

Lillian Bouçada de Barros

**Propriedades Antioxidantes de Cogumelos Silvestres
Comestíveis**

Trabalho submetido à Universidade de
Salamanca para a obtenção do grau de
Suficiência de investigadora

Universidade de Salamanca
2006

Agradecimentos

Desejo agradecer a todos os que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, em particular:

À Doutora Isabel Ferreira, pela supervisão deste trabalho, bem como pelos conselhos e sugestões dadas ao longo da realização deste.

Ao Professor Doutor Celestino Santos Buelga, por ter aceite este tema de trabalho e pelo apoio prestado.

À Mestre Paula Baptista pelos conselhos e sugestões dadas no domínio dos Cogumelos.

À Eng. Daniela Correia, por todo o apoio e ajuda dada no decorrer da elaboração deste trabalho.

A todos os restantes elementos pertencentes ao projecto de investigação, no qual este trabalho está inserido.

Aos meus pais e irmã, por sempre me incentivarem e apoiarem durante toda a minha formação, quer académica como profissional.

À minha família, pelo incentivo e apoio dado ao longo dos anos.

E finalmente, queria agradecer ao Pedro, a ajuda e o incentivo dado na realização deste trabalho.

Este trabalho está inserido no âmbito do
projecto POCI/AGR/56661/2004,
Financiado pela FCT (Fundação para a Ciência
e Tecnologia).

Resumo

Devido à grande intensidade de colheita de cogumelos em determinadas regiões de Portugal e Espanha, o incentivo à investigação nesta matriz, assume particular destaque, em especial no que concerne ao estudo das propriedades bioactivas.

Neste trabalho avaliou-se a actividade antioxidante de cinco espécies diferentes de cogumelos silvestres comestíveis provenientes do Nordeste de Portugal, *Agaricus arvensis*, *Lactarius deliciosus*, *Leucopaxillus giganteus*, *Sarcodon imbricatus* e *Tricholoma portentosum*.

Nas espécies de *A. arvensis*, *L. giganteus* e *S. imbricatus*, efectuaram-se ensaios químicos e enzimáticos para determinar a capacidade de remoção de radicais livres, o poder redutor, a inibição da hemólise em eritrócitos de animais e a inibição da peroxidação lipídica. Procedeu-se também à quantificação de algumas moléculas bioactivas, nomeadamente compostos fenólicos, ácido ascórbico, β -caroteno e licopeno, responsáveis pelas propriedades antioxidantes avaliadas.

Verificou-se que o *L. giganteus* revelou melhores propriedades antioxidantes que o *S. imbricatus* e *A. arvensis*, facto que está de acordo com o conteúdo mais elevado de fenóis encontrado na primeira espécie. As quantidades detectadas de ácido ascórbico, β -caroteno e licopeno foram apenas vestigiais. Os diferentes testes de avaliação de actividade antioxidante evidenciaram um mecanismo de acção idêntico.

Foi efectuado também um estudo comparativo entre o carpóforo inteiro, o chapéu e o estipe para as espécies de *L. deliciosus* e *T. portentosum*. Determinou-se o seu conteúdo em fenóis totais, poder redutor e capacidade bloqueadora de radicais livres. Ambas as espécies revelaram potencial antioxidante, mas *L. deliciosus* provou ser a mais activa. A porção do cogumelo utilizada também teve influência nos resultados obtidos, tendo o chapéu revelado um maior efeito antioxidante relativamente ao estipe.

Índice

Introdução.....	1
1.1. Radicais livres e Antioxidantes	1
1.2. Os Cogumelos como fonte de antioxidantes	3
1.3. O Nordeste de Portugal e a colheita de cogumelos	5
1.4. Identificação de cogumelos	7
1.4.1. <i>Agaricus arvensis</i>	8
1.4.2. <i>Lactarius deliciosus</i>	9
1.4.3. <i>Leucopaxillus giganteus</i>	10
1.4.4. <i>Sarcodon imbricatus</i>	11
1.4.5. <i>Tricholoma portentosum</i>	12
Objectivos.....	14
Material e métodos	15
3.1. Reagentes e padrões.....	15
3.2. Amostragem	15
3.3. Preparação das amostras	16
3.4. Determinação de compostos antioxidantes: compostos fenólicos totais, ácido ascórbico, β -caroteno e licopeno	16
3.5. Poder redutor	17
3.6. Efeito bloqueador nos radicais de DPPH	18
3.7. Inibição da hemólise de eritrócitos mediada por radicais livres peroxilo	19
3.8. Actividade antioxidante pelo sistema β -caroteno-linoleato	19
Resultados e discussão	21
4.1. Actividade antioxidante de carpóforos inteiros: <i>Leucopaxillus giganteus</i> , <i>Sarcodon imbricatus</i> e <i>Agaricus arvensis</i>	21
4.1.1. Determinação de compostos antioxidantes	22
4.1.2. Poder redutor	23
4.1.3. Efeito bloqueador de radicais de DPPH.....	24
4.1.4. Inibição da hemólise de eritrócitos mediada por radicais livres peroxilo...	25
4.1.5. Actividade antioxidante (sistema β -caroteno-linoleato)	26
4.2. Actividade antioxidante de carpóforos inteiros, chapéu e estipe: <i>L. deliciosus</i> e <i>T. portentosum</i>	29
4.2.1. Determinação de Fenóis totais.....	29

4.2.2. Poder redutor	30
4.2.3. Efeitos bloqueadores dos radicais de DPPH	32
Conclusão	35
Referências Bibliográficas.....	37

Índice de Ilustrações

FIGURA 1. LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DO PARQUE NATURAL DE MONTESINHO.....	5
FIGURA 2. <i>AGARICUS ARVENSIS</i>	8
FIGURA 3. <i>LACTARIUS DELICIOSUS</i>	9
FIGURA 4. <i>LEUCOPAXILLUS GIGANTEUS</i>	10
FIGURA 5. <i>SARCODON IMBRICATUS</i>	11
FIGURA 6. <i>TRICHOLOMA PORTENTOSUM</i>	12
TABELA 1. PESO FRESCO, PESO SECO E PERCENTAGEM DE HUMIDADE CORRESPONDENTE A CADA COGUMELO.	21
TABELA 2. CONTEÚDO DE FENÓIS TOTAIS, ÁCIDO ASCÓRBICO, β -CAROTENO E LICOPENO NOS EXTRACTOS DE COGUMELOS.	22
FIGURA 7. PODER REDUTOR DOS EXTRACTOS METANÓLICOS DE COGUMELOS.....	23
FIGURA 8. EFEITO BLOQUEADOR (%) DOS EXTRACTOS METANÓLICOS DE COGUMELOS NOS RADICAIS DPPH.	25
FIGURA 9. INIBIÇÃO DA HEMÓLISE (%) DOS EXTRACTOS METANÓLICOS DE COGUMELOS.....	26
FIGURA 10. ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE (%) DOS EXTRACTOS METANÓLICOS DE COGUMELOS PELO SISTEMA B-CAROTENO-LINOLEATO.....	27
TABELA 3. VALORES ^{A,B,C,D} DE EC ₅₀ (MG/ML) DOS EXTRACTOS DE COGUMELOS NA AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE.	28
TABELA 4. PESO FRESCO, PESO SECO E PERCENTAGEM DE HUMIDADE CORRESPONDENTE A CADA COGUMELO.	29
TABELA 5. FENÓIS TOTAIS EM EXTRACTOS METANÓLICOS DE DOIS COGUMELOS SILVESTRES COMESTÍVEIS.	30
FIGURA 11. PODER REDUTOR DOS EXTRACTOS METANÓLICOS DE <i>L. DELICIOSUS</i>	31
FIGURA 12. PODER REDUTOR DOS EXTRACTOS METANÓLICOS DE <i>T. PORTENTOSUM</i>	31
FIGURA 13. EFEITO BLOQUEADOR (%) DOS EXTRACTOS METANÓLICOS DE <i>L.DELICIOSUS</i> NOS RADICAIS DPPH.	32
FIGURA 14. EFEITO BLOQUEADOR (%) DOS EXTRACTOS METANÓLICOS DE <i>T. PORTENTOSUM</i> NOS RADICAIS DPPH.	33
TABELA 6. VALORES ^{A,B} DE EC ₅₀ (MG/ML) DE PODER REDUTOR E EFEITO BLOQUEADOR DE DPPH OBTIDOS PARA OS EXTRACTOS DE COGUMELOS.	34



Cap. 1

Introdução

1.1. Radicais livres e Antioxidantes

A formação de radicais livres está associada ao metabolismo natural das células aeróbias. O consumo do oxigénio inerente ao crescimento das células conduz à geração de uma série de radicais livres de oxigénio. A interação destas espécies com moléculas de natureza lipídica produz novos radicais: hidroperóxidos e diferentes peróxidos (Aust & Sringen, 1982; Pryor, Lightsey, & Prier, 1982; Torel, Cillard, & Cillard, 1986). Este grupo de radicais (superóxido, hidroxilo e peróxidos lipóides) podem interagir com sistemas biológicos de uma forma claramente citotóxica. A este respeito, os flavonóides e os fenóis já demonstraram possuir uma actividade antioxidante considerável contra estes radicais, baseada principalmente nas propriedades redox dos seus grupos hidroxilo (Bors & Saran, 1987; Visioli, Bellomo, & Galli, 1998; Visioli, Bellosta, & Galli, 1998). Os radicais livres e a sua produção descontrolada são, de facto, responsáveis por diversos processos patológicos, tais como determinados tumores (cancro da próstata e do cólon) (Keys, 1995) e doenças coronárias (Lipworth et al., 1997).

As células dos mamíferos possuem defesas intracelulares como a superóxido dismutase, a catalase ou a glutathione peroxidase, que as protegem de níveis excessivos de radicais livres. A adição de compostos exógenos, nomeadamente vitaminas (A, E, β -caroteno), minerais (selénio, zinco) e proteínas (transferrina, ceruleoplasmina, albumina) pode constituir uma protecção adicional (Ostrovidov et al., 2000). Estes antioxidantes naturais capazes de neutralizar radicais livres podem ter um papel central na prevenção de doenças vasculares, algumas formas de cancro (Halliwell, 1997) e de stress oxidativo responsável por danos no ácido desoxirribonucleico (ADN) e nas proteínas. Apesar de não estar completamente esclarecido quais os componentes activos que reagem contra os radicais livres após a sua absorção celular e metabolismo, os ensaios de bloqueamento de radicais tem sido muito utilizados devido ao facto de



efectuarem *screenings* rápidos de actividade antioxidante de materiais de interesse (Nakayama, Yamada, Osawa, & Kawakishi, 1993).

