journal of the Science of Food and Agriculture, 83, 496-502.
- Luximon-Ramma, A., Bahorun, T., Crozier, A., Zbarsky, V., Datla, K.K., Dexter, D.T., Aruoma, O.I., 2005. Characterization of the antioxidant functions of flavonoids and proanthocyanidins in Mauritian black teas. Food Research International, 38, 357-367.
- Maga, J., 1981. Mushroom flavor, Journal of Agricultural and Food Chemistry. 29, 1-4.

- Mangialasche, F., Kivipelto, M., Mecocci, P., Rizzuto, D., Palmer, K., Winblad, B., Fratiglioni, L., 2010. High Plasma Levels of Vitamin E Forms and Reduced Alzheimer's Disease Risk in Advanced Age. *Journal of Alzheimer's Disease*, 20, 1029-1037.
- Manzi, P., Aguzzi, A., Pizzoferrato, L., 2001. Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chemistry*. 73, 321-325.
- Manzi, P., Gambelli, L., Marconi, S., Vivanti, V., Pizzoferrato, L., 1999. Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. *Food Chemistry*, 65, 477-482.
- Manzi, P., Marconi, P., Aguzzi, A., Pizzoferrato, L., 2004. Commercial mushrooms: Nutritional quality and effect of cooking. *Food Chemistry*. 84, 201-206.
- Marcincák, S., Popelka, P., Bystrický, P., Hussein, K., Hudecková K., 2005. Oxidative stability of meat and meat products after feeding of broiler chickens with additional amounts of vitamin E and rosemary. *Meso*. 7, 34-39.
- Martín-Belloso, O., Llanos-Barriobero, E., 2001. Proximate composition, minerals and vitamins in selected canned vegetable. *European Food Research and Technology*. 212, 182-187.
- Martínez de Aragón, J., 2005. Producción de esporocarpos de hongos ectomicorrícicos y valoración socioeconómica. Respuesta de estas comunidades a incendios forestales. Doctoral thesis, Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agraria, Univ. de Lleida, Lleida, Spain.
- Masaphy, S., 2005. External ultrastructure of fruit body initiation in *Morchella*. *Mycological Research*. 109, 508-512.
- Masaphy, S., Zabari, L., 2013. Observations on post-fire black morel ascocarp development in an Israeli burnt forest site and their preferred micro-sites. *Fungal Ecology*, 6, 316-318.

- Mattila, K.J., Asikainen, S., Wolf, J., Jousimies-Somer, H., Valtonen, V., Nieminen, M., 2000. Age, dental infections, and coronary heart disease. *Journal of Dental Research*. 79, 756-760.
- Mau, J.L., Lin, H.C., Chen, C.C., 2002. Antioxidant properties of several medicinal mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 6072-6077.
- Mishra, S. R., 2005. *Morphology of Fungi*. Discovery Publishing House, India.
- Morrissey, P.A., Sheehy, P.J.A., Gaynor, P., 1994. *Vitamin E*. American Journal of Clinical Nutrition, Bethesda.
- Münzenberger, B., Heilemann, J., Strack, D., Kottke, I., & Oberwinkler, F., 1990. Phenolics of mycorrhizas and non-mycorrhizal roots of Norway spruce. *Planta*, 182, 142-148.
- Niki, E., Traber, M.G., 2012. A history of vitamin E. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 6, 207-212.
- Novaes, M.R., Novaes, L.C., Melo, A., Recôva, V.L., 2007. Avaliação da toxicidade aguda do cogumelo *Agaricus sylvaticus*. *Comunicação em ciências da saúde*. 18, 227-236.
- Nuytinck, J., Verbeken, A., Rinaldi, A.C., Leonardi, M., Pacioni, C., & Comandini, O., 2004. Characterization of *Lactarius tesquorum* ectomycorrhizae on *Cistus* sp. and molecular phylogeny of related European *Lactarius* taxa. *Mycologia*, 96, 272-282.
- Oliveira, P., 2009. Mushroom poisoning. *Medicina Interna* 16: 253-363.
- Opal, S.M., Cohen, J., 1999. Clinical gram-positive sepsis: does it fundamentally differ from gram-negative bacterial sepsis?. *Critical Care Medicine*. 27, 1608-1616.
- Orhan, I., & Üstün, O., 2011. Determination of total phenol content, antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibition in selected mushrooms from Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 386-390.

