

Ana Estela Morgado Figueiredo

**Avaliação da contaminação metálica de
cogumelos das regiões da Beira Interior e Trás-
os-Montes**

Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

2007

Ana Estela Morgado Figueiredo

**Avaliação da contaminação metálica de cogumelos
das regiões da Beira Interior e Trás-os-Montes**

FACULDADE DE FARMACIA
U. P.
BIBLIOTECA
Data 06/07/2007
Reg. 5391
Cota

FFM
FIG
5391

Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

2007

Dissertação de candidatura ao grau de Mestre em Toxicologia Analítica Clínica e
Forense apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Orientadores:

Professora Doutora Maria Luisa Castro (Universidade de Vigo Espanha)

Professora Doutora Maria Lourdes Pinho de Almeida Souteiro Bastos

Alguns dos resultados apresentados nesta dissertação constam na seguinte comunicação:

Figueiredo, A E., Soares, M E., Baptista, P., Castro, M., Bastos, M L. 2007. *Validação de uma metodologia por EAA/AE para avaliação dos níveis de crómio total e crómio hexavalente em cogumelos*. 8º Encontro de Química dos Alimentos. Beja.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Doutora Maria Lurdes Bastos, agradeço a possibilidade de realização deste Trabalho no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Também quero expressar a minha gratidão pela orientação do trabalho realizado e manifestar a minha admiração pela forma como me ensinou.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Maria Luisa Castro, agradeço toda a formação micológica e todo o incentivo que me deu.

À Engenheira Maria Elisa Soares, quero agradecer pela forma carinhosa como me ensinou, incentivou e ajudou ao longo deste trabalho.

Aos Professores Doutores Helena Carmo e Fernando Remião, quero agradecer o apoio e a forma simpática com que sempre me trataram.

À Dr.^a Paula Baptista, da Escola Superior Agrária de Bragança, ESAB, à Direcção da Agricultura da Beira Interior, DRABI, em particular ao Dr. João Marques, Eng. Lopes Dias e ao Eng. Carlos Felício, agradeço a recolha e identificação dos cogumelos e solos, e toda a ajuda que me cederam.

Agradeço aos Senhores Manuel Pires Henriques, António José Correia Pereira, e José Luís Leite Chapado a recolha das amostras de cogumelos e solos.

Aos meus colegas de trabalho da Farmácia Sousa Oliveira, Dr.^a Fernanda Sousa Oliveira, Dr.^a Ana Oliveira, Dr.^a Gabriela Maciel, Dr.^a Juanita Almeida, Dr.^a Florbela Pinto, Joaquim Correia, Lucília Sousa e Susana Rocha, todo o apoio que de certo modo, contribuiu para a realização desta tese.

Aos colegas do Laboratório de Toxicologia, Helena, João, Renata, Ricardo e Vera, todo o apoio amigo, disponibilidade, encorajamento, e o bom ambiente de trabalho que sempre me proporcionaram durante a realização deste estudo.

À D. Júlia e D. Conceição agradeço a forma simpática como me trataram e toda disponibilidade demonstrada.

Aos meus amigos e familiares, e a todos os que de certo modo, contribuíram para a realização desta dissertação, agradeço o apoio.

Aos meus pais e irmã, agradeço todo o carinho, o incentivo constante, a compreensão e a paciência que, apesar de sempre presentes, foram infinitos nos piores momentos.

ÍNDICE

1. Introdução	1
1.1. Cogumelos	2
1.1.1. Estrutura e morfologia	3
1.1.2. Reprodução	4
1.1.3. Nutrição	6
1.1.4. Identificação e denominação	7
1.1.5. Utilização	7
1.2. Contaminantes dos cogumelos:	9
1.3. Os cogumelos como potenciais biomarcadores de poluição por metais pesados	12
1.4. Factores de bioacumulação dos metais pesados pelos cogumelos	14
1.4.1. Factores ambientais relacionados com o solo	14
1.4.1.1. pH	14
1.4.1.2. Matéria orgânica	15
1.4.1.3. Concentração dos metais	15
1.4.1.4. Formas químicas dos metais pesados no solo	16
1.4.1.5. Capacidade de adsorção ou fixação do solo	17
1.4.1.6. Contaminação por deposição atmosférica	17
1.4.2. Factores dependentes dos cogumelos	18
1.4.2.1. Espécie	18
1.4.2.2. Estrutura do micélio	18
1.4.2.3. Nutrição e actividade decompositora dos cogumelos e acumulação de metais	19
1.4.2.4. Composição química dos cogumelos e acumulação de metais	20
1.4.2.5. Idade	22
1.4.2.6. Tamanho do cogumelo	22
1.4.2.7. Constituintes do cogumelo	23
1.5. Metais tóxicos	24

1.5.1. Cádmio.....	27
1.5.1.1. Considerações gerais	27
1.5.1.2. Exposição ao cádmio.....	27
1.5.1.3. Toxicocinética.....	28
1.5.1.4. Toxicidade do cádmio.....	30
1.5.2. Chumbo	32
1.5.2.1. Considerações gerais.....	32
1.5.2.2. Exposição ao chumbo	32
1.5.2.3. Toxicocinética.....	33
1.5.2.4. Toxicidade do chumbo	34
1.5.3. Crómio	36
1.5.3.1. Considerações gerais.....	36
1.5.3.2. Exposição ao crómio	36
1.5.3.3. Toxicocinética.....	37
1.5.3.4. Toxicidade do crómio	38
1.5.4. Níquel.....	40
1.5.4.1. Considerações gerais.....	40
1.5.4.2. Exposição ao níquel	40
1.5.4.3. Toxicocinética.....	41
1.5.4.4. Toxicidade do níquel	41
1.6. Análise de metais.....	43
1.6.1. Espectrofotometria de absorção atómica com atomização electrotérmica.....	44
1.6.1.1. Instrumentação	44
1.6.1.2. Preparação das amostras	47
1.6.1.3. Interferências.....	48
1.6.2. Doseamento de cádmio, chumbo, crómio total, crómio hexavalente e níquel em cogumelos	49
2. Objectivos	55
3. Materiais e métodos	57
3.1. Local de colheita dos cogumelos para análise.....	58

3.2. Amostras de cogumelos: sua caracterização.....	62
3.2.1. Amostras de cogumelos colhidas na Beira Interior.....	62
3.2.2. Amostras de cogumelos colhidas em Trás-os-Montes.....	66
3.3. Materiais e métodos.....	73
3.3.1. Reagentes.....	73
3.3.2. Equipamento.....	74
3.3.3. Colheita e preparação das amostras.....	74
3.3.3.1. Colheita e preparação das amostras de cogumelos.....	74
3.3.3.2. Colheita e preparação das amostras de solos	74
3.3.4. Digestão ácida das amostras para doseamento de cádmio, chumbo, crómio total e níquel.....	75
3.3.5. Extracção alcalina do crómio hexavalente.....	75
3.3.6. Análise das amostras.....	76
3.3.7. Medição do pH do solo.....	77
3.3.8. Análise estatística.....	77
4. Resultados e discussão	78
4.1. Validação do método	79
4.2. Avaliação da contaminação metálica.....	89
4.2.1. Cádmio.....	89
4.2.1.1. Teores de cádmio em cogumelos e solos.....	89
4.2.1.2. Factores de bioacumulação de cádmio.....	91
4.2.1.3. Influência da poluição na bioacumulação de cádmio pelos cogumelos.....	92
4.2.1.4. Diferenças entre algumas espécies de cogumelos na bioacumulação de cádmio.....	97
4.2.2. Chumbo	100
4.2.2.1. Teores de chumbo em cogumelos e solos.....	100
4.2.2.2. Influência da poluição na bioacumulação de chumbo pelos cogumelos	102