Recentemente, a suspeita de toxicidade associada a alguns compostos antioxidantes sintéticos usados nos alimentos, suscitou o interesse por produtos naturais com as mesmas funções (Fukushima & Tsuda, 1985; Stone et al., 2003). Algumas indústrias, nomeadamente aquelas relacionadas com a produção de aditivos alimentares, cosméticos e farmacêuticos aumentaram os seus esforços no sentido de obter compostos bioactivos de origem natural após extracção e purificação. Os compostos antioxidantes podem eliminar radicais livres, retardando o processo de peroxidação dos lipídios que é uma das principais razões para a deterioração de produtos alimentares durante o processo de armazenamento afectando a cor, o sabor, a textura e o valor nutricional (Halliwell, 1997; Halliwell & Gutteridge, 1999).

Assim, a identificação de fontes naturais e seguras de antioxidantes, nomeadamente nos alimentos de origem vegetal, tem aumentado consideravelmente (Skerget et al., 2005). Os vegetais e as frutas são fontes ricas de antioxidantes tais como a vitamina A, a vitamina C, a vitamina E, os carotenóides, compostos fenólicos, como flavonóides (Diplock et al., 1998), que previnem os malefícios dos radicais livres reduzindo o risco de doenças crónicas. Portanto, o consumo destes antioxidantes dietéticos torna-se benéfico pois impede doenças cardiovasculares, especialmente aterosclerose (Hu, 2000).



1.2. Os Cogumelos como fonte de antioxidantes

Chang e Miles (1992) definem “cogumelo” como “um macrofungo que possui um corpo frutificante destacado que pode ser hipógeo (aéreo) ou epígeo (subterrâneo), com um tamanho visível a olho nú e que pode ser colhido à mão”. Do ponto de vista taxonómico, normalmente são basidiomicetes embora algumas espécies de cogumelos pertençam à classe dos ascomicetes (Lidequist, Niedermeyer, & Jülich, 2005).

O número de espécies de cogumelos na terra é aproximadamente 140000, conhecendo-se apenas 10% deste total. Assumindo que a proporção de cogumelos utilizados é de apenas 5%, pode-se deduzir que existem cerca de 7000 espécies de cogumelos desconhecidos que poderão ter benefício para o ser humano (Hawksworth, 2001). Até mesmo entre as espécies conhecidas, a proporção de cogumelos que têm tido qualquer tipo de estudo é muito baixa. Este facto, juntamente com o conhecimento do grande potencial dos fungos para produção de metabolitos bioactivos [por exemplo, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Tolyptocladium inflatum* W. Gams, *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul.], a sua utilização em etnomedicina, a necessidade ecológica dos fungos para produção de metabolitos secundários bioactivos e a possibilidade de melhorar as análises genéticas, farmacológicas e químicas levou a assumir que os cogumelos têm um grande potencial para a bioprosperidade (Lidequist, Niedermeyer, & Jülich, 2005).

Durante séculos, os cogumelos têm sido amplamente utilizados na dieta alimentar devido ao seu sabor único e às suas capacidades nutricionais. Actualmente são reconhecidos não só como bons alimentos, mas também como fonte de benefícios fisiológicos e medicinais (Sagakami, Aohi, Simpson, & Tanuma, 1991; Chang, 1996).

Os cogumelos têm também mostrado ser activos em várias terapias, nomeadamente tratamentos antitumorais, antibacterianos, antivirais, hematológicos e imunomoduladores. Em particular, na China, Japão, Coreia, Rússia, Estados Unidos e Canadá têm sido usados contra cancro de estômago, esófago, pulmões, etc. Quer os componentes celulares, quer os metabolitos secundários de vários cogumelos mostraram afectar o sistema imunológico do hospedeiro, podendo assim ser usados para tratar várias doenças (Wasser, & Weis, 1999).



Estes organismos contêm vários compostos polifenólicos reconhecidos como excelentes antioxidantes devido à sua habilidade para eliminar radicais livres por transferência de electrões (Hirano et al., 2001). Alguns cogumelos comestíveis, consumidos extensamente na cultura asiática, têm sido muito procurados por possuírem uma actividade antioxidante que está directamente correlacionada com seu índice fenólico total (Cheung & Cheung, 2005; Cheung, Cheung, & Ooi, 2003; Lo & Cheung, 2005; Mau, Chang, Huang, & Chen 2004; Mau, Lin & Song, 2002; Yang, Lin, & Mau, 2002; Yen & Hung, 2000).

As propriedades antioxidantes e bloqueadoras de radicais livres, por parte de compostos fenólicos de extractos metanólicos de cogumelos, têm sido recentemente descritas, sugerindo um papel protector destes compostos relacionado com a sua capacidade para quelatar metais, inibir a lipoxigenase e bloquear radicais livres (Mau, Chang, Huang, & Chen, 2004). Recentemente, Valentão et al. (2005) identificou a presença de seis compostos fenólicos (ácido 3-, 4- e 5-O- cafeoilquínico, ácido caféico, ácido p-cumárico e rutina) e cinco ácidos orgânicos (ácido cítrico, ascórbico, málico, shiquímico e fumárico) num cogumelo silvestre comestível *Cantharellus cibarius* Fr., mantido em quatro condições diferentes (seco, congelado, armazenado em azeite e em vinagre). Os ácidos orgânicos, como o cítrico, cetoglutárico, málico, succinato, oxálico, ascórbico, quínico, shiquímico e fumárico também foram encontrados em cogumelos silvestres comestíveis como: *Amanita caesarea* (Scop.) Pers., *Boletus edulis* Bull., *Gyroporus castaneus* (Bull.) Quéél., *Lactarius deliciosus* (L.) Gray, *Suillus collinitus* (Fr.) Kuntze and *Xerocomus chrysenteron* (Bull.) Quéél. (Valentão et al., 2006).



Geologicamente, constitui uma das mais complexas áreas do nosso País. A diversidade geológica, climática e orográfica que caracterizam o PNM condicionou o aparecimento de numerosas unidades vegetais. Os bosques caducifólios de carvalho negral (*Quercus pyrenaica*), os bosques perenifólios de *Quercus rotundifolia* (azinheira) e as linhas de vegetação arbórea higrófila (freixiais, amiais, choupais e salgueirais) constituem as principais unidades de vegetação arbórea autóctone, representando os dois primeiros grupos cerca de 10% (7 400 ha) da superfície total desta Área Protegida.

Em grande parte da área do Parque, tem-se assistido a uma degradação das áreas ocupadas pelo carvalhal e pelo sardoal, provocada pelos fogos sucessivos e cortes rasos para obtenção de combustível lenhoso.



1.4. Identificação de cogumelos

Para identificar e distinguir as diferentes espécies de cogumelos é necessário conhecer as suas características macroscópicas, microscópicas e organolépticas.

Um cogumelo, na maioria dos casos, tem forma de guarda-chuva, é constituído por um chapéu (ou píleo) e um pé (ou estipe). Por debaixo do chapéu tem uma superfície mole, o himénio, onde se produzem os esporos. O himénio pode apresentar muitas formas variadas: lâminas ou lamelas (semelhante às folhas de um livro), tubos e poros, pregas mais ou menos definidas, superfícies lisas, etc. É preciso ter em conta que as lamelas variam no modo de união ao pé e mesmo na cor. Uma espécie pode apresentar diferentes cores conforme o estado de maturação em que se encontra (Martins, 2004). O chapéu dos cogumelos pode apresentar diferentes variações na forma e na cor: plano, ogival, campanulado, cónico, convexo, deprimido, umbonado, mamilonado, infundibuliforme e umbilicado. O mesmo pode ocorrer com o pé: forma de radicante, sub-radicante, bolboso, inchado, bulbo-marginado. O pé tem duas estruturas determinantes na identificação dos cogumelos: a volva e o anel. O anel encontra-se no meio do pé, enquanto que a volva está na base e assemelha-se a uma série de anéis sobrepostos. A consistência do corpo também pode variar: carnosos, cartilagosos ou gelatinosos (Soliño, Rodriguez & Castro, 2001). Um aspecto muito importante na identificação de cogumelos é as características organolépticas: o cheiro, a cor, o sabor, etc.

Os cogumelos são considerado um alimento de risco, quando não se conhece a espécie, portanto para se identificar as diferentes espécies de cogumelos comestíveis é necessário ter em conta as suas características ecológicas, morfológicas, macroscópicas e organolépticas, antes do seu consumo (Beuchat, 1987).



1.4.1. *Agaricus arvensis*

O *Agaricus arvensis* (Schaeff.:Fr.) (figura 2) pertence ao filo: Basidiomycota, classe Basidiomycetes, ordem Agaricales, família Agaricaceae e género *Agaricus*.

É um cogumelo comestível e é conhecido por bola de neve. Tem um odor doce, observando-se melhor esta característica no cogumelo jovem e fresco. O *A. arvensis* pode ser encontrado em prados e em pastagens, e tem tendência para descorar a amarelo quando esmagado. O *A. arvensis* é muitas vezes confundido com o *Agaricus xanthodermus* que é uma espécie tóxica.



Figura 2. *Agaricus arvensis*

O chapéu é globular e ovóide no início, tornando-se depois convexo e atingindo um diâmetro de 6-21 cm. A sua superfície é lisa, mas em tempo seco torna-se rachada, a cutícula é branca pura, com tonalidades amareladas. Possui uma margem encurvada no início do seu desenvolvimento, tornando-se mais direita na maturidade. Contém um corpo consistente e firme, mas torna-se mais afável com a idade. Tem odor e gosto a erva-doce quando fresco.

O *A. Arvensis* tem numerosas lâminas livres, com cores que variam desde o cinzento rosado ao castanho-escuro; esta variação depende do grau de desenvolvimento do cogumelo. O pé é cilíndrico e robusto, a sua base é dilatada e cónica e tem uma altura de 4-14 cm e 1-3,5 cm de diâmetro. A superfície do pé é lisa no ápice e de cor branca, por



vezes apresenta películas dispersas e ocasionalmente torna-se amarelado. O cogumelo possui uma argola membranosa, na parte inferior ao chapéu. Possui esporos com diâmetro de 6.5-9.0 X 4.5-6 μm , elípticos, lisos e com uma cor castanha.