- Orsine, J.V., Costa, R.V., Silva, R.C., Santos, M.F., Novaes, M.R., 2012. The acute cytotoxicity and lethal concentration (LC50) of *Agaricus sylvaticus* through hemolytic activity on human erythrocyte. *International Journal of Nutrition and Metabolism*, 4,19-23.
- Ozturk, I., Sahan, S., Sahin, U., Ekici, L., Sagdic, O., 2010. Bioactivity and mineral contents of wild-grown edible *Morchella conica* in the Mediterranean Region, 5, 453-457.
- Öztürk, M., Tel, G., Öztürk, F.A., & Duru, M.E., 2014. The Cooking Effect on Two Edible Mushrooms in Anatolia: Fatty Acid Composition, Total Bioactive Compounds, Antioxidant and Anticholinesterase Activities. *Records of Natural Products*, 8, 189-194.
- Özyürek, M., Bener, M., Güçlü, K., & Apak, R., 2014. Antioxidant/antiradical properties of microwave-assisted extracts of three wild edible mushrooms. *Food Chemistry*, 157, 323-331.
- Pace, A., Giannarelli, D., Galiè, E., Savarese, A., Carpano, S., Della Giulia, M., Pozzi, A., Silvani, A., Gaviani, P., Scaioli, V., Jandolo, B., Bove, L., Cognetti, F., 2010. Vitamin E neuroprotection for cisplatin neuropathy. *Neurology*, 74, 762-766.
- Pae M, Meydani SN, Wu D., 2012. The role of nutrition in enhancing immunity in aging. *Aging & Disease* 3: 91-129.
- Palacios, I., Lozano, M., Moro, C., D'Arrigo, M., Rostagno, M.A., Martínez, J.A., García-Lafuente, A., Guillamón, E., & Villares, A., 2011. Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 128, 674-678.
- Peres-Bota, D., Rodriguez, H., Dimopoulos, G., DaRos, A., Mélot, C., Struelens, M.J., Vincent, J.L., 2003. Are infections due to resistant pathogens associated with a worse outcome in critically ill patients? *Journal of Infection*. 47, 307-316.

- Perfect, J.R., 2006. *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. *FEMS Yeast Research*. 6, 463-468.
- Phillips, R., 2005. *Mushrooms and other Fungi of North America*. Firefly Books Ltd, 2ed, New York, USA.
- Phillips, R., 2006. *Mushrooms: A comprehensive guide to mushroom identification*. Macmillan, United Kingdom.
- Pittet, D., 2005. Infection control and quality health care in the new millennium. *American Journal of Infection Control*. 33, 258-267.
- Puttaraju, N.G., Venkateshaiah, S.U., Dharmesh, S.M., Urs, S.M.N., Somasundaram, R., 2006. Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 9764-9772.
- Quintas, A., Poncesm A., Halpern, M.J., 2008. *Bioquímica - Organização Molecular da Vida*. Lidel – Edições técnicas, Lisboa.
- Radford, A., J.H. Parish, J.H., 1997. The Genome and Genes of *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*. 21, 258-266.
- Ramakrishna, B.S., Varghese, R., Jayakumar, S., Mathan, M., Balasubramanian, K.A., 1997. Circulating antioxidants in ulcerative colitis and their relationship to disease severity and activity. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 12, 490-494.
- Ranzani, M.R.T.C., Sturion, G.L., 1998. Avaliação da composição em aminoácidos de *Pleurotus spp.* cultivados em folha de bananeira. *Archivos latinoamericanos de nutrición*. 48, 339-348.
- Rathee, S., Rathee, D., Rathee, D., Kumar, V., Rathee, P., 2012. Mushrooms as therapeutic agentes. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 22, 459-474.
- Redecker, D., Raab, P., 2006. Phylogeny of the Glomeromycota (arbuscular mycorrhizal fungi): recent developments and new gene markers. *Mycologia*. 98, 885-895.