4.2.2.3. Diferenças entre algumas espécies de cogumelos na bioacumulação de chumbo.....	105
4.2.3. Crómio	107
4.2.3.1.Crómio total.....	107
4.2.3.1.1. Teores de crómio total em cogumelos e solos	107
4.2.3.1.2. Influência da poluição na bioacumulação de crómio total pelos cogumelos	109
4.2.3.1.3. Diferenças entre algumas espécies de cogumelos na bioacumulação de crómio total.....	111
4.2.3.2. Crómio hexavalente	113
4.2.3.2.1. Teores de crómio hexavalente em cogumelos e solo	113
4.2.3.2.2. Influência da poluição na bioacumulação de crómio hexavalente pelos cogumelos	115
4.2.3.2.3. Diferenças entre algumas espécies de cogumelos na bioacumulação de crómio hexavalente	117
4.2.4. Níquel.....	119
4.2.4.1. Teores de níquel em cogumelos e solos	119
4.2.4.2. Influência da poluição na bioacumulação de níquel pelos cogumelos ..	120
4.2.4.3. Diferenças entre algumas espécies de cogumelos na bioacumulação de níquel.....	123
5. Conclusões	125
6. Bibliografia	128

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Árvore filogenética universal simplificada segundo Carl Woese. Os fungos pertencem aos organismos eucariotas, próximo dos animais e das plantas [2].	2
Figura 2 - Estrutura de um cogumelo [1].	3
Figura 3 - Septo denominado de doliporo [5].	4
Figura 4 - Reprodução sexuada típica dos fungos da divisão Basidiomycota; a) hifas; b) fusão de hifas compatíveis; c) basidiocarpo; d) basídios que se formam nas lâminas do basidiocarpo; e) basídios com basidiosporos; f) basidiosporos.	5
Figura 5 – Metabolismo após exposição dos metais pesados adaptado de Goyer e Clarkson, [53].	25
Figura 6 - Metabolismo, distribuição de cádmio no organismo humano (adaptado de Godt., et al, 2006) [62].	29
Figura 7 – Esquema de fundamento da espectrofotometria de absorção atômica.	45
Figura 8 – Esquema de uma câmara de grafite [83].	46
Figura 9 – Distrito de Castelo Branco.	58
Figura 10 – Concelho de Idanha – a – Nova.	59
Figura 11 – Concelho de Vila Velha de Ródão	60
Figura 12 – Distrito de Bragança.	61
Figura 13 – Concelho de Vila Flor.	61
Figura 14 – <i>Agaricus sylvicola</i> [94].	62
Figura 15 – <i>Amanita caesarea</i> [94].	63
Figura 16 - <i>Amanita ponderosa</i> [6].	63
Figura 17 - <i>Amanita rubescens</i> [94].	64
Figura 18 - <i>Boletus regius</i> [94].	65
Figura 19 - <i>Volvariella gloiocephala</i> [8].	65

Figura 20 - <i>Amanita muscaria</i> [94].	66
Figura 21 - <i>Lactarius deliciosus</i> [6, 8].	67
Figura 22 – <i>Lactarius piperatus</i> [94].	67
Figura 23 – <i>Lactarius vellereus</i> [94].	68
Figura 24 – <i>Leucopaxillus giganteus</i> [8].	68
Figura 25 – <i>Lycoperdon perlatum</i> [8].	69
Figura 26 – <i>Macrolepiota procera</i> [8].	70
Figura 27 - <i>Psilocybe fascicularis</i> [94].	70
Figura 28 – <i>Suillus granulatus</i> [94].	71
Figura 29 – <i>Suillus luteus</i> [94].	71
Figura 30 – <i>Tricholoma acerbum</i> [6].	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Resumo de estudos realizados noutros países.....	50
Tabela 2 - Condições de análise por EAA/AE.	76
Tabela 3 – Concentração de soluções padrão utilizadas para a realização da curva de calibração.....	79
Tabela 4 - Eficácia do método.....	81
Tabela 5 – Resultados obtidos na medição do material certificado de líquens (Lichen – CRM 482).....	82
Tabela 6 – Resultados obtidos na medição do material certificado de solo (NCS ZC 73001).....	82
Tabela 7 - Resultado estatístico dos valores obtidos no método das adições para Cr(VI).	83
Tabela 8 – Constituintes principais dos cogumelos, usados para preparar a matriz simuladora utilizada no estudo de interferências [97].	84
Tabela 9 - Estudo de interferências para cádmio, chumbo e níquel.....	85
Tabela 10 – Estudo de interferências de Cr e Cr (VI).....	86
Tabela 11 – variação da medição de amostras de cogumelos analisados com concentrações mínimas, médias e elevadas de Cr(VI), nos diferentes constituintes.....	87
Tabela 12 - Concentrações ($\mu\text{g/g}$) de cádmio em cogumelos e solos.....	89
Tabela 13 - Factores de bioacumulação de cádmio obtidos e relação entre as concentrações encontradas no chapéu e no pé.	92
Tabela 14 - Teores de cádmio em cogumelos colhidos em áreas com possível contaminação e não contaminadas.	93
Tabela 15 - Valores encontrados para o factor de bioacumulação nos cogumelos, a relação entre as concentrações no chapéu e no pé e pH dos solos.....	94

Tabela 16 – Valores encontrados de cádmio nas diferentes partes de <i>Amanita ponderosa</i> , em zonas não contaminadas e em locais próximos de zonas com possível contaminação e também as concentrações nos respectivos solos.	95
Tabela 17 - Valores encontrados para o factor de bioacumulação no cogumelo <i>Amanita ponderosa</i> , a relação entre as concentrações no chapéu e no pé e pH dos solos.	96
Tabela 18 - Concentrações obtidas de cádmio nos chapéus e pés em diferentes espécies, bem como a sua relação e os factores de bioacumulação.	98
Tabela 19 - Resultados obtidos para o chumbo em amostras de cogumelos e solos, bem como os factores de bioacumulação e a relação entre as concentrações encontradas no chapéu e pé.	100
Tabela 20 - Resultados obtidos de chumbo em cogumelos colhidos em locais supostamente contaminados e não contaminados, bem como os factores de bioacumulação nos diferentes constituintes do cogumelo e a relação entre as concentrações no chapéu e no pé.	102
Tabela 21 - Valores encontrados nas amostras de <i>Amanita ponderosa</i> , em zonas não e contaminadas e também as concentrações nos solos e valores encontrados para os factores de bioacumulação.	104
Tabela 22 - Concentrações obtidas de chumbo nos chapéus e pés de diferentes espécies, bem como a sua relação e os factores de bioacumulação.	105
Tabela 23 – Concentrações de crómio total em cogumelos e solos, factores de bioacumulação e relação entre as concentrações encontradas nos chapéus e pés.	108
Tabela 24 – Resultados de crómio total em cogumelos colhidos em locais supostamente contaminados e não contaminados, bem como os valores encontrados para o factor de bioacumulação e a relação entre as concentrações no chapéu e no pé.	109
Tabela 25 - Valores de crómio total nas amostras de <i>Amanita ponderosa</i> , e nos solos, em zonas não e contaminadas, factor de bioacumulação nas diferentes partes do cogumelo e a relação entre as concentrações no chapéu e no pé.	110