As frutificações iniciam-se no fim do Outono, terminam no início do Inverno e voltam a aparecer na primavera (Santos, 2001).

1.4.2. *Lactarius deliciosus*

O *Lactarius deliciosus* (L.) Gray (figura 3) pertence ao filo: Basidiomycota, classe: Basidiomycetes, ordem: Russulales, família: Russulaceae e género: *Lactarius*.

É uma espécie comestível e complexa, mas facilmente reconhecida no campo, pela estrutura do corpo frutificante em forma de vaso (na maturidade), pela sua cor laranja com manchas verdes concêntricas e pelo seu habitat – *Pinus pinaster*.

O chapéu tem forma convexa com uma margem muito encurvada, paulatinamente vai-se tornando plano e na maturação adquire uma forma mais plana, que facilmente atinge um tamanho de 20 cm de diâmetro. A superfície quando se encontra húmida torna-se viscosa.



Figura 3. *Lactarius deliciosus*

A superfície é de cor laranja, com zonas concêntricas mais evidentes até à margem. A cor laranja vai enfraquecendo com maturidade e frequentemente aparecem os tons esverdeados, sendo estes predominantes durante a maturidade. O corpo é alaranjado, e ao cortar liberta um látex laranja. Quando o corpo é danificado forma-se uma cor



amarela/alaranjada passando logo para uma cor verde devido à oxidação, resultando um sabor ligeiramente amargo.

O *L. deliciosus* possui lâminas frágeis, de cor laranja tornando-se esverdeado com a maturidade. O pé é curto, com uma altura de 3-6 cm e robusto. Tem um diâmetro de 1.5-2.5 cm e a base do pé apresenta-se por vezes uniforme ou dilatada. A cor do estipe é laranja, com manchas circulares. Os seus esporos têm um tamanho de 7.5-11 x 6-7.5 μm , amplamente elíptico, com reticulações amilóides.

Esta espécie aparece junto de pinheiros e as suas frutificações iniciam-se no fim do Outono até meados do Inverno, especialmente nos anos de muito chuva durante o mês de Setembro (Santos, 2001).

1.4.3. *Leucopaxillus giganteus*

O *Leucopaxillus giganteus* (Sowerby) Singer (figura 4) pertence ao filo: Basidiomicota, classe: Basidiomicetes, ordem: Agaricales, família: Tricholomataceae e género: *Leucopaxillus*.

O *L. giganteus* é um cogumelo comestível e é dificilmente confundida devido á cor do estipe ser muito pouco comum. Tem um chapéu com 10-40 cm de diâmetro com forma umbilical e apresenta uma depressão central e a sua textura é seca. A superfície é lisa de cor branca que vai escurecendo com a maturidade.



Figura 4. *Leucopaxillus giganteus*



Tem lâminas finas que se apresentam muito fechadas entre elas e possuem uma cor branca que vai escurecendo com a idade para uma cor creme. O pé é massivo, fino e curto com uma altura de 4-10 cm, e possui fibrilhas muito pequenas. A superfície tem uma textura seca e apresenta a mesma tonalidade do chapéu que vai escurecendo com a maturidade. Os esporos tem um diâmetro de 6-8 x 3-4,5 μm , possuem uma cor marfim e apresentam uma forma elíptica. O corpo é de cor branca, tendo um odor e paladar agradável.

O *L. giganteus* aparece muito cedo na estação, entre o final do verão e mantém-se até ao meio do Outono. O seu habitat é em pastagens e normalmente desenvolve-se em grupo (Santos, 2001).

1.4.4. *Sarcodon imbricatus*

O *Sarcodon imbricatus* (L.: Fr.) Karsten (figura 5) pertence ao filo: Basidiomycota, classe: Basidiomycetes, ordem: Thelephorales, família: Bankeraceae e género: *Sarcodon*.

É um cogumelo comestível, formoso e frequentemente tem uma estrutura grande. O *S. imbricatus* é distinto por apresentar um chapéu com uma superfície dentada grosseira e de cor castanho-escuro. O Chapéu é convexo, tem uma largura de 5-25 cm e apresenta-se deprimido e infundido no centro. A margem inicialmente é enrolada para fora tornando-se mais direito durante a maturação, às vezes até permanece ondulada ou lobular. Este cogumelo tem um aroma suave e um gosto: macio a amargo.



Figura 5. *Sarcodon imbricatus*



O pé é robusto e tem uma altura de 3.5-8 cm e 2-3.5 cm de diâmetro, afinando-se para baixo ou alargando-se na base. É sólido, mas na maturidade o ápice frequentemente apresenta-se oco. A superfície é seca, colorido como o chapéu com fibrilhas. Os esporos apresentam um diâmetro de 6-7.5 x 5-6.5 μm , possuem uma forma elíptica quase circular e de cor castanha.

O *S. imbricatos* encontra-se junto de pinheiros e as suas frutificações iniciam-se após as chuvas de Outono e terminam no meio do Inverno (Santos, 2001).

1.4.5. *Tricholoma portentosum*

O *Tricholoma portentosum* (Fr.) (figura 6) pertence ao filo: Basidiomicota, classe: Basidiomicetes, ordem: Agaricales, família: Tricholomataceae e ao género: *Tricholoma*.

Este cogumelo é comestível e predomina no campo até meio do Inverno. Em jovem tem um chapéu cónico a convexo, que se estende durante a maturidade alcançando um diâmetro de 5-10 cm. A superfície é lisa e com tempo húmido torna-se viscosa. O píleo apresenta cor verde amarelada com diferentes intensidades de cores em partes distintas do chapéu. A parte inferior do chapéu apresenta fibrilhas radiais de cor negra, que dão um aspecto geral de cinza esverdeado.



Figura 6. *Tricholoma portentosum*



Apresentam lâminas largas de cor branca a acinzentada com tonalidades amareladas. O pé é cilíndrico, fibroso e com a base radial ou afilado. A superfície é branca apresentando zonas com cor verde azeitona ou amareladas. Os esporos tem um diâmetro de 6-7 x 4-5 μm , são de cor branca e possuem uma forma elíptica. O corpo é de cor branca ou acinzentada, carnosa, com sabor e cheiro a farinha fresca.

O *T. portentosum* é um cogumelo comum, que aparece tardio na estação, entre o meio do mês de Outubro e Dezembro e o seu habitat comum é junto de pinheiros (Santos, 2001).



Cap.2

Objectivos

É nossa convicção que a procura de fontes naturais poderá trazer à Indústria Alimentar novos produtos antioxidantes mais seguros e mais protectores relativamente aos danos oxidativos que ocorrem quer no nosso corpo quer nos alimentos. Assim, os cogumelos silvestres comestíveis, como fontes naturais, podem ser introduzidos com esse propósito.

Este trabalho pretende avaliar a capacidade antioxidante de cinco espécies de cogumelos silvestres comestíveis do Nordeste transmontano (*L. giganteus*, *S. imbricatus*, *A. arvensis*, *L. deliciosus* e *T. portentosum*) e quantificar o teor de alguns compostos bioactivos presentes nas amostras. Também foi efectuado um estudo comparativo do cogumelo inteiro e das suas diferentes partes (chapéu e estipe) para duas espécies (*L. deliciosus* e *T. portentosum*).

A actividade antioxidante foi avaliada pelo poder redutor, efeito bloqueador do radical livre DPPH, inibição da hemólise de eritrócitos e simulação da inibição da peroxidação lipídica pelo sistema β -caroteno-linoleato. O conteúdo em compostos fenólicos, ácido ascórbico, β -caroteno e licopeno foi determinado e correlacionado com o potencial antioxidante de cada cogumelo.

O objectivo final será estimular a produção, comercialização e consumo dos cogumelos silvestres, em virtude das suas propriedades nutricionais e medicinais, assumindo desta forma uma maior relevância como mecanismo dinamizador da economia regional, constituindo uma alternativa económica para os agricultores da Península Ibérica, conhecida como uma região desfavorecida.



Cap.3

Material e métodos

3.1. Reagentes e padrões

Os padrões BHA (2-*tert*-butil-4-metoxifenol), TBHQ (tert-butil-hidroquinona), ácido L-ascórbico, α -tocoferol e ácido gálico foram adquiridos à Sigma (St. Louis, MO, USA). O 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) foi obtido na Alfa Aesar (Ward Hill, MA, EUA). Os restantes reagentes foram comprados à Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). O metanol foi adquirido na Pronalab (Lisboa, Portugal). A água foi tratada por um sistema de purificação Mili-Q (TGI Pure Water Systems, EUA).

3.2. Amostragem

A colheita dos macrofungos: *Agricus arvensis* (Schaeff.:Fr.), *Lactarius deliciosus* (L.) Gray, *Leucopaxillus giganteus* (Sowerby) Singer, *Sarcodon imbricatus* (L.: Fr.) Karsten e *Tricholoma portentosum* (Fr.) Quéil foi efectuada em Bragança (nordeste de Portugal) na área onde se insere o Parque natural de Montesinho (figura 1).

No início do mês de Outubro de 2005 foram colhidos cogumelos das espécies *Lactarius deliciosus*, *Tricholoma portentosum*, *Sarcodon imbricatus* num Pinhal de *Pinus pinaster* e *Leucopaxillus giganteus* e *Agaricus arvensis* em prado localizados no Concelho de Bragança. Após a colheita os carpóforos foram transportados para o laboratório, onde foram separados por espécies e identificados. A identificação foi efectuada de acordo com diversos autores (Bon, 1988; Courtecuisse, 1999; Courtecuisse, & Duhem, 1995; Marchand, 1971-1986; Moser, 1983). Foram depositadas amostras representativas de cada um dos cogumelos no herbário da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança.



Os cogumelos foram posteriormente desidratados num liofilizador (Ly-8-FM-ULE, Snijders, HOLLAND) e submetidos a testes de actividade antioxidante. Foram registados os valores de peso seco e peso fresco de cada cogumelo de forma a calcular a percentagem de humidade (*vide* capítulo 4).

3.3. Preparação das amostras

As amostras liofilizadas de cogumelos foram trituradas e extraídas (5g) com metanol segundo dois procedimentos diferentes:

- a) Em soxhlet durante 24h (procedimento adoptado na preparação dos extractos de *Leucopaxillus giganteus*, *Sarcodon imbricatus* e *Agaricus arvensis*);
- b) Numa placa com agitação à temperatura ambiente durante 72h, com três filtrações sucessivas em intervalos de 24h (procedimento adoptado na preparação dos extractos de *Lactarius deliciosus* e *Tricholoma portentosum*).