- Reis, F.S., Heleno, S.A., Barros, L., Sousa, M.J., Martins, A., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I.C.F.R., 2011a. Toward the antioxidant and chemical characterization of mycorrhizal mushrooms from northeast Portugal. *Journal of Food Science*, 76, C824-830.
- Reis, F.S., Pereira, E., Barros, L., Sousa, M.J., Martins, A., & Ferreira, I.C.F.R., 2011b. Biomolecule profiles in inedible wild mushrooms with antioxidant value. *Molecules*, 16, 4328-4338.
- Reis, F.S., Stojkovic, D., Sokovic, M., Glamoclija, J., Ciric, A., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R., 2012. Chemical characterization of *Agaricus bohusii*, antioxidant potential and antifungal preserving properties when incorporated in cream cheese. *Food Research International*. 48, 620-626.
- Ribeiro, B., Andrade, P.B., Baptista, P., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R., Seabra, R.M., Valentão, P., 2008a. *Leucopaxillus giganteus* mycelium: effect of nitrogen source on organic acids and alkaloids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, 4769-4774.
- Ribeiro, B., Lopes, R., Andrade, P.B., Seabra, R.M., Gonçalves, R.F., Baptista, P., Quelhas, I., Valentão, P., 2008b. Comparative study of phytochemicals and antioxidant potential of wild edible mushroom caps and stipes. *Food Chemistry*. 110, 47-56.
- Ribeiro, B., Pinho, P.G., Andrade, P.B., Baptista, P., Valentão, P., 2009. Fatty acid composition of wild edible mushrooms species: A comparative study. *Microchemical Journal*. 93, 29-35.
- Ribeiro, B., Rangel, J., Valentão, P., Baptista, P., Seabra, R.M., Andrade, P.B., 2006. Contents of carboxylic acids and two phenolics and antioxidant activity of dried Portuguese wild edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 8530-8537.

- Ribeiro, B., Valentão, P., Baptista, P., Seabra, R.M., Andrade, P.B., 2007. Phenolic compounds, organic acids profiles and antioxidative properties of beefsteak fungus (*Fistulina hepatica*). *Food and Chemical Toxicology*. 45, 1805-1813.
- Román M, Boa E., 2004. Collection, marketing and cultivation of edible fungi in Spain. *Micologia Aplicada International* 16: 25-33.
- Román, M., Boa, E., Woodward, S., 2006. Wild-gathered fungi for health and rural livelihoods. *Proceedings of the Nutrition Society*. 65, 190-197.
- Rotzoll, N., Dunkel, A., Hofmann, T., 2006. Quantitative studies, taste reconstitution, and omission experiments on the key taste compounds in morel mushrooms (*Morchella deliciosa* Fr.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 2705-2711.
- Sadler, M., 2003. Nutritional properties of edible fungi. *Nutrition Bulletin*. 28, 305-308.
- Sas, K., Robotka, H., Toldi, J., Vecsei, L., 2007. Mitochondrial, metabolic disturbances, oxidative stress and kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *Journal of the Neurological Sciences*. 257, 221-239.
- Schussler, A., Schwarzott, D., Walker, C., 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research*. 105, 1413-1421.
- Seabra, R.M., Andrade, P.B., Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Bastos, M.L., 2006. Biomaterials from aquatic and terrestrial organisms. Science Publishers—Enfield (NH) Jersey Plymouth, New Hampshire.
- Senatore, F., Dini, A., Marino, A., Schettino, O., 1988. Chemical constituents of some basidiomycetes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 45, 337-345.
- Senter, S.D., Payne, J.A., Miller, G., Anagnosakis, S.L., 1994. Comparison of total lipids, fatty acids sugars and non-volatile organic acids in nuts from four *Castanea* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 65 , 223-227.
- Sies, H., 1993, Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*. 215, 213-219.