Tabela 26- Concentrações de crómio total, nos chapéus e pés de diferentes espécies de cogumelos, bem como a sua relação e os factores de bioacumulação.....	111
Tabela 27- Concentrações de crómio hexavalente em cogumelos e solos, factores de bioacumulação de crómio hexavalente obtidos e relação entre as concentrações encontradas nos chapéus e pés.....	114
Tabela 28 - Conteúdos de crómio hexavalente em cogumelos colhidos em zonas supostamente contaminadas e não contaminadas, o factor de bioacumulação, a relação entre as concentrações no chapéu e no pé e pH dos solos.....	116
Tabela 29 - Valores de crómio hexavalente nas amostras de <i>Amanita ponderosa</i> , e nos solos, em zonas não contaminadas e supostamente contaminadas, a relação entre as concentrações no chapéu e no pé e o factor de bioacumulação	117
Tabela 30 - Concentrações de crómio hexavalente nos chapéus e pés em diferentes espécies, bem como a sua relação e os BCF.....	118
Tabela 31 - Concentrações de níquel em cogumelos e solos, factores de bioacumulação e relação entre as concentrações encontradas nos chapéus e pés.....	120
Tabela 32 - Resultados de níquel em cogumelos colhidos em locais possivelmente contaminados e não contaminados, valores encontrados para o factor de bioacumulação e a relação entre as concentrações.....	121
Tabela 33 - Valores encontrados de níquel nas amostras de <i>Amanita ponderosa</i> de solos colhidas em zonas não contaminadas e locais supostamente contaminados, valores do factor de bioacumulação e a relação entre as concentrações no chapéu e no pé.....	122
Tabela 34- Concentrações obtidas de níquel nos chapéus e pés em diferentes espécies, bem como a sua relação e os factores de bioacumulação.....	124

LISTA DE ESPÉCIES DE COGUMELOS CITADOS E NOMENCLATURA ATUALIZADA

Agaricus arvensis Schaeff.
Agaricus bisporus (J.E. Lange) Imbach
Agaricus campestris L.: Fr.
Agaricus haemorrhoidarius Schulzer in Kalchbr.
Agaricus macrosporus (Möller & Schaeff.) Singer (ver *Agaricus urinascens*)
Agaricus maleolens F.H. Möller
Agaricus sylvaticus Schaeff.
Agaricus sylvicola (Vittad.) Peck
Agaricus urinascens (Möller & Schaeff.) Pilát
Agaricus xanthodermus Genev.
Amanita caesarea (Scop.: Fr.) Pers.
Amanita echinocephala (Vittad.) Quél.,
Amanita muscaria (L.: Fr.) Lam.
Amanita ponderosa Malençon & Heim
Amanita rubescens Pers.
Amanita solitaria (Bull.: Fr.) Merát (ver *Amanita echinocephala*)
Auricularia auricula-judae (Bull.: Fr.) Schrot.
Auricularia mesenterica (Dicks.) Pers.
Boletus badius Fr.: Fr. (ver *Xerocomus badius*)
Boletus edulis Bull.: Fr.
Boletus erythropus (Pers.: Fr.) Krombh.
Boletus pinicola Vittad. (ver *Boletus pinophilus*)
Boletus pinophilus Pilát et Dermek
Boletus regius Krombh.
Calocybe gambosa (Fr.: Fr.) Donk.
Cantharellus cibarius Fr.

Chlorophyllum rhachodes (Vittad.) Vellinga
Clitocybe nebularis (Batsch: Fr.) P.Kumm.
Coprinus comatus (O.F. Müll.: Fr.) Pers.
Coprinus disseminatus (Pers.: Fr.) Gray
Crepidotus mollis (Schaeff.: Fr.) Staude
Dictyophora indusiata sensu autores britânicos (ver *Phallus impudicus*)
Dictyophora indusiata (Vent.) Desv. (ver *Phallus indusiatus*)
Ganoderma lucidum (Curtis: Fr.) P.Karst.
Grifola frondosa (Dicks.: Fr.) Gray
Hericium clathroides (Pall.) Pers.
Hygrophoropsis aurantiaca (Wulfen: Fr.) Maire
Hypholoma fasciculare (Huds.: Fr.) P. Kumm. (ver *Psilocybe fascicularis*)
Laccaria amethystina (Huds.→) Cooke
Laccaria laccata (Scop.: Fr.) Cooke
Lactarius deliciosus (L.: Fr.) Gray
Lactarius deliciosus (L.: Fr.) Gray
Lactarius piperatus (L.: Fr.) Pers.
Lactarius vellereus (L.: Fr.) Fr.
Leccinum aurantiacum (Bull.) Gray
Leccinum scabrum (Bull.: Fr.) Gray
Lentinula edodes (Berk.) Pegler
Lentinus crinitus (L.) Fr.
Lentinus tigrinus (Bull.: Fr.) Fr.
Lepiota procera (Scop.: Fr.) Quéf. (ver *Macrolepiota procera*)
Lepista nuda (Fr.: Fr.) Cooke
Leucopaxillus giganteus (Leyss.: Fr.) Singer
Lycoperdon perlatum Pers.: Pers.
Macrolepiota procera (Scop.: Fr.) Singer
Macrolepiota rachodes (Vittad.) Singer (ver *Chlorophyllum rachodes*)
Mycena pura (Pers.: Fr.) P. Kummer
Phallus impudicus L.
Phallus indusiatus Vent.
Phanerochaete chrysosporium Burds.

Pleurotus ostreatus (Jacq.: Fr.) P. Kumm.
Psilocybe fascicularis (Huds.: Fr.) Noordel.
Ramaria cyanocephala (Berk. & M.A. Curtis) Corner
Rhizina undulata Fr.
Russula cyanoxantha (Schaeff.) Fr.
Russula delica Fr.
Russula emetica (Schaeff.: Fr.) Fr.
Russula vesca Fr.
Schizophyllum commune Fr.
Stereum hirsutum (Willd.: Fr.) Gray
Suillus bovinus (L.: Fr.) Kuntze
Suillus granulatus (L.: Fr.) Roussel
Suillus grevillei (Klotzsch) Singer
Suillus luteus (L.: Fr.) Gray
Thamnomycetes dendroidea Cooke & Massee
Trametes versicolor (L.: Fr.) Pilát
Tremella fuciformes Berck
Tricholoma acerbum (Bull.: Fr.) Quéf.
Tricholoma equestre (L.: Fr.) P. Kumm.
Tricholoma portentosum (Fr.: Fr.) Quéf.
Volvariella gloiocephala (DC.: Fr.) Boekhout & Enderle
Xerocomus subtomentosus (L.: Fr.) Quéf.
Xerocomus badius (Fr.: Fr.) J.-E. Gilbert
Xylaria hypoxylon (L.: Fr.) Grev.