Os extractos metanólicos combinados foram evaporados a 40°C num evaporador rotativo e, após determinação da massa obtida, foram novamente dissolvidos em metanol de forma a obter uma concentração de 50 mg/ml. As soluções foram armazenadas a 4°C até serem utilizadas nos testes biológicos. Para cada um dos cogumelos prepararam-se várias concentrações dos extractos metanólicos por diluição da solução inicial (50, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2 e 1 mg/ml).

3.4. Determinação de compostos antioxidantes: compostos fenólicos totais, ácido ascórbico, β -caroteno e licopeno

Os compostos fenólicos presentes nos extractos metanólicos foram determinados utilizando um método colorimétrico, baseado no protocolo descrito por Singleton e Rossi com algumas modificações (Singleton, & Rossi, 1965). Foi misturado 1 ml da amostra com 1 ml do reagente fenólico Folin e Ciocalteu's. Após 3 min, adicionou-se à mistura 1 ml de solução saturada de carbonato de sódio e ajustou-se o volume a 10 ml



com água destilada. A reacção foi mantida no escuro durante 90 min; de seguida foi lida a absorvância a 725 nm (Espectrofotómetro Analytikijena 200-2004). O ácido Gálico foi o padrão utilizado para obter a curva padrão (0.01-0.4mM; anexo 1). A reacção para determinar os compostos fenólicos foi efectuada em triplicado, sendo os resultados apresentados em valor médio \pm desvio padrão e expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAGs) por g de extracto.

O ácido ascórbico foi determinado de acordo com o método de Klein e Perry (1982). O extracto metanólico seco (100 mg) foi extraído com 10 ml de ácido metafosforico 1% durante 45 min à temperatura ambiente e filtrado através de um papel de filtro Whatman nº 4. O filtrado (1 ml) foi misturado com 9 ml de 2,6-dicloroindofenol e, após 30 min, leu-se absorvância a 515 nm contra um branco. O conteúdo de ácido ascórbico no extracto foi calculado através de uma curva de calibração utilizando ácido L-ascórbico puro (0.020-0.12 mg/ml, anexo 2). O ensaio foi efectuada em triplicado, sendo os resultados apresentados em valor médio \pm desvio padrão e expressos como mg de ácido ascórbico/g de extracto.

A determinação do β -caroteno e licopeno foi efectuada de acordo com o método descrito por Nagata e Yamashita (1992). O extracto metanólico seco (100 mg) foi misturado com 10 ml de acetona-hexano (4:6), agitado vigorosamente em vortex durante 1 min e filtrado através de um papel de filtro Whatman nº 4. A absorvância do filtrado foi lida a 453, 505 e 663 nm. O conteúdo em β -caroteno e licopeno foi calculado através das seguintes equações: Licopeno (mg/100ml) = $-0.0458A_{663} + 0.372A_{505} - 0.0806A_{453}$; β -caroteno (mg/100ml) = $0.216A_{663} - 0.304A_{505} + 0.452A_{453}$. O ensaio foi efectuada em triplicado, sendo os resultados apresentados em valor médio \pm desvio padrão e expressos como mg de carotenoide/g de extracto.

3.5. Poder redutor

O poder redutor foi determinado de acordo com o método de Oyaizu (1986). Misturaram-se as várias concentrações de cada extracto metanólico de cogumelo (2.5 ml) com 2.5 ml de tampão fosfato de sódio (200 mmol/l; pH 6.6) e 2.5 ml de



ferricianeto de potássio 1%. A mistura foi incubada a 50°C durante 20 min (Julabo Shake Temp SW22- 2003). Posteriormente foram adicionados 2.5 ml de ácido tricloroacético 10% e centrifugou-se a mistura a 1000 rpm durante 8 min (Centrífuga refrigerada Centorion K24OR- 2003). O sobrenadante (5 ml) foi misturado com 5 ml de água desionizada e 1 ml de cloreto de ferro 0.1%, e leu-se a absorvância a 700 nm. O ensaio foi efectuado em triplicado, sendo os resultados apresentados em valor médio \pm desvio padrão. Calculou-se a concentração do extracto correspondente a uma absorvância de 0.5 (EC₅₀) a partir da representação gráfica da Absorvância a 700 nm em função da concentração do extracto. Foram utilizados como padrões o BHA e o α -tocoferol.

3.6. Efeito bloqueador nos radicais de DPPH

O efeito bloqueador nos radicais livres de DPPH foi monitorizado de acordo com o método descrito por Hatano, Kagawa, Yasuhara, e Okuda (1988). Misturaram-se as várias concentrações de cada um dos extractos metanólicos de cogumelos (0.3 ml) com 2.7 ml de uma solução metanólica contendo radicais DPPH (6×10^{-5} mol/l). As misturas foram agitadas vigorosamente e colocadas no escuro durante 60 min (até se obter valores estáveis de absorção). A redução do radical de DPPH foi determinada medindo a absorvância a 517 nm. A actividade bloqueadora de radicais (ABR) foi calculada pela percentagem de descoloração do DPPH utilizando a seguinte equação: % ABR = $[(A_{DPPH} - A_E) / A_{DPPH}] \times 100$, onde o A_E é a absorvância da solução contendo a amostra de extracto de cada nível em particular e A_{DPPH} é a absorvância da solução de DPPH. Este ensaio foi efectuado em triplicado, sendo os resultados apresentados em valor médio \pm desvio padrão. Calculou-se a concentração de extracto correspondente a uma inibição de 50% dos radicais de DPPH (EC₅₀) através da representação gráfica da percentagem da ABR em função da concentração do extracto. Foram utilizados como padrões o BHA e o α -tocoferol.



3.7. Inibição da hemólise de eritrócitos mediada por radicais livres peróxido

A actividade antioxidante dos extractos metanólicos de cogumelos foi avaliada através do seu efeito protector na hemólise de eritrócitos (Miki et al., 1987). Utilizou-se sangue de carneiro (raça churra galega transmontana) com peso médio de ~67 Kg. Os eritrócitos foram separados do plasma, e o sedimento foi lavado três vezes com 10 ml de tampão fosfato salino (10 mM) com pH 7.4 (NaH₂PO₄ 10 mM, Na₂HPO₄ 10 mM e NaCl 125 mM num litro de água destilada) e centrifugado a 1500 g durante 5 min. Durante a última lavagem, os eritrócitos obtidos foram centrifugados a 1500 g durante 10 min. Adicionaram-se, a cada uma das diferentes concentrações de extractos metanólicos de cogumelos (0.1 ml), 0.1 ml de suspensão de eritrócitos em tampão fosfato 20% e 0.2 ml de uma solução de di-hidrocloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH) 200 nM em tampão fosfato. A mistura foi posteriormente incubada a 37°C com agitação (30 rpm) durante 3h. Diluiu-se a mistura em 8 ml de tampão fosfato e centrifugou-se a 3000 g durante 10 min. Filtrou-se o sobrenadante com um filtro de celulose (membrana de celulose Titan, 30mm, 0.20 µm) e mediu-se a sua absorvância a 540 nm. A percentagem de inibição da hemólise foi calculada pela equação % inibição hemólise = [(A_{AAPH}-A_E)/A_{AAPH}] × 100, onde A_E é a absorvância da amostra contendo o extracto metanólico de cogumelo e A_{AAPH} é a absorvância do controlo que não contém extracto metanólico. O ensaio foi efectuado em triplicado, sendo os resultados apresentados em valor médio ± desvio padrão. Calculou-se a concentração de extracto correspondente a uma inibição de 50% (EC₅₀) através da representação gráfica da percentagem de inibição da hemólise em função da concentração de extracto. Utilizou-se como padrão o ácido L-ascórbico.

3.8. Actividade antioxidante pelo sistema β-caroteno-linoleato

A actividade antioxidante dos extractos metanólicos de cogumelos foi avaliada pelo sistema β-caroteno-linoleato (Mi-Yae, Tae-Hun, & Nak-Ju, 2003). A solução de β-caroteno foi preparada dissolvendo 2 mg em 10 ml de clorofórmio. Pipetaram-se 2 ml



da solução para um balão de 100 ml. Após evaporar o clorofórmio num evaporador rotativo a 40°C, adicionaram-se 40 mg de ácido linoleico, 400 mg do emulsificador Tween 80, 100 ml de água destilada e agitou-se vigorosamente. Transferiram-se 4.8 ml da emulsão para cada um dos tubos de ensaio contendo 0.2 ml das diferentes concentrações de extractos metanólicos de cogumelos. Os tubos foram agitados e incubados num banho a 50°C com agitação (50 rpm). Leu-se a absorvância a 470 nm imediatamente após a adição da emulsão (tempo zero) e após intervalos de 20 min até a amostra de controlo mudar de cor (2h). A actividade antioxidante foi calculada através da equação: $\text{actividade antioxidante} = (\beta\text{-caroteno após 2h de ensaio} / \beta\text{-caroteno inicial}) \times 100$. O ensaio foi efectuado em triplicado, sendo os resultados apresentados em valor médio \pm desvio padrão. Calculou-se a concentração de extracto correspondente a 50% de actividade antioxidante (EC₅₀) através da representação gráfica da percentagem de actividade antioxidante em função da concentração de extracto. Utilizou-se como padrão o TBHQ.



Cap. 4

Resultados e discussão

4.1. Actividade antioxidante dos extractos de carpóforos inteiros: *Leucopaxillus giganteus*, *Sarcodon imbricatus* e *Agaricus arvensis*

Foram avaliadas as propriedades antioxidantes de três espécies portuguesas (Nordeste Transmontano) de cogumelos silvestres comestíveis, *Leucopaxillus giganteus* (Sowerby), *Sarcodon imbricatus* (L.: Fr.) e *Agaricus arvensis* (Schaeff.:Fr.).

A tabela 1 apresenta os valores de peso fresco, peso seco e percentagem de humidade determinados para cada carpóforo em estudo.

Tabela 1. Peso fresco, peso seco e percentagem de humidade correspondente a cada cogumelo.

	Peso fresco ^a (g)	Peso seco ^a (g)	% Humidade ^a
<i>L. giganteus</i>	134.94 ± 80.33	8.26 ± 4.76	93.88
<i>S. imbricatus</i>	144.84 ± 85.16	8.85 ± 5.20	93.89
<i>A. arvensis</i>	43.96 ± 30.23	2.66 ± 1.07	93.95

^a Cada valor é expresso como média ± desvio-padrão (n=3).