- Silva, B.M., Andrade, P.B., Gonçalves, A.C., Seabra, R.M., Oliveira, M.B., Ferreira, M.A., 2004. Influence of jam processing upon the contents of phenolics, organic acids and free amino acids in quince fruit (*Cydonia oblonga* Miller). *European Food Research and Technology* 218: 385–389.
- Silva, A.C., Jorge, N., 2011. Mushrooms: Bioactive Compounds and Antioxidant Properties. *UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde*. 13, 375-384.
- Simopoulos, A.P., 1991. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *American Journal of Clinical Nutrition*, 54, 438-463.
- Singh, U., Jialal, I., 2006. Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology* 13, 129-142.
- Smânia Jr., A., Monache, F.D., Smânia, E.F., Gil, M.L., Benchetrit, L.C., Cruz, F.S., 1995. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murrill. *Journal of Ethnopharmacology*. 45, 177-181.
- Smith, M.A., Rottkamp, C.A., Nunomura, A., Raina, A.K., Perry, G., 2000. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1502, 139-144.
- Soares, S.E., 2002. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*. 15, 71-81.
- Son, S.M., Moon, K.D., Lee, C.Y., 2000. Kinetic study of oxalic acid inhibition on enzymatic browning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 2071-2074.
- Soobrattee, M.A., Neergheen, V.S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O.I., Bahorun, T., 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanisms and actions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 579, 200-213.
- Steiner, M., 1991. Influence of vitamin E on platelet function in humans. *Journal of the American College of Nutrition*, 10, 466-473.

- Suortti, T., 1984. Stability of necatorin, a highly mutagenic compound from *Lactarius necator* mushroom. *Food and Chemical Toxicology*, 22, 579-581.
- Suortti, T., Wright, A., & Koskinena, A., 1983. Necatorin, a highly mutagenic compound from *Lactarius necator*. *Phytochemistry*, 22, 2873-2874.
- Suutari, M., 1995. Effect of growth temperature on lipid fatty acids of four fungi (*Aspergillus niger*, *Neurospora crassa*, *Penicillium chrysogenum* and *Trichoderma reesei*). *Archives of Microbiology*. 164, 212-216.
- T. Tsukatani, T., Suenaga, H., Shiga, M., Noguchi, K., Ishiyama, M., Ezoe, T., Matsumoto, K., 2012. Comparison of the WST-8 colorimetric method and the CLSI broth microdilution method for susceptibility testing against drug-resistant bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 90, 160-166.
- Tapiero, H., Ba, G.N., Couvreur, P., Tew, K.D., 2002. Polynsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56: 215-222.
- Tedesco, G., Galli, R., Carraro., 2009. Na electrophoretic approach to Basidiomycetes taxonomy: Intraspecific variability, varieties, ecological influences. *Plant Biosystems* 143: 301-310.
- Tenover, F.C., 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Infection Control*. 34, S3-S10.
- Thevelein, J.M., 1984. Regulation of trehalose metabolism in fungi. *Microbiological Reviews* 48: 42-59.
- Traber, M.G., Packer, L., 1995. Vitamin E: beyond antioxidant function. *American Journal of Clinical Nutrition*, 62, 1501S-1509S.
- Turkoglu, A., Duru, M.E., Mercan, N., Kivrak, I., Gezer, K., 2007. Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull) Murrill. *Food Chemistry*. 101, 267-273.

- Turkoglu, A., Kivrak, I., Mercan, N., Duru, M.E., Gezer, K., Turkoglu, H., 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of *Morchella conica* Pers. African Journal of Biotechnology, 5, 1146-1150.
- Unekwu, H.R., Audu, J.A., Makun, M.H., & Chidi, E.E., 2014. Phytochemical screening and antioxidant activity of methanolic extract of selected wild edible Nigerian mushrooms. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 4, S153-S157.
- Upston, J.M., Kritharides, L., Stocker, R., 2003. The role of vitamin E in atherosclerosis. Progress in Lipid Research. 42, 405-422.
- Valentão, P., Lopes, G., Valente, M., Barbosa, P., Andrade, P.B., Silva, B.M., Baptista, P., Seabra, R.M., 2005. Quantification of nine organic acids in wild mushrooms. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53, 3626-3630.
- Valgimigli, L., Pratt, D.A., 2012. Encyclopedia of Radicals in Chemistry, Biology and Materials. John Wiley and Sons, Inc, 3 ed, Chirchester.
- Valverde, M.E., Paredes-López, O., Pataky, J.K., Guevara-Lara, F., 1995. "Huitlacoche (*Ustilago maydis*) as a food source—biology, composition, and production". Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 35, 191-229.
- Vaughan, J.G., Geissler, C.A., 1997. The New Oxford Book of Food Plants. Oxford University Press, USA.
- 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.
- Verbeke, A., Stubbe, D., van de Putte, K., Eberhardt, U., & Nuytinck, J., 2014. Tales of the unexpected: angiocarpous representatives of the Russulaceae in tropical South East Asia. Persoonia, 32, 13-24.