ABREVIATURAS

ALA – Ácido δ -aminolevulínico

ALAD – Ácido δ -aminolevulínico desidratase

ALDH – Aldeído desidrogenase

BAL – “British anti-Lewisite”

BCF – Factor de bioacumulação

Cd – Cádmio

Cr – Crómio total

Cr(III) – Crómio trivalente

Cr(VI) – Crómio hexavalente

DMSA – Ácido dimercaptossuccínico

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EAA/AE – Espectrofotometria de absorção atómica com atomização electrotérmica

EDTA – Ácido etilenodiaminatetracético

EPA – Agência protectora do ambiente (“Environmental Protection Agency”)

ICP – Espectrofotometria de emissão por plasma (“Inductly couple plasma”)

ICP-AE – Espectrofotometria de emissão atómica com plasma indutivo

ICP-MS – Espectrometria de massa com plasma indutivo

Ni – Níquel

Pb – Chumbo

PCR – Reacção em cadeia da Polimerase

PSK – Polissacarídeo Krestin

PSP – Polissacarídeo peptídeo

RESUMO

Desde há muitos anos que os cogumelos fazem parte da nossa alimentação devido à sua composição nutricional, nomeadamente proteínas, hidratos de carbono, vitaminas e alguns minerais. Das muitas espécies existentes algumas são tóxicas sendo um perigo para a saúde humana.

Os cogumelos têm sido utilizados como bioindicadores da contaminação ambiental provocada por alguns metais pesados, tais como, o cádmio, cobre, chumbo, crómio, mercúrio e zinco. Os principais factores que influenciam a acumulação dos metais pesados pelos macromicetes são essencialmente factores ambientais (concentração do metal no solo, o pH, a matéria orgânica presente e a contaminação proveniente da deposição atmosférica) e factores dependentes do fungo (a sua estrutura, a composição bioquímica, actividade decompositora).

A finalidade deste trabalho consistiu em quantificar por espectrofotometria de absorção atómica com atomização electrotérmica (EAA/AE), a quantidade de cádmio, chumbo, crómio total, crómio hexavalente [Cr (VI)] e níquel em cogumelos e solos colhidos em diversas zonas das regiões da Beira Interior e Trás-os-Montes. Analisaram-se 37 amostras de cogumelos e de solos, colhidas em várias áreas com diferentes contaminações. A preparação das amostras consistiu na dissolução ácida para a determinação de cádmio, chumbo, crómio total e níquel, e na extracção em meio alcalino para a dissolução selectiva do crómio hexavalente.

Os valores médios de cádmio encontrados nos cogumelos foram de $0,693 \pm 0,343$ µg/g nos chapéus, $0,391 \pm 0,255$ µg/g nos pés e nos solos $0,012 \pm 0,004$ µg/g. Os cogumelos continham teores de chumbo de $0,167 \pm 0,163$ µg/g nos chapéus, $0,230 \pm 0,172$ µg/g nos pés e nos solos $0,447 \pm 0,079$ µg/g. Os valores de crómio total e hexavalente contidos nos cogumelos foram respectivamente de $1,14 \pm 1,03$ e $0,103 \pm 0,045$ µg/g nos

chapéus, $1,11 \pm 0,55$ e $0,143 \pm 0,061$ $\mu\text{g/g}$ nos pés e nos solos $84,0 \pm 34,5$ e $0,483 \pm 0,170$ $\mu\text{g/g}$. Os valores médios de níquel presentes nos cogumelos foram de $1,12 \pm 0,51$ $\mu\text{g/g}$ nos chapéus e de $1,88 \pm 0,36$ $\mu\text{g/g}$ nos pés e nos solos $73,98 \pm 39,59$ $\mu\text{g/g}$.

Com os resultados obtidos pretendeu-se comparar a acumulação nas diferentes partes dos cogumelos (chapéu e pé), relacionar a sua ecologia (saprófitas e micorrízicos), bem como interpretar de acordo com os tipos de solos das duas regiões. Pretendeu-se relacionar as concentrações dos metais pesados encontradas nestes macromicetes com as doseadas nos solos pela determinação do factor de bioacumulação (BCF) e encontrar diferenças entre algumas espécies.

ABSTRACT

Mushrooms constitute part of the human diet because they provide carbohydrates, proteins, vitamins, minerals and trace elements. Moreover, mushrooms are considered a delicacy and are traditional to the cuisine culture of some countries. But some of mushrooms species are toxic, being a danger for the human health.

Mushrooms has been used as bioindicators of the heavy metal pollutions, such as, cadmium, copper, lead, chromium, mercury and zinc. The principal factors influencig the accumulation of heavy metals in macrofungi are environmental factors, such as metal concentration in the soil, pH, organic matter and contamination by atmospheric deposition, and fungal factors, like, fungal structure, biochemical composition, decomposition activity and morphological portion.

The purpose of this investigation was to validate a method to quantify cadmium, total chromium, hexavalent chromium, lead and nickel in mushrooms by ETAAS and subsequent application to measure the levels of these metals in mushrooms and underlying soils, collected in two regions of Portugal (Beira Interior and Trás-os-Montes). Thirty seven wild mushrooms were analysed and the 37 respective underlying soil samples collected in two different regions of Portugal with different locations regarded as non-contaminated or contaminated areas. The species were identified by a mycologist. The method includes a sample pre-treatment for cadmium, total chromium, lead and nickel dissolution using a wet acid digestion procedure and a selective alkaline extraction for hexavalent chromium.

The mean values for cadmium were $0,693 \pm 0,343$ $\mu\text{g/g}$ for caps, $0,391 \pm 0,255$ $\mu\text{g/g}$ for stalk and $0,012 \pm 0,004$ $\mu\text{g/g}$ for soils. The contents of lead found in mushrooms were $0,167 \pm 0,163$ $\mu\text{g/g}$ for caps, $0,230 \pm 0,172$ $\mu\text{g/g}$ for stalks and $0,447 \pm 0,079$ $\mu\text{g/g}$ for soils. The mean values found for total Cr were $1,14 \pm 1,03$ and $1,11 \pm 0,55$ $\mu\text{g/g}$ dry weight and for Cr (VI) the mean values were $0,103 \pm 0,045$ and $0,143 \pm 0,061$ $\mu\text{g/g}$ dry weight for cap and stalk, respectively. For soils, the mean

concentrations found were for total Cr $84,0 \pm 34,5 \mu\text{g/g}$ and for Cr (VI) $0,483 \pm 0,170 \mu\text{g/g}$. The mean values found for nickel were $1,12 \pm 0,51 \mu\text{g/g}$ for caps $1,88 \pm 0,36 \mu\text{g/g}$ for stalk and $73,98 \pm 39,59 \mu\text{g/g}$ for soils.

The results were tentatively related to some factors such as metal contents in substrate from both regions, the different portions of mushrooms (cap and stalk), the ecology of mushrooms (mycorrhizal and saprophyte) and biacumulation factor.

1. INTRODUÇÃO

1.1. COGUMELoS

Os cogumelos são a frutificação de alguns fungos filamentosos e pluricelulares, designados por macromicetes, pertencentes ao filo *Basidiomycota* e *Ascomycota*, do reino *Fungi* (verdadeiros fungos) [1-4].