Na avaliação da bioactividade procedeu-se à determinação do conteúdo em compostos antioxidantes: fenóis totais, ácido ascórbico, β-caroteno e licopeno e avaliou-se o seu poder redutor, efeito bloqueador de radicais livres de DPPH, inibição da hemólise de eritrócitos mediada por radicais livres de peróxido e actividade antioxidante através do sistema β-caroteno-linoleato. Estes ensaios foram realizados utilizando os extractos dos carpóforos inteiros.



4.1.1. Determinação de compostos antioxidantes

Na tabela 2, apresentam-se as concentrações dos fenóis totais, ácido ascórbico, β -caroteno e licopeno presentes nos extractos metanólicos dos cogumelos. Analisando a tabela, verifica-se que os fenóis totais foram os compostos antioxidantes encontrados em maior quantidade nos extractos de cogumelos. O ácido ascórbico é pouco abundante (0.13-0.35 mg/g), e o β -caroteno e licopeno só existem em quantidades vestigiais (< 3 μ g/g).

Tabela 2. Conteúdo de fenóis totais, ácido ascórbico, β -caroteno e Licopeno nos extractos de cogumelos.

	<i>L. giganteus</i>	<i>S. imbricatus</i>	<i>A. arvensis</i>
Fenóis totais (mg/g) ^a	6.29 \pm 0.20	3.76 \pm 0.11	2.83 \pm 0.09
Ácido ascórbico (mg/g) ^a	0.13 \pm 0.0069	0.16 \pm 0.0072	0.35 \pm 0.0015
β -caroteno (μ g/g) ^a	1.88 \pm 0.090	2.53 \pm 0.11	2.97 \pm 0.12
Licopeno (μ g/g) ^a	0.69 \pm 0.034	1.3 \pm 0.070	1.0 \pm 0.049

^a Cada valor é expresso como média \pm desvio-padrão (n=3).

O extracto de *L. giganteus* apresentou maior quantidade de compostos fenólicos (6.29 \pm 0.20 mg/g); a quantidade existente no extracto de *A. arvensis* (2.83 \pm 0.09 mg/g) foi ligeiramente inferior à presente no *S. imbricatus* (3.76 \pm 0.11 mg/g).

O facto do extracto *L. giganteus* conter maior quantidade de fenóis totais poderá justificar os melhores resultados encontrados na actividade antioxidante. Efectivamente, a actividade antioxidante de plantas tem sido relacionada com o conteúdo em compostos fenólicos. Fenóis como o BHT (hidroxitolueno butilado) e o galato são conhecidos pelos seus efeitos antioxidantes (Velioglu, Mazza, Gao, & Oomah, 1998).



4.1.2. Poder redutor

Na figura 7 estão representados os resultados do poder redutor dos extractos metanólicos de cogumelos em função da sua concentração. Neste ensaio, a cor amarela da solução teste transforma-se em várias tonalidades de verde e azul, dependendo do poder redutor presente em cada composto. A presença de compostos redutores (i.e. antioxidantes) causa a redução do complexo Fe^{3+} /ferricianeto, utilizado neste método, à forma ferrosa. Medindo a absorvância a 700 nm consegue-se quantificar a concentração de Fe^{2+} ; uma absorvância maior indica maior poder redutor.

O poder redutor dos extractos de cogumelos aumentou consoante a sua concentração. Os valores obtidos foram excelentes (Figura.7); na concentração de 5 mg/ml o poder redutor observado foi superior a 0.67 e seguindo a ordem *L. giganteus* > *S. imbricatus* ~ *A. arvensis*. A 5 mg/ml, o poder redutor dos extractos metanólicos de cogumelos foi 0.67-1.47, e numa concentração de 1 mg/ml foi 0.072-0.26. Os valores obtidos para o BHA a 3.6 mg/ml e para o α -tocoferol a 8.6 mg/ml foram apenas 0.12 e 0.13, respectivamente.

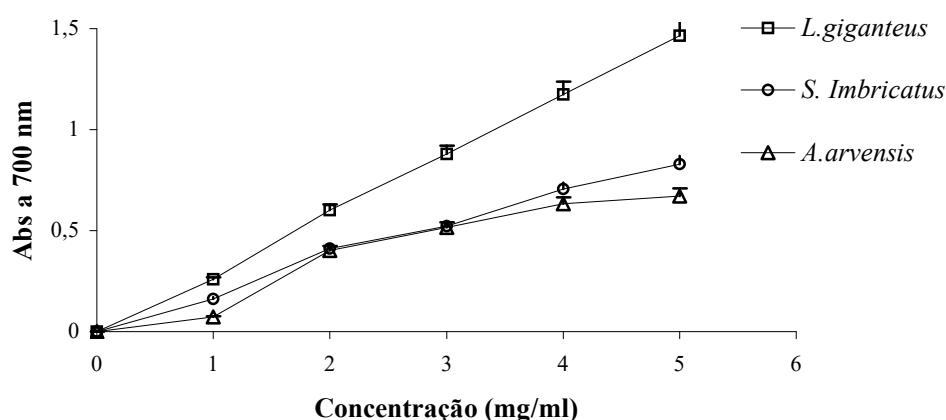


Figura. 7. Poder redutor dos extractos metanólicos de cogumelos.

Cada valor é expresso como valor médio \pm desvio padrão (n=3).

O extracto metanólico de *A. arvensis* possui valores de poder redutor ligeiramente inferiores aos do *S. imbricatus* (Figura 7). Foi já descrito que as propriedades redutoras



estão associadas geralmente à presença de redutonas, que exercem uma acção antioxidante quebrando a ligação do radical livre e doando um átomo de hidrogénio (Shimada, Fujikawa, Yahara, & Nakamura, 1992). Assim, o *L. giganteus* poderá conter maiores quantidades de redutona que reage estabilizando os radicais livres e bloqueando as reacções radicalares em cadeia.

4.1.3. Efeito bloqueador de radicais de DPPH

Os radicais livres de DPPH possuem uma absorção característica a 517 nm (cor roxa), que decresce significativamente quando expostos a bloqueadores de radicais (fornecendo átomos de hidrogénio ou doando electrões). Uma absorvância mais baixa a 517 nm indica que o extracto possui uma maior actividade bloqueadora do radical. A actividade bloqueadora de radicais livres é um dos mecanismos conhecidos da inibição da oxidação lipídica exercida pelos compostos antioxidantes. Este teste é muito utilizado em estudos de actividade antioxidante, pois é uma técnica rápida para a análise de compostos ou extractos que possuam efeitos bloqueadores de radicais livres (Amarowicz et al., 2004).

Os valores de ABR dos extractos metanólicos de cogumelos encontram-se representados na figura 8; os resultados são expressos em percentagem de razão entre o decréscimo da absorvância da amostra a 517 nm e a absorvância da solução de DPPH na ausência de extracto.

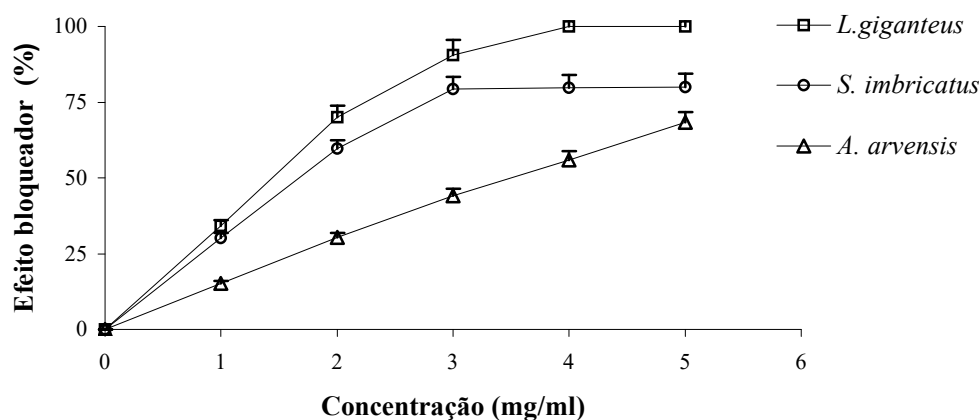


Figura 8. Efeito bloqueador (%) dos extractos metanólicos de cogumelos nos radicais DPPH. Cada valor é expresso como média \pm desvio padrão (n=3).

Pela análise da figura 8, conclui-se que a ABR dos extractos aumentou em função da concentração e foi excelente para o *L. giganteus* (100% a 4 mg/ml), sendo superior aos valores obtidos para o BHA (96% a 3.6mg/ml) e α -tocoferol (95% a 8.6mg/ml). Os valores foram razoáveis para o *S. imbricatus* (80% a 5 mg/ml) e moderados para o *A. arvensis* (68.3% a 5 mg/ml).

4.1.4. Inibição da hemólise de eritrócitos mediada por radicais livres peróxido

A hemólise oxidativa de eritrócitos induzida por AAPH tem sido estudada como o modelo peroxidativo responsável pela danificação na biomembrana (Zhang et al., 1997). O AAPH é um iniciador do radical peróxido que gera radicais livres por decomposição térmica e ataca os eritrócitos para induzir a reacção de oxidação lipídica e proteica, perturbando a organização da membrana e eventualmente conduzindo-a à hemólise.

Neste ensaio, estudou-se a acção protectora dos extractos metanólicos de cogumelos na hemólise mediada pela actividade de radicais peróxido. Na figura 9 apresentam-se as percentagens de inibição da hemólise, como resultado da acção protectora contra danos oxidativos induzidos pelo AAPH, em membranas de eritrócitos de carneiro. Verifica-se que a inibição da hemólise é dependente da concentração de extracto. Mais uma vez, o



L. giganteus apresentou um melhor efeito protector contra a hemólise de eritrócitos (72.8% a 5 mg/mL) comparativamente às outras espécies de cogumelos (34.2% para *S. imbricatus* e 31.8% para *A. arvensis*).