- Vizzini, A., Ercole, E., Contu, M., 2012. A contribution to the ITS-LSU phylogeny of the genus *Leucopaxillus* (/tricholomatoid clade, Agaricales), with three new genera and notes on *Porpoloma*. *Mycosphere* 3: 79-90.
- Voet, D., Voet, J.G., 2004. *Biochemistry*. Wiley & Sons, 3 ed, Hoboken.
- Wang, D., Sakoda, A., Suzuki, M., 2001. Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. *Bioresource Technology*. 78, 293-300.
- Wang, X.M., Zhang, J., Wu, L.H., Zhao, Y.L., Li, T., Li, J.Q., Wang, Y.Z., Liu, H.G., 2014. A mini-review of chemical composition and nutritional value of edible wild-grown mushroom from China. *Food Chemistry*. 151, 279-285.
- Wasser, S.P., Weiss, A.L., 1999. Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 1, 31-62.
- Weber, R., Kuhn, A., Anke, H., 2003. Soil-borne *Penicillium* ssp. and other microfungi as efficient degraders of the explosive RDX (hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine). *Mycological Progress* 2: 83-93.
- Whittaker, R.H., 1969. New concepts of kingdoms or organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. *Science*. 163, 150-160.
- Wong, J.H., Ng, T.B., Cheung, R.C.F., Ye, X.J., Wang, H.X., Lam, S.K., Lin, P., Chan, Y.S., Fang, E.F., Ngai, P.H.K., Xia, L.X., Ye, X.Y., Jiang, Y., Liu, F., 2010. Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87, 1221-1235.
- Xu, X., Yan, H., Chen, J., Zhang, X., 2011. Bioactive proteins from mushrooms. *Biotechnology Advances*. 29, 667-674.
- Yang, J.H., Lin, H.C., Mau, J.L., 2001. Non-volatile taste components of several commercial mushrooms, *Food Chemistry*. 72, 465-471.

- Yilmaz, N., Solmaz, M., Turkekul, I., Elmastas, M., 2006. Fatty acid composition in some wild edible mushrooms growing in the middle Black Sea region of Turkey. *Food Chemistry*. 99, 168-174.
- Yin, J. Z., & Zhou, L.X., 2008. Analysis of nutritional components of 4 kinds of wild edible fungi in Yunnan. *Food Research and Development*, 29, 133-136.
- Yoshioka, Y., Tamesada, M., Tomi, H., 2010. A repeated dose 28-day oral toxicity study of extract from cultured *Lentinula edodes* mycelia in Wistar rats. *Journal of Toxicological Sciences*. 35,785-91.
- Zisova, L.G., 2009. *Malassezia* species and seborrheic dermatitis. *Folia Medica*. 51, 23-33.

## Websites

- (Web 1) [http://www.micologia.net/gallery2/main.php?g2\\_itemId=57885&g2\\_imageViewsIndex=1](http://www.micologia.net/gallery2/main.php?g2_itemId=57885&g2_imageViewsIndex=1) Acedido a 17 de fevereiro, 2014.
- (Web 2) [http://pt.wikipedia.org/wiki/Lactarius\\_citriolens](http://pt.wikipedia.org/wiki/Lactarius_citriolens) Acedido a 17 de fevereiro, 2014.
- (Web 3) [http://www.micologia.net/gallery2/main.php?g2\\_itemId=57223](http://www.micologia.net/gallery2/main.php?g2_itemId=57223) Acedido a 17 de fevereiro, 2014.
- (Web 4) [http://eurofunghi.pt/web/index.php?option=com\\_djcatalog2&view=item&id=6:morchella-conica&cid=1:cogumelos-frescos&Itemid=7](http://eurofunghi.pt/web/index.php?option=com_djcatalog2&view=item&id=6:morchella-conica&cid=1:cogumelos-frescos&Itemid=7) Acedido a 12 de fevereiro, 2014.
- (Web 5) <http://www.chemicalize.org/structure/#!/mol=glucose&source=calculate> Acedido a 15 de fevereiro, 2014.
- (Web 6) <http://www.chemicalize.org/structure/#!/mol=mannitol&source=calculate> Acedido a 15 de fevereiro, 2014.
- (Web 7) <http://www.chemicalize.org/structure/#!/mol=trehalose&source=calculate> Acedido a 15 de fevereiro, 2014.
- (Web 8) <http://www.chemicalize.org/search/#m=hydroxybenzoic%20acid/t=t/h=0/c=7976/p=0> Acedido a 19 de fevereiro, 2014.
- (Web 9) <http://www.chemicalize.org/structure/#!/mol=hydrocinnamic+acid&source=calculate> Acedido a 19 de fevereiro, 2014.