Com todas as dificuldades de definir os fungos, sabe-se que são seres eucariotas, desprovidos de clorofila, que se reproduzem por esporos e cuja nutrição é por absorção. Neste grupo, além dos macromicetes, são incluídos outros organismos de formas e dimensões muito variadas, conhecidos correntemente como leveduras ou bolores [1, 5]. Este seres situam-se muito próximo dos animais (figura 1).

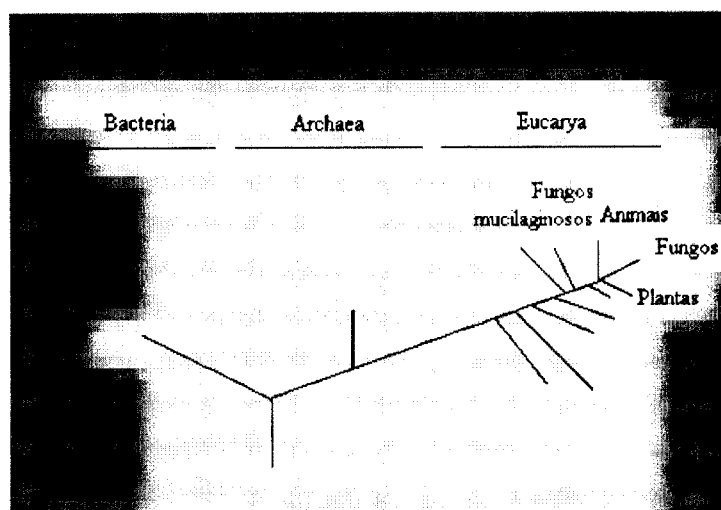


Figura 1 – Árvore filogenética universal simplificada segundo Carl Woese. Os fungos pertencem aos organismos eucariotas, próximo dos animais e das plantas [2].

1.1.1. Estrutura e morfologia

Uma grande parte das espécies de cogumelos (figura 2) tem a forma de guarda-chuva, um chapéu e um pé, mas também existem cogumelos cujas formas podem ser de bola, estrela, favo de mel, entre outras. O chapéu pode apresentar uma forma plana, ogival, campanulada, cônica, convexa, deprimida ou umbilicada [6]. Sob o chapéu existe uma superfície mole, denominada por himenóforo, onde se produzem os esporos. Os himenóforos podem ser de várias formas, como lâminas, lisos, tubos ou poros. O pé pode ter uma configuração radicante, sub – radicante, bulbosa ou inchada. No pé encontram-se outras estruturas importantes: a volva e o anel. O anel é como uma pequena membrana que se descobre no meio do pé e a volva encontra-se na base do cogumelo e é semelhante a um pequeno saco. A cor do cogumelo é variável de espécie para espécie e também pode alterar consoante o estado de maturação. A sua consistência também varia, podendo ser carnosos, gelatinosos ou cartilaginosos [6].

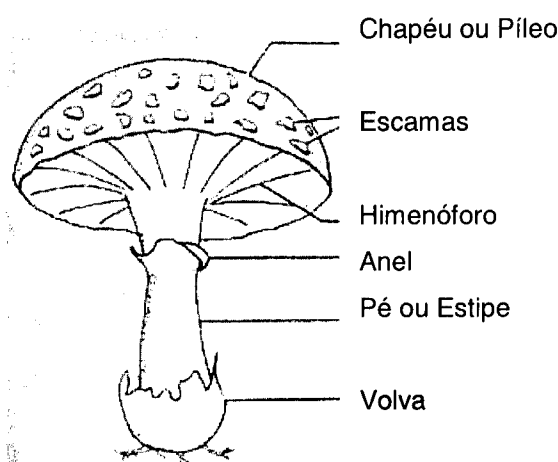


Figura 2 - Estrutura de um cogumelo [1].

A estrutura vegetativa de um fungo denomina-se micélio. Nos fungos filamentosos, o micélio é constituído por filamentos ou hifas. O citoplasma dos filamentos pode ser interrompido irregularmente por invaginações interiores da parede celular denominadas por septos, que dividem as hifas em compartimentos, constituindo hifas septadas. Os septos dos basidomicetes têm a forma especial e característica de barril designados doliporos (figura 3). Neste caso as hifas são

perfuradas, permitindo a passagem do citoplasma e dos seus organitos através delas [5].

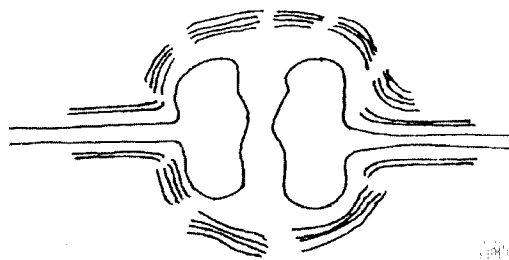


Figura 3 - Septo denominado de doliporo [5].

Os fungos são portanto organismos vivos, cuja parede celular, ao contrário das plantas, é constituída essencialmente por quitina e não contém clorofila. A composição química da parede é característica dos diferentes grupos taxonómicos. Os principais constituintes da parede celular são os polissacáridos, associados a proteínas e lípidos. Nos basidomicetes o polissacárido principal é a quitina (longas cadeias de ligações β -1,4 de unidades de N-acetilglucosamina) mas também pode ter outros polissacáridos como glucanos (polímero da glucose). A membrana citoplasmática é constituída essencialmente por esteróides, lípidos e proteínas. O esteroide mais importante é o ergosterol [5].

1.1.2. Reprodução

A reprodução dos fungos produtores de cogumelos (figura 4) é sexuada, sendo muito complexa, podendo eventualmente variar de espécie para espécie, mas que pode ser resumida de uma forma simples. No cogumelo existem esporos, que são estruturas microscópicas que contêm a informação genética e que se podem encontrar no himénio, sob o chapéu ou no interior de corpos frutíferos, em forma de bola. Quando maduros, os esporos caem no solo e ao germinarem produzem uns filamentos longos e ramificados, que se designam por hifas as quais originarão os micélios primários. Estas hifas têm sexos diferentes denominados por mais (+) e menos (-) (heterotalismo). Quando duas hifas compatíveis se encontram (uma hifa + com uma hifa -) juntam-se célula a célula

(somatogamia), originando um micélio secundário com células binucleadas. São estes micélios que irão produzir os cogumelos. A célula apical deste micélio dá origem a uma estrutura especial onde se produzem os esporos que contém quatro ou oito esporos resultantes da cariogamia (fusão dos núcleos) e da meiose do núcleo formado (zigoto) [1].

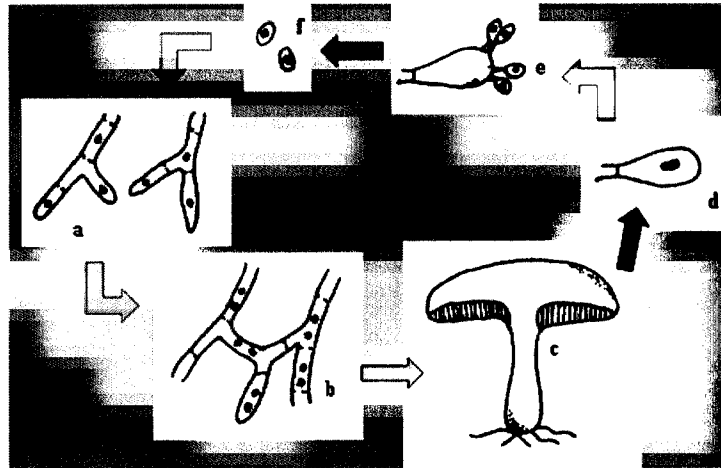


Figura 4 - Reprodução sexuada típica dos fungos da divisão Basidiomycota; a) hifas; b) fusão de hifas compatíveis; c) basidiocarpo; d) basídios que se formam nas lâminas do basidiocarpo; e) basídios com basidiosporos; f) basidiosporos.