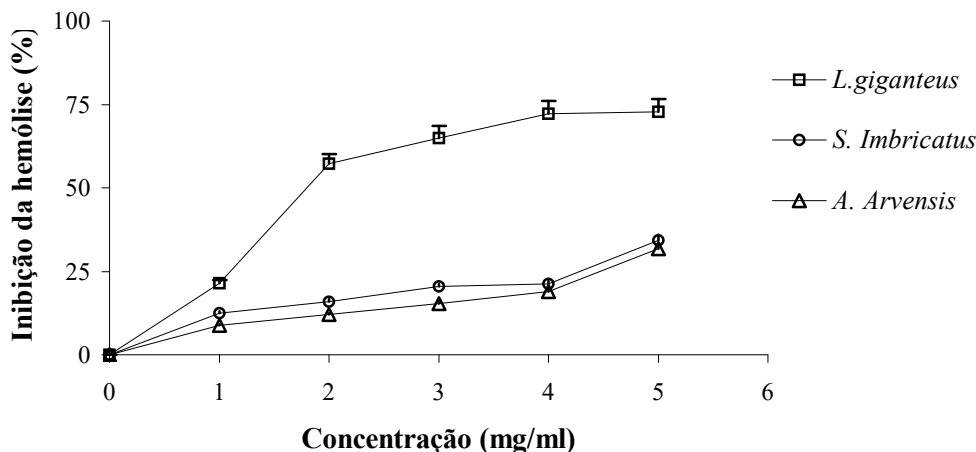


Figura 9. Inibição da hemólise (%) dos extractos metanólicos de cogumelos.

Cada valor é expresso como valor médio \pm \square desvio padrão (n=3).

Contudo, a percentagem de inibição da hemólise de glóbulos vermelhos para o ácido L-ascórbico foi muito superior (94.6% a 1mg/mL) à encontrada nos extractos de cogumelos.

4.1.5. Actividade antioxidante (sistema β -caroteno-linoleato)

Na figura 10 apresentam-se os resultados da actividade antioxidantes dos extractos avaliada pelo sistema β -caroteno-linoleato. A actividade antioxidante do carotenóide baseia-se nos aductos formados entre o carotenoide e os radicais livres de ácido linoleico. Estes radicais atacam o β -caroteno conhecido pelo seu alto nível de insaturação; a presença de diferentes antioxidantes pode impedir a perda da cor do β -caroteno, neutralizando o radical livre de ácido linoleico e outros radicais formados no sistema (Jayaprakasha, Singh, & Sakariah, 2001). Assim, a absorvância decresce



rapidamente nas amostras sem antioxidantes, enquanto que na sua presença retêm a cor e a absorvância durante um maior período de tempo.

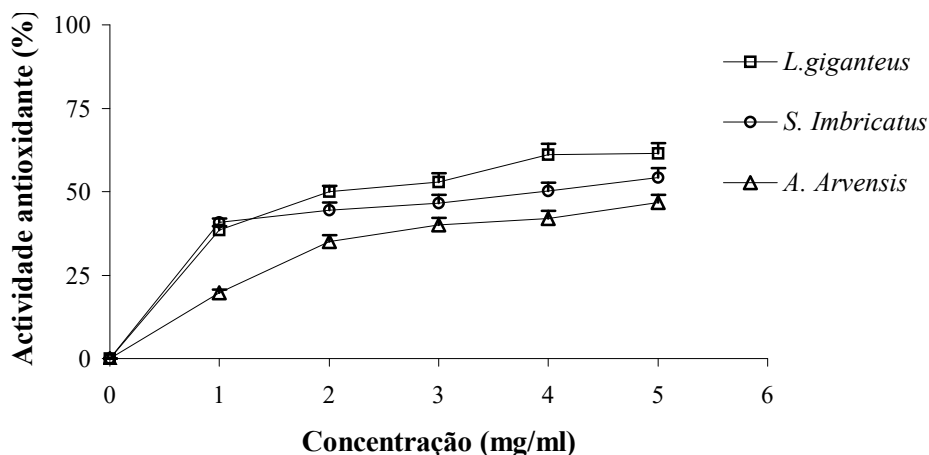


Figura 10. Actividade antioxidante (%) dos extractos metanólicos de cogumelos pelo sistema β -caroteno-linoleato. Cada valor é expresso como valor médio \pm \square desvio padrão (n=3).

A actividade antioxidante dos extractos de *L. giganteus*, *S. imbricatus* e *A. Arvensis* aumentou com a concentração, sendo de 61,4%, 54,3% e 46,7%, respectivamente, na concentração de 5 mg/ml. A actividade antioxidante encontrada para o padrão TBHQ foi muito superior, atingindo 82,2% na concentração de 2 mg/ml. Os compostos antioxidantes presentes nos extractos de cogumelos poderão reduzir a destruição do β -caroteno por neutralização do radical livre de ácido linoleico e de outros radicais formados no sistema. novamente o *L. giganteus* foi o cogumelo mais eficaz, apresentando uma EC_{50} de 2 mg/ml.



Na tabela 3, apresentam-se os valores de EC₅₀ para os ensaios de actividade antioxidante dos extractos metanólicos de cogumelos.

Tabela 3. Valores ^{a,b,c,d} de EC₅₀ (mg/ml) dos extractos de cogumelos na avaliação da actividade antioxidante.

Amostras	Poder redutor (EC ₅₀ ^a)	DPPH (EC ₅₀ ^b)	Inibição da hemólise (EC ₅₀ ^c)	β-caroteno-linoleato (EC ₅₀ ^d)
<i>L. giganteus</i>	1.71	1.44	1.80	2.00
<i>S. imbricatus</i>	2.79	1.67	>5	3.97
<i>A. arvensis</i>	2.86	3.50	>5	>5
BHA	15.00	1.88	-	-
α-tocoferol	33.08	4.53	-	-
Ac.	-	-	0.53	-
Ascórbico	-	-	-	-
TBHQ	-	-	-	1.22

^a EC₅₀ (mg/ml): concentração efectiva em que a absorvância é 0.5.

^b EC₅₀ (mg/ml): concentração efectiva que bloqueia 50% dos radicais DPPH.

^c EC₅₀ (mg/ml): concentração efectiva com uma inibição de 50% da hemólise de eritrócitos.

^d EC₅₀ (mg/ml): concentração efectiva em que a actividade antioxidante é 50%.



4.2. Actividade antioxidante dos extractos de carpóforos inteiros, chapéu e estipe: *L. deliciosus* e *T. portentosum*

Foram avaliadas duas espécies de cogumelos silvestres comestíveis do nordeste de Portugal (*Lactarius deliciosus* (L.) Gray e *Tricholoma portentosum* (Fr.) Quél). A tabela 4 apresenta os valores de peso seco, peso fresco e percentagem de humidade determinados para cada carpóforo em estudo.

Tabela 4. Peso fresco, peso seco e percentagem de humidade correspondente a cada cogumelo.

	Peso fresco ^a (g)	Peso seco ^a (g)	% Humidade ^a
<i>T. portentosum</i>	33.57 ± 12.74	2.11 ± 0.70	93.71
<i>L. deliciosus</i>	25.21 ± 9.32	2.46 ± 0.95	90.24

^a Cada valor é expresso como média ± desvio-padrão (n=3).

Procedeu-se à determinação do seu conteúdo em fenóis totais, poder redutor e capacidade bloqueadora de radicais livres. Estes ensaios foram realizados utilizando o carpóforo inteiro, e o chapéu e estipe separadamente.

4.2.1. Determinação de Fenóis totais

A concentração de fenóis encontrada nos extractos de cogumelos é apresentada na tabela 5. No extracto metanólico de *L. deliciosus* foi encontrada uma maior quantidade de compostos fenólicos (17.25 ± 0.65 mg/g) do que no extracto de *T. portentosum* (10.80 ± 0.47 mg/g).

**Tabela 5.** Fenóis totais em extractos metanólicos de dois cogumelos silvestres comestíveis.

Fenóis totais ^a (mg/g)					
<i>L. deliciosus</i>	<i>L. deliciosus</i>	<i>L. deliciosus</i>	<i>T.</i>	<i>T.</i>	<i>T.</i>
	(chapéu)	(estipe)	<i>portentosum</i>	<i>portentosum</i>	<i>portentosum</i>
				(chapéu)	(estipe)
17.25 ± 0.65	10.66 ± 0.52	6.31 ± 0.29	10.80 ± 0.47	6.57 ± 0.31	3.91 ± 0.17

^a Cada valor é expresso como média ± desvio-padrão (n=3).

A porção do cogumelo utilizada teve influência nos resultados obtidos. Os extractos de carpóforo inteiro apresentaram maior concentração de fenóis do que os extractos de chapéu e estipe. Por sua vez, os compostos fenólicos presentes nos extractos metanólicos do chapéu (10.66 ± 0.52 mg/g para *L. deliciosus* e 6,57 ± 0.31 mg/g para *T. portentosum*) foram superiores aos encontrados nos extractos de estipe (6.31 ± 0.29 mg/g para *L. deliciosus* e 3,91 ± 0.17 mg/g para *T. portentosum*). A maior quantidade de fenóis dos extractos de *L. deliciosus* pode ter sido responsável pelos resultados obtidos no poder redutor e no efeito bloqueador de radicais livres de DPPH.

4.2.2. Poder redutor

Na figura 11 e 12 apresentam-se os resultados do poder redutor dos extractos metanólicos de cogumelos em função da sua concentração. O poder redutor aumenta consoante a concentração de cada extracto de cogumelo. Os valores obtidos foram excelentes para ambas as espécies de cogumelos (Figura 11 e 12); na concentração de 50 mg/ml os valores de poder redutor foram superiores a 1.65 e seguindo a ordem *L. deliciosus*>*L. deliciosus* chapéu>*T. portentosum*>*L. deliciosus* estipe>*T. portentosum* chapéu>*T. portentosum* estipe.

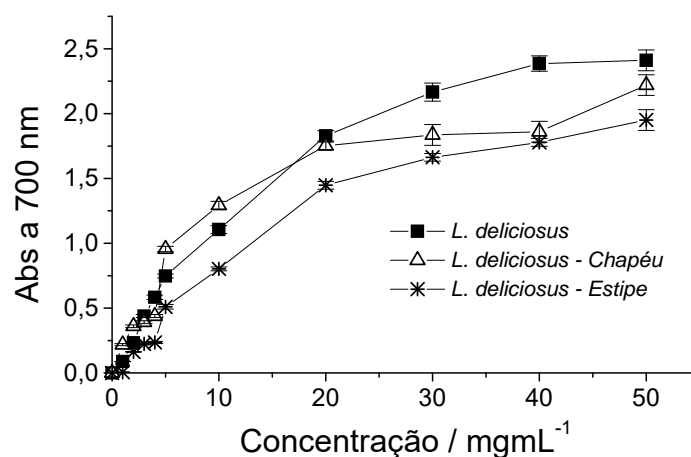


Figura 11. Poder redutor dos extractos metanólicos de *L. deliciosus*. Cada valor é expresso como média \pm desvio padrão (n=3).