- (Web 10) [http://en.wikipedia.org/wiki/Oxalic\\_acid](http://en.wikipedia.org/wiki/Oxalic_acid) Acedido a 15 de fevereiro, 2014.
- (Web 11) [http://en.wikipedia.org/wiki/Quinic\\_acid](http://en.wikipedia.org/wiki/Quinic_acid) Acedido a 15 de fevereiro, 2014.
- (Web 12) [http://en.wikipedia.org/wiki/Malic\\_acid](http://en.wikipedia.org/wiki/Malic_acid) Acedido a 15 de fevereiro, 2014.
- (Web 13) [http://en.wikipedia.org/wiki/Citric\\_acid](http://en.wikipedia.org/wiki/Citric_acid) Acedido a 15 de fevereiro, 2014.
- (Web 14) [http://en.wikipedia.org/wiki/Fumaric\\_acid](http://en.wikipedia.org/wiki/Fumaric_acid) Acedido a 15 de fevereiro, 2014.
- (Web 15) [http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2010/amr\\_20100820/en/index.html](http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2010/amr_20100820/en/index.html) Acedido a 12 de fevereiro, 2014.

Os resultados desta dissertação foram:

**- Organizados em três publicações científicas:**

Vanessa Vieira, Ângela Fernandes, Lillian Barros, Jasmina Glamočlija, Ana Ćirić, Dejan Stojković, Anabela Martins, Marina Soković, Isabel C.F.R. Ferreira. Wild *Morchella conica* Pers. from different origins: A comparative study of nutritional and bioactive properties. Submetido à revista Journal of the Science of Food and Agriculture.

Vanessa Vieira, Lillian Barros, Anabela Martins, Isabel C.F.R. Ferreira. Expanding the knowledge on chemical composition and antioxidant activity of *Lactarius* genus. Submetido à revista Food Bioscience.

Vanessa Vieira, Lillian Barros, Anabela Martins, Isabel C.F.R. Ferreira. Not all has been reported about *Leucopaxillus candidus* (Bres.) Singer wild mushroom: updating nutritional, chemical and antioxidant information. Submetido à revista BioMed Research International.

**- Divulgados em vários congressos:**

Vanessa Vieira, Ricardo C. Calhelha, Filipa S. Reis, Lillian Barros, Maria João Sousa, Maria João R.P. Queiroz, Anabela Martins, Isabel C.F.R. Ferreira. Propriedades nutricionais, químicas e bioativas de duas espécies silvestres do género *Leccinum* provenientes do Nordeste Transmontano. 1º Encontro de jovens investigadores do Instituto Politécnico de Bragança, 15 de novembro de 2013. Comunicação oral.

Vanessa Vieira, Filipa S. Reis, Anabela Martins, Isabel C.F.R. Ferreira. Evaluation of human tumor cell lines growth inhibition by *Leccinum vulpinum* Watling and *Suillus granulatus* (L.) Roussel. 1st Symposium on Medicinal Chemistry of University of Minho, 17 de Maio de 2013. Comunicação em Painel.

Vanessa Vieira, Filipa S. Reis, Ricardo C. Calhelha, Anabela Martins, Isabel C.F.R. Ferreira. Antioxidant properties of two *Lactarius* wild species from Northeast of

Portugal, 1st Symposium on Medicinal Chemistry of University of Minho, 17 de Maio de 2013. Comunicação em Painel.

Filipa S. Reis, Vanessa Vieira, Lilian Barros, Anabela Martins, Dejan Stojkovic, Marina Sokovic, Ana Ciric, Jasmina Glamoclija, Isabel C.F.R. Ferreira. Chromatographic analyses of nutraceuticals in the wild mushrooms *Suillus granulatus* from different origins. 8º Encontro Nacional de Cromatografia, Covilhã, 2 a 4 de dezembro de 2013, Comunicação em Painel.