Em algumas espécies, nomeadamente pertencentes aos géneros *Agaricus*, *Coprinus* e *Volvariella*, demonstrou-se a existência de reprodução assexuada [1].

Os cogumelos pertencentes a algumas espécies do género *Agaricus* produzem uma estrutura designada por conídio, semelhante ao esporo. Esta estrutura tem a possibilidade de germinar e originar um novo micélio ou pode comportar-se como espermacia e unir-se com uma hifa de sinal contrário [1]. Em algumas espécies como *Coprinus cinereus*, e *Volvariella volvacea*, a reprodução assexuada é feita por estruturas designadas por clamidosporos. Estas estruturas são células de hifas, cujas paredes celulares se tornam muito finas, que têm a capacidade de se separar das hifas progenitoras e ao germinarem originam um micélio [1].

1.1.3. Nutrição

Os fungos são seres heterotróficos que obtêm a sua energia pela ruptura de moléculas orgânicas, e, ao contrário das plantas, não podem sintetizar moléculas orgânicas a partir de moléculas inorgânicas. Alimentam-se pela secreção de exoenzimas para o substrato em redor. Estas enzimas rompem as moléculas orgânicas exteriores ao organismo e os fragmentos obtidos são absorvidos pelas células fúngicas. Normalmente estas exoenzimas pertencem ao grupo das fenoloxidasas, que os fungos utilizam para degradar celulose, ácido húmico e outros compostos [7].

A nutrição entre as diferentes espécies de cogumelos também é variável. De um modo geral são seres aeróbios [2, 5]. Podem ser saprófitas, vivendo sobre os restos orgânicos. Estes fungos são capazes de reciclar matéria orgânica morta, visto serem capazes de quebrar enzimaticamente lignina e celulose e converter estas substâncias úteis para a sua nutrição e para outros seres [8]. Também existem fungos simbióticos que estão associados às raízes de plantas, designados por micorrizas. Nesta associação, nos fungos produtores de cogumelos, o micélio envolve-se com a raiz da planta, sendo este organismo protegido da desidratação e de parasitas, e por sua vez, o fungo recebe a energia que necessita [8]. Os cogumelos necessitam de matéria orgânica para sobrevivência, e são decompositores por excelência. São capazes de mobilizar iões e metais existentes no solo. Contrariamente às plantas que acumulam amido, os cogumelos acumulam glicogénio como os animais. Os fungos micorrízicos conseguem uma grande fixação de água, e têm grande capacidade de quebrar cadeias longas de macromoléculas, como a celulose, transformando-a em mono e dissacarídeos, azoto e dióxido de carbono [1, 5].

1.1.4. Identificação e denominação

A denominação dos cogumelos pode ser feita de um modo popular e de um modo científico. O modo popular tem a desvantagem da variedade de nomes que pode ser atribuída a um mesmo cogumelo, dependendo da região.

Para a sua identificação, é necessário conhecer as características macroscópicas, como os seus caracteres organolépticos (cheiro, cor, sabor) e microscópicas, recorrendo à visualização por microscopia e à utilização de reagentes químicos. Para um melhor estudo, pesquisa e identificação utilizam-se estudos genéticos e moleculares como os que recorrem a técnicas de PCR [5, 6].

1.1.5. Utilização

Os cogumelos têm várias utilizações, principalmente alimentares, medicinais e artesanais. Algumas espécies alucinogénicas ou enteogénicas estão interrelacionadas com a génese de algumas religiões [9-13]. Como alimento, são muito apreciados graças à sua variedade de sabores e aromas e à grande riqueza alimentar devido ao seu teor em proteínas, vitaminas, sais minerais e micro elementos tais como o cobre e fósforo [14]. De um modo geral 80 a 90% da sua constituição é água, 2 a 13% glícidos, 0,5 a 1,5% sais minerais, 0,5 a 7% proteínas, 0,5 a 2% lípidos. Também contêm diversas vitaminas tais como A, B1, B2, B6, C, ácido pantoténico, entre outras.

Os cogumelos também podem ser bons indicadores de poluição ambiental. Com o desenvolvimento industrial e agrícola, aumentaram os contaminantes ambientais, como os pesticidas, elementos radioactivos e os metais pesados no ar, água e solo e os cogumelos têm a capacidade de acumular estes contaminantes ambientais. Algumas espécies podem acumular níveis elevados de contaminantes, sendo óptimos bioindicadores de poluição.

A nível medicinal, são muito utilizados na medicina oriental, com efeito imunomodulador. Existem estudos descritos em que a administração de produtos derivados dos cogumelos faz aumentar a percentagem de células T em humanos [15, 16] e são utilizados como adjuvantes de quimioterapia no tratamento de

certos cancros. Vários polissacarídeos imuno-moduladores foram descobertos em cogumelos, como a “lentinan”, proveniente da espécie *Lentinula edodes*, “schizophylano” descoberto no *Schizophyllum commune*, PSK (polissacarídeo Krestin) e PSP (polissacarídeo peptídeo), componentes da espécie *Trametes versicolor*, e “grifon D” que existe na espécie *Grifola frondosa* [15].

Segundo uma pequena revisão realizada por Borchert *et al.*, de 2004 [16], estudos feitos em humanos com tumores em diversas fases demonstraram que a administração por via oral de “lentinan” e “schizophylano” provocou um aumento do número de células T e de macrófagos. Também se demonstrou que o PSK e o PSP são imunoestimuladores que aumentam o número total de leucócitos, interferão gama e interleuquinas em humanos [16]. Essa mesma revisão apresenta um estudo realizado em ratos com cancros. Ao administrarem-se extractos e porções de diversos cogumelos ou seus constituintes por diversas vias de administração, houve uma inibição dos tumores e um aumento do tempo de vida dos ratos na maioria dos casos [16]. Estes fungos estão relacionados com a prevenção de cancros, não só pelas suas propriedades imuno-moduladoras, mas também como inibidores da promoção e progressão de certos tumores por um efeito directo de citotoxicidade, e podem interferir na iniciação de um tumor por diversos mecanismos tais como alteração de enzimas envolvidas na metabolização e destoxificação de certos compostos mutagénicos [16].

Outros autores [6] referem o uso de cogumelos no tratamento de outras patologias como as hiperlipidemias e hiperglicemias. Demonstrou-se que cogumelos das espécies *Auricularia auricula-judae* e *Tremella fuciformes*, diminuíam os valores de colesterol total e das lipoproteínas de baixa densidade no sangue de humanos.