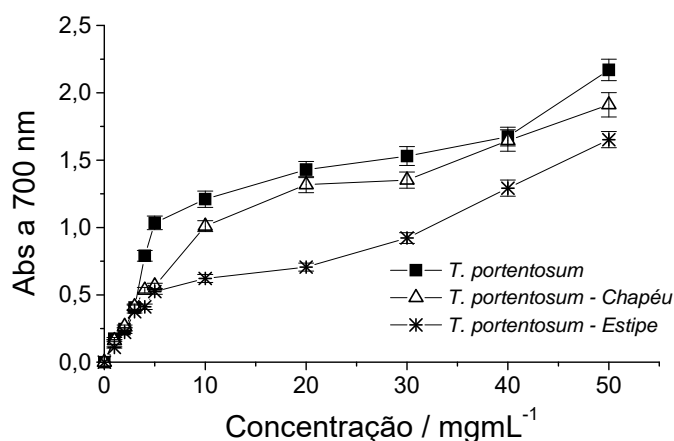


Figura 12. Poder redutor dos extractos metanólicos de *T. portentosum*. Cada valor é expresso como média \pm desvio padrão (n=3).

Na concentração de 5 mg/ml, o poder redutor dos extractos metanólicos foi 0.52-0.96, e numa concentração de 1 mg/ml foram 0.006-0.22. O poder redutor do BHA a 3.6 mg/ml e do α -tocopherol a 8.6 mg/ml foi apenas 0.12 e 0.13, respectivamente. O extracto metanólico de *T. portentosum* possui valores de poder redutor ligeiramente inferiores (Figura 12) aos do *L. deliciosus* (Figura 11). Os extractos obtidos a partir do chapéu mostraram ser uma melhor fonte antioxidante do que os extractos obtidos a



partir da estipe. O carpóforo inteiro apresentou sempre uma maior capacidade redutora (a 50 mg/ml- 2.41 para *L. deliciosus* e 2.17 para *T. portentosum*).

4.2.3. Efeitos bloqueadores dos radicais de DPPH

Os valores de ABR dos extractos de *L. deliciosus* e *T. portentosum* foram analisados e comparados (Figura 13 e 14); os resultados foram calculados de acordo com o descrito na secção 4.1.3.

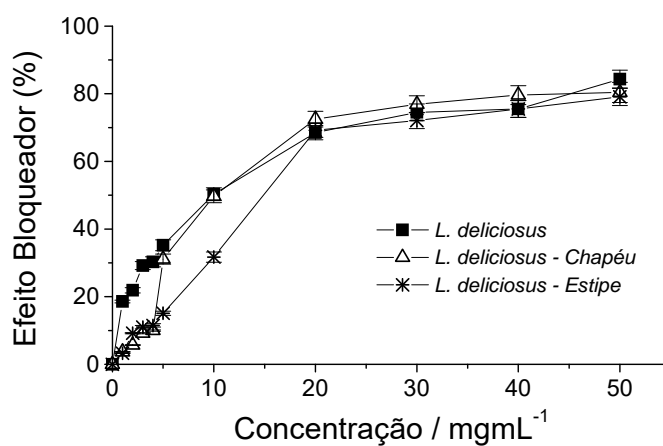


Figura 13. Efeito bloqueador (%) dos extractos metanólicos de *L.deliciosus* nos radicais DPPH. Cada valor é expresso como média \pm desvio padrão (n=3).

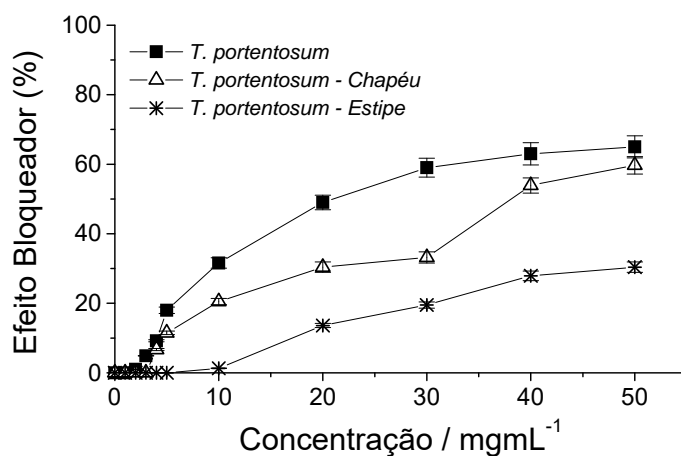


Figura 14. Efeito bloqueador (%) dos extractos metanólicos de *T. portentosum* nos radicais DPPH. Cada valor é expresso como média \pm desvio padrão (n=3).

Pela análise das figuras 13 e 14, pode-se concluir que a actividade bloqueadora dos radicais de DPPH dos extractos aumentou com a concentração e foi maior para o *L. deliciosus* (79.1-84.3% a 50 mg/ml). Os valores de ABR do *T. portentosum* foram razoáveis (30.4-65.0% a 50 mg/ml). No entanto, o efeito bloqueador de radicais exercido pelo BHA (3.6mg/ml) e α -tocopherol (8.6mg/ml) foi 96 e 95%, respectivamente. Os extractos de chapéu apresentam maior percentagem de ABR (80.4% para *L. deliciosus* e 59.7% para *T. portentosum* a 50 mg/ml) do que os extractos de estipe (79.1% para *L. deliciosus* e 30.4% para *T. portentosum* a 50 mg/ml). O uso do carpóforo inteiro aumentou os valores de ABR (a 50 mg/ml- 80.4% para *L. deliciosus* e 65.0% para *T. portentosum*).



Na tabela 6, apresentam-se os valores de EC₅₀ para os ensaios de actividade antioxidante para cada extracto metanólico de cogumelo.

Tabela 6. Valores ^{a,b} de EC₅₀ (mg/ml) de poder redutor e efeito bloqueador de DPPH obtidos para os extractos de cogumelos.

Amostras	Poder redutor (EC ₅₀ ^a)	DPPH (EC ₅₀ ^b)
<i>Lactarius deliciosus</i>	3.42	8.52
<i>Lactarius deliciosus</i> (chapéu)	3.58	11.93
<i>Lactarius deliciosus</i> (estipe)	6.69	15.11
<i>Tricholoma portentosum</i>	3.12	22.9
<i>Tricholoma portentosum</i> (chapéu)	3.69	40.15
<i>Tricholoma portentosum</i> (estipe)	4.82	>50
BHA	15	1,88
α-tocafetol	33,08	4,53

^a EC₅₀ (mg/ml): concentração efectiva em que a absorvância é 0.5.

^b EC₅₀ (mg/ml): concentração efectiva em 50% dos radicais DPPH são bloqueados.



Cap. 5

Conclusão

Na primeira parte do trabalho, verificou-se que os extractos metanólicos de *L. giganteus* revelaram melhores propriedades antioxidantes (menores valores de EC₅₀) que os extractos de *S. imbricatus* e *A. arvensis*, facto que está de acordo com o conteúdo mais elevado em fenóis encontrado para a primeira espécie. Os valores de EC₅₀ obtidos para o poder redutor e para o efeito bloqueador dos radicais livres de DPPH foram melhores do que para a inibição da hemólise de eritrócitos e para o sistema β-caroteno-linoleate. Estabeleceu-se uma relação entre o poder redutor, a actividade bloqueadora de DPPH, a inibição da hemólise e a extensão da descoloração do β-caroteno, e alguns compostos bioactivos quantificados. As quantidades detectadas de ácido ascórbico, β-caroteno e licopeno nos três extractos foram apenas vestigiais, facto que reforça a ideia dos compostos fenólicos contribuírem significativamente para a actividade antioxidante dos carpóforos.

O presente trabalho foi o primeiro estudo a demonstrar que os compostos antioxidantes encontrados nos extractos de cogumelos Portugueses conseguem proteger a membrana de eritrócitos incubados com AAPH e reduzem a extensão da destruição do β-caroteno, neutralizando o radical livre linoleato e outros radicais livres formados no sistema.

Da segunda parte do trabalho, concluiu-se que os extractos metanólicos de *L. deliciosus* revelaram propriedades antioxidantes melhores do que os extractos de *T. portentosum*, apresentando menores valores de EC₅₀, o que também vai de encontro à maior quantidade de fenóis detectada na primeira espécie. Este facto é mais evidente nos valores de EC₅₀ obtidos no efeito bloqueador de radicais DPPH (8.52 mg/ml para *L. deliciosus* versus 22.9 mg/ml para *T. portentosum*).

Recomenda-se o consumo do carpóforo inteiro, tendo o chapéu apresentado melhor actividade antioxidante do que o estipe. Especialmente no caso de *T. portentosum*, o



efeito bloqueador de radicais DPPH decresceu significativamente quando se usou o estipe. Os valores obtidos de EC_{50} foram melhores para o poder redutor relativamente ao efeito bloqueador de radicais. É nossa convicção que a procura de fontes naturais poderá trazer à Indústria Alimentar novos produtos antioxidantes mais seguros e protectores relativamente aos danos oxidativos que ocorrem quer no nosso corpo quer nos alimentos. Tanto quanto nos apercebemos existe pouca informação disponível sobre actividades antioxidantes *in vitro* de cogumelos silvestres europeus, e foi a primeira vez que cogumelos silvestres comestíveis portugueses foram submetidos a este estudo.



Referências Bibliográficas

Aust, S.D., & Sringen, B.A. (1982). *Free radicals in biology*, vol. 5 (pp. 1-28). Academic Press: New York.

Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., & Weil, J.A. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84, 551-562.

Beuchat L.R (1987). *Food and mycology*, second edition (pp. 355-387). Van Nostrand Reinhold: NY

Bon, M. (1988). In Guia de campo de los Hongos de Europa. Ediciones Omega: Barcelona.

Bors, W., & Saran, M. (1987). Radical scavenging by flavonoid antioxidants. *Free Radical Research Communications*, 2, 289-294.

Chang, R. (1996). Functional properties of edible mushrooms. *Nutrition Reviews*, 54, S91-S93.

Chang, S.T., & Miles P.G. (1992). Mushrooms biology – a new discipline. *Mycologist*, 6, 64-65.

Cheung, L.M., & Cheung, P.C.K. (2005). Mushroom extracts with antioxidant activity against lipid peroxidation. *Food Chemistry*, 89, 403-409.