1.2. CONTAMINANTES DOS COGUMELOS: METAIS PESADOS, RADIOACTIVIDADE E OUTROS POLUENTES AMBIENTAIS

Com o aumento da actividade antropogénica a nível da agricultura e da indústria, a presença de poluentes tóxicos, como os metais pesados, elementos radioactivos e pesticidas tem aumentado muito no meio ambiente. Grandes quantidades destes poluentes são lançados na água, ar e solo e que por fim penetram nos organismos vivos. Desde há muito tempo que se tem verificado a presença de poluentes ambientais em peixes, fungos e outros seres vivos e desde aí aumentou a preocupação ambiental.

Vários metais pesados foram doseados em cogumelos edíveis, como o cádmio, chumbo, mercúrio, ferro, níquel, prata, cobre, cobalto e zinco [6, 17, 18]. A relação existente entre a quantidade de metal contido no cogumelo e o substrato depende de vários factores entre os quais o tipo de metal, o tipo de cogumelo, a sua nutrição, o tipo de solo, o local proveniente do fungo, entre outros. O chumbo, um dos metais que suscita uma grande preocupação ambiental é um dos metais que os cogumelos têm pouca apetência para acumular. Os cogumelos que continham este metal em maiores concentrações, situam-se em zonas muito poluídas. No caso do cádmio e do mercúrio acontece uma situação diferente. Estes dois metais são mais absorvidos pelos cogumelos, visto que têm alguma tendência para se ligarem a compostos existentes na estrutura do cogumelo, como fosfoglicoproteínas e moléculas com grupos de enxofre. É importante realçar que também foi caracterizado mercúrio na forma de metilmercúrio, extremamente tóxico em algumas espécies de cogumelos [17, 18].

Mas não são só metais pesados que os cogumelos podem captar. Também já foram descobertos iões radioactivos em cogumelos colhidos nas proximidades das zonas onde se realizam testes nucleares. Em cogumelos capturados perto de Chernobyl, demonstrou-se a presença de isótopos radioactivos tal como iodo-131 e o radiocésio. A quantidade existente destes elementos depende dos mesmos factores que depende a acumulação de metais pesados [18-22]. Desde o acidente

de Chernobyl, os estudos de pesquisa de radioactividade em alimentos aumentou na Europa [19-21]. Um desses estudos foi efectuado no norte de Itália entre 1986 e 2002 [19] em que se pretendeu pesquisar radiocésio (Cs-137) em cogumelos. Segundo os autores deste estudo, a concentração deste ião radioactivo não tende a diminuir significativamente nos cogumelos com o tempo. Verificaram que há variações de quantidades detectadas de radioactividade entre cogumelos cujo micélio cresce de um modo mais superficial e os que o micélio cresce de um modo mais vertical. Os autores, Giovani *et al*, concluíram que a acumulação dos iões radioactivos é maior no chapéu e nas lamelas. Verificaram que nos cogumelos saprófitas se detectam níveis mais elevados de radioactividade do que nos cogumelos micorrízicos. Outro resultado deste estudo consistiu na verificação da capacidade dos cogumelos absorverem Cs-137, que não é tão expressiva nas plantas superiores [19]. Uma das preocupações que resultou do estudo é o facto das hifas dos cogumelos perpetuarem os reservatórios naturais de Cs-137.

Outras substâncias que estes fungos podem acumular são os pesticidas, muito utilizados na agricultura [18]. Em algumas culturas de cogumelos, verificou-se a existência de várias substâncias (pesticidas) com uma certa frequência para evitar o aparecimento de doenças e de pragas. Entre as substâncias encontradas figuram o tiabendazole, a carbandazina e o procloraz-manganésio [23-25].

Na Irlanda do Norte foi realizado um estudo para avaliação de resíduos de pesticidas em cogumelos de cultura [24]. Os cogumelos foram colhidos em diferentes campos de cultivo e analisados por várias técnicas cromatográficas (HPLC e GC). Nestes cogumelos detectaram-se resíduos de vários pesticidas utilizados pelos agricultores. Em cento e quarenta e cinco amostras, noventa apresentaram resíduos de pesticidas e num total de trinta e uma amostras detectaram-se dois ou mais resíduos. Dos vários pesticidas pesquisados, os encontrados em maior quantidade foram o diflubenzur e a carbendazina. Neste estudo também se conclui que os resíduos detectados se encontram em níveis toxicologicamente aceitáveis [24].

Os resíduos de pesticidas, nomeadamente os fungicidas podem causar alterações na própria estrutura do cogumelo. Noutro estudo realizado por Dolores Bernardo *et al.*, em 2004 [25], demonstrou-se que o fungicida Procloraz-Mn, utilizado no cultivo dos cogumelos, pode alterar a parede celular do fungo parasita e também a do fungo hospedeiro. Neste estudo, o Procloraz-Mn utilizado na dose

LD₅₀ para o cogumelo *Agaricus bisporus*, inibiu parcialmente a biossíntese de proteínas da parede celular do micélio vegetativo, provocando mudanças significativas na estrutura polissacarídica da parede celular [8, 25].

1.3. OS COGUMELOS COMO POTENCIAIS BIOMARCADORES DE POLUIÇÃO POR METAIS PESADOS

Entre os organismos presentes nos ecossistemas terrestres, destacam-se os macromicetes como potenciais biomarcadores devido à sua ubiquidade, extensa e íntima integração no meio. Estes organismos têm uma ligação indispensável na cadeia dos processos naturais de captação de água e nutrientes, transporte destes e na conversão de resíduos orgânicos. O micélio dos fungos pode captar e bioacumular os metais pesados, transferindo-os posteriormente para os cogumelos onde, por vezes, se acumulam em concentrações superiores às do substrato [7, 8, 26].

Os cogumelos são excelentes bioindicadores de metais pesados nos solos, como cádmio, mercúrio e cobre, visto que estes metais se encontram em níveis superiores no macromicete do que no solo [27-39]. O contrário acontece com os metais como o chumbo e ferro, cujas concentrações determinadas no solo são normalmente superiores às determinadas no cogumelo. Os níveis de zinco e manganês são comparáveis entre o cogumelo e o substrato [27-39].

Segundo uma revisão feita por Kalac e Svoboda em 2000 [27], os cogumelos podem ser muito úteis na distinção entre áreas não poluídas e poluídas. Esta mesma revisão refere que grandes concentrações de metais pesados em cogumelos foram observadas em zonas muito poluídas, como nas proximidades de estradas com muito trânsito, zonas industriais, cidades e zonas de emissão. Estes autores mencionam ainda que em zonas perto de fundições e minas as concentrações de metais pesados presentes em cogumelos eram elevadas [27]. Algumas espécies como a *Mycena pura*, *Lepista nuda* e *Lycoperdon perlatum* são boas bioacumuladoras de chumbo, um metal presente em grandes quantidades nos solos de zonas muito poluídas.

Os mecanismos de acumulação ainda não são bem conhecidos, mas pensa-se que estão associados à formação de quelatos com grupos sulfidrilo das proteínas, à ligação com metionina presente nos cogumelos [27, 40] e também

por captação pelos ácidos orgânicos presentes nos cogumelos, nomeadamente ácido cítrico, oxálico e ácido quínico [41]. Estes ácidos possuem uma grande afinidade para os metais pesados, como cádmio e chumbo [42, 43]

Da mesma forma que os cogumelos são indicados como bioacumuladores, alguns autores também ponderaram a hipótese de considerar algumas espécies como “bioexclusores” para certos metais, isto é, a baixa capacidade dos cogumelos para acumularem metais [40]. Por exemplo, num estudo efectuado em Paris por Michelot *et al.*, 1997 [40], considerou-se que a espécie *Phallus impudicus* tem uma fraca capacidade de acumular manganês, a qual poderá ser indicada como um “bioexclutor” deste elemento. Nem sempre é possível indicar a “bioexclusão” porque nem todas as espécies têm o mesmo comportamento e nem todas crescem em solos de igual constituição.