Cheung, L.M., Cheung, P.C.K., & Ooi, V.E.C. (2003). Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry*, 81, 249-255.



Courtecuisse, R. (1999). In *Mushrooms of Britain and Europe*. HarperCollins Publishers: London.

Courtecuisse, R., Duhem, B. (1995). In *Mushrooms and Toadstools of Britain and Europe*. HarperCollins Publishers: London.

Diplock, A.T., Charleux, J.L., Crozier-willi, G., Kok, F.J., Rice-Evan, C., & Roberfroid, M. (1998). Functional food science and defence against reactive oxidative species. *British Journal of Nutrition*, 80S, S77-S112.

Fukushima, N.S., & Tsuda, H. (1985). Carcinogenity and modification of the carcinogenic response by BHA, BHT and other antioxidants. *Critical Reviews in Toxicology*, 15, 109-150.

Halliwell, B. (1997). Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*, 16, 33–50.

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1999). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press: United Kingdom.

Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T., & Okuda, T. (1988). Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 36, 2090-2097.

Hawksworth DL. (2001). Mushrooms: the extent of unexplored potential. *International Jornal medicinal Mushrooms*, 3, 333-337.

Hirano, R., Sasamoto, W., Matsumoto, A., Itakura, H., Igarashi, O., & Kondo, K. (2001). Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo)*, 47, 357-362.



Hu, F.B. (2000). Dietary pattern analysis: A new direction in nutritional epidemiology. *Current Opinion in Lipidology*, 13, 3-9.

Jayaprakasha, G.K., Singh, R.P., & Sakariah, K.K. (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chemistry*, 73, 285-290.

Keys, A. (1995). Mediterranean diet and public health personal reflection. *American Journal of Clinical Nutrition*, 61, 1321S-1323S.

Klein, B.P., & Perry, A.K. (1982). Ascorbic acid and vitamin A activity in selected vegetables from different geographical areas of the United States. *Journal of Food Science*, 47, 941-945, 948.

Lindequist, U., Niedermeyer, T. H. J., & Jülich, W. (2005). The pharmacological potential of mushrooms. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine (eCAM)*, 2(3), 285-299.

Lipworth, L., Martinez, M.E., Angell, J., Hsien, C.C., & Trichopoulos, D. (1997). Olive oil and human cancer: an assessment of evidence. *Preventive Medicine*, 26, 181-190.

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.

Marchand, A. (1971-1986). In *Champignons du Nord et du Midi*. Tome 1-9. Soc. Mycol. Pyrénées Méditerranéennes: Perpignan.

Martins, A., Baptista, P., Sousa, M.J., Meireles, T., & Pais, S. Proceedings of the Second International Workshop on Edible Mycorrhizal Fungi 2002. Eds Ian Hall, Wang Yun, Eric Danell, Alessandra Zambonelli. ISBN 0-478-10828-X.



Martins, F.(2004). *Cogumelos – Património natural Transmontano*, vol 1 (pp.19-25). João Azevedo: Portugal.

Mau, J.L., Chang, C.-N., Huang, S.-J., & Chen, C.-C. (2004). Antioxidant properties of methanolic extracts from *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta* and *Termitomyces albuminosus* mycelia. *Food Chemistry*, 87, 111-118.

Mau, J.-L., Lin, H.-C., & Song, S.-F. (2002). Antioxidant properties of several speciality mushrooms. *Food Research International*, 35, 519-526.

Miki, M., Tamia, H., Mino, M., Yamamoto, Y., & Niki, E. (1987). Free-radical chain oxidation of rat red blood cells by molecular oxygen and its inhibition by α -tocopherol. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 258, 373-380.

Mi-Yae, S, Tae-Hun, K., & Nak-Ju, S. (2003). Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus of Hymenochaetaceae*) extracts. *Food Chemistry*, 82, 593-597.

Moser, M. (1983). In *Keys to Agarics and Boleti (Polyporales, Boletales, Agaricales, Russulales)*. Roger Phillips: London.

Nagata, M., & Yamashita, I. (1992). Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaish*, 39(10), 925-928.

Nakayama, T., Yamada, M., Osawa, T., & Kawakishi, S. (1993). Suppression of active oxygen-induced cytotoxicity by flavonoids. *Biochemical Pharmacology*, 45, 265-267.

Ostrovidov, G., Franck, P., Joseph, D., Martarello, L., Kirsch, G., Belleville, F., Nabet, P., & Dousset, B. (2000). Screening of new antioxidant molecules using flow



cytometry. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43, 1762-1769, and references cited therein.

Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315.

Pryor, W.A., Lightsey, J.W., & Prier, D.G. (1982). The production of free radicals in vivo from the action of xenobiotics: the initiation of autooxidation of polyunsaturated fatty acids by nitrogen dioxide and ozone. In *Lipid peroxides in Biology and Medicine* (pp. 1-22). Academic Press: New York.

Sagakami, H., Aohi, T., Simpson, A., & Tanuma, S. (1991). Induction of immunopotential activity by a protein-bound polysaccharide, PSK. *Anticancer Research*, 11, 993-1000.

Santos, J. C. (2001). *Cien setas frequentes*, 3^o edicion (pp. 97-168). Edilesa: Spain

Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., & Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 40, 945-948.

Singleton, V.L., & Rossi, J.A. jr. (1965). Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.

Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hras, A.R., Simonic, M., & Knez, Z. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89, 191-198.



Soliño, A., Rodriguez, J. V., & Castro M.L. (2001). In *Anais da associação micologica "A Pantorra"*, vol. 1 (pp. 51-60). Mogadouro: Portugal.

Stone, W.L., Leclair, I., Ponder, T., Bagss, G., & Barret-Reis, B. (2003). Infants discriminate between natural and synthetic vitamin E. *American Journal of Clinical Nutrition*, 77, 899-906.

Torel, J., Cillard, J., & Cillard, P. (1986). Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry*, 2, 383-385.

Valentão, P., Andrade, P.B., Rangel, J., Ribeiro, B., Silva, B.M., Baptista, P., Seabra, R.M.. (2005). Effect of the conservation procedure on the contents of phenolic compounds and organic acids in Chanterelle (*Cantharellus cibarius*) mushroom. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4925-4931.

Valentão, P., Lopes, G., Valente, M., Barbosa, P., Andrade, P.B., Silva, B.M., Baptista, P., Seabra, R.M. (2006). Quantification of nine organic acids in wild mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, in press.

Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., & Oomah, B.D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 4113-4117.

Visioli, F., Bellomo, G., & Galli, C. (1998). Free-radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 247, 60-64.

Visioli, F., Bellosta, S., & Galli, C. (1998). Oleuropein, the bitter principle of olives enhances nitric oxide production by mouse macrophages *Life Sciences*, 62, 541-546.



Wasser, S.P., & Weis, A.L. (1999). Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspective (review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1, 31-62.

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

Yen, G.-C., & Hung, C.-Y. (2000). Effects of alkaline and heat treatment on antioxidative activity and total phenolics of extracts from Hsian-tsao (*Mesona procumbens* Hemsl.). *Food Research International*, 33, 487-492.

Zhang, A., Zhu, Q.Y., Luk, Y.S., Ho, K.Y., Fung, K.P., & Chen, Z.-Y. (1997). Inhibitory effect of jasmine green tea epicatechin isomers on free radical-induced lysis of red blood cells. *Life Sciences*, 61, 383-394.



Este trabalho originou :

- Publicações

Isabel C. F. R. Ferreira, Paula Baptista, Miguel Vilas-Boas and Lillian Barros. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: individual cap *and* stipe activity. Food Chemistry 2006 (*in press*)

Lillian Barros, Maria-João Ferreira, Bruno Queirós, Isabel C. F. R. Ferreira, Paula Baptista. Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. Food chemistry 2006 (aceite)

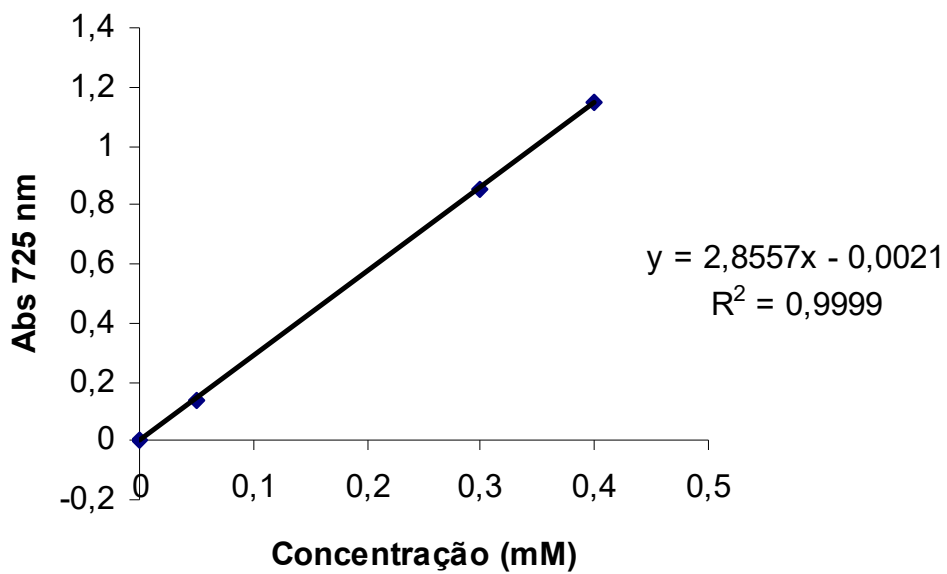
- Comunicações a congressos em forma de poster

Isabel Ferreira, Paula Baptista, Miguel Vilas-Boas and Lillian Barros; Antioxidante properties of wild edible mushrooms: individual cap and stipe activity; 4th Internacional work on edible mycorrhizal mushroom; Murcia, 29 de Novembro a 2 de Dezembro de 2005

Lillian Barros, Maria João Ferreira, Bruno Queirós, Isabel C. F. R. Ferreira, Paula Baptista; Actividade antioxidante de cogumelos silvestres comestíveis: *Leucopaxillus giganteus*, *Sarcodon imbricatus* e *Agaricus arvensis*; Jornadas de Análise clínicas e de saúde pública; Universidade de Aveiro; 13 a 14 de Maio de 2006

Anexo 1

Curva-padrão de ácido gálico utilizada na determinação dos fenóis totais



Anexo 2

Curva-padrão de ácido L-ascórbico utilizada na determinação do ácido ascórbico