1.4. FACTORES DE BIOACUMULAÇÃO DOS METAIS PESADOS PELOS COGUMELOS

Vários factores estão relacionados com a acumulação dos metais pesados pelos cogumelos, sendo estes essencialmente factores ambientais e factores dependentes do próprio cogumelo, como a espécie, idade, tamanho do chapéu e constituição química. Nos factores ambientais englobam-se a composição dos substratos, pH e capacidade de adsorção do solo.

1.4.1. Factores ambientais relacionados com o solo

A presença e disponibilidade dos metais pesados nos solos dependem de factores múltiplos. O solo tem uma composição complexa e heterogénea, constituído por sólidos orgânicos, minerais, compostos aquosos e gasosos, que podem reagir com o metal formando-se complexos. Estes últimos modificam a eficiência da absorção do metal pelo cogumelo.

Um outro factor que pode afectar a biodisponibilidade do metal é o pH do solo [7, 44].

1.4.1.1. pH

O pH dos solos é um dos factores principais que controla a disponibilidade dos metais e que afecta todos os mecanismos de adsorção do metal em solução no solo. A maior parte dos metais têm uma maior disponibilidade a pH ácido. Os solos ácidos proporcionam uma maior mobilidade do cádmio, mercúrio e zinco e uma mobilidade reduzida do cobre e do chumbo [7, 26, 40].

1.4.1.2. Matéria orgânica

Os metais pesados têm uma elevada afinidade para a matéria orgânica, especialmente o cobre, chumbo e zinco. A matéria orgânica reage com os metais pesados de duas formas distintas: 1 - formando complexos por troca catiónica, originando compostos catiónicos ou 2 - formando quelatos que influenciam a disponibilidade metálica. Esta disponibilidade está normalmente associada à formação de complexos dos metais com substâncias do húmus e outros compostos de elevado peso molecular [40, 44].

1.4.1.3. Concentração dos metais

Vários estudos demonstraram que quanto maior a concentração dos metais no solo, maior a sua presença nos cogumelos [27, 44].

Alguns estudos efectuados em zonas muito poluídas como fundições, minas e zonas com muito trânsito, com o objectivo de dosear chumbo em cogumelos, concluíram que os cogumelos que cresciam em solos com concentrações elevadas deste metal continham níveis mais altos do que aqueles que cresciam em zonas pouco poluídas, não obstante a geral baixa capacidade dos fungos captarem este elemento.

Os cogumelos, pertencentes ao mesmo grupo taxonómico, provenientes de cultivo normalmente contêm menor concentração de metais pesados do que os que crescem nos bosques contaminados, pois os primeiros crescem em solos com poucos metais pesados [27].

O transporte de cádmio e mercúrio nos cogumelos pode fazer-se por um sistema semelhante ao dos metais essenciais, como o cobre e o zinco. É de realçar que embora a concentração dos metais no solo esteja correlacionada positivamente com a encontrada nos cogumelos, a acumulação destes metais nos

fungos é mais eficiente em concentrações baixas no solo, visto que estes metais em altas concentrações produzem efeitos tóxicos nas membranas dos cogumelos, podendo comprometer o desenvolvimento destes organismos [7, 27, 40].

Por vezes existem excepções. Num estudo realizado por Barcan *et al.*, 1998 [45], a concentração de crómio doseada em cogumelos, não apresentava grandes variações de zonas poluídas para zonas não poluídas. Neste mesmo estudo, concluiu-se que não existe correlação entre a absorção deste metal, por parte dos cogumelos, e a poluição dos solos.

Alguns metais como o alumínio, cobre, níquel e manganês podem ser tóxicos para alguns fungos micorrízicos, visto que o crescimento destes fungos diminui em zonas muito contaminadas por estes metais [46].

1.4.1.4. Formas químicas dos metais pesados no solo

Os metais podem existir no solo sob várias formas. Existem principalmente na forma catiónica, facilmente disponíveis. Também se podem encontrar em compostos formados por trocas iónicas ou em compostos originados por precipitação com carbonatos, sulfatos e hidróxidos presentes no solo. Os metais podem estar presentes em formas orgânicas ou incorporados na matriz biológica, estando disponíveis no solo após a sua decomposição. Os metais que estão nas estruturas minerais ficam disponíveis após a erosão [7, 27, 40, 44]. Um exemplo é o caso de crómio. Na forma do crómio trivalente é fortemente retido nas partículas do solo, enquanto que o Cr(VI) é fracamente adsorvido e fica rapidamente disponível para ser absorvido pelas plantas [47]. Num estudo efectuado na Eslovénia, realizado por Slekovec e Irgolic em 1996 [48], com o objectivo de estudar a captação do arsénio pelos cogumelos, concluiu-se que estes acumulam arsénio em maior quantidade no chapéu e a sua acumulação está dependente da natureza dos compostos de arsénio presentes no solo. Existe uma correlação positiva no género *Laccaria* e a acumulação de arsénio; a concentração de arsénio presente nos chapéus das espécies *Laccaria amethystina* e *Laccaria*

laccata era proporcional à existente no solo. Na espécie *Laccaria amethystina* foi identificado exclusivamente o ácido dimetilarsénico e na espécie *Laccaria laccata* foram identificados ácido dimetilarsénico e arsenato.

1.4.1.5. Capacidade de adsorção ou fixação do solo

A capacidade de adsorção dos metais pesados no solo depende de todos os factores antes mencionados e de outros como as interacções entre os diversos metais, a capacidade de troca catiónica, as características reacções de oxidação-redução do solo e a estrutura e composição mineral [7, 17].

1.4.1.6. Contaminação por deposição atmosférica

A atmosfera representa um importante meio para transporte dos metais. No ar os metais encontram-se em pós e partículas de aerossol de pequenas dimensões. Uma fonte natural de contaminação atmosférica por metais pesados é a emissão vulcânica e industrial.

A poluição atmosférica pode provocar a contaminação dos cogumelos por duas vias: 1 - por deposição nos solos e 2 – deposição directa dos metais nos cogumelos. Destaca-se a importância da deposição atmosférica nos solos de cádmio e chumbo [17, 27, 40]. A poluição atmosférica também pode aumentar a biodisponibilidade dos metais pesados dos solos pela acidificação destes [46].

1.4.2. Factores dependentes dos cogumelos

1.4.2.1. Espécie

A espécie de cogumelos pode ser um factor muito importante na acumulação dos metais. Vários estudos demonstraram que certas espécies têm mais aptidão de acumular alguns metais que outras [26, 27, 40, 44]. Algumas espécies pertencentes ao género *Agaricus* têm uma grande afinidade para o cobre, prata e cádmio. Os cogumelos micorrízicos ou que crescem em zona florestal têm maior tendência de acumular crómio, manganês, selénio e chumbo [40].

1.4.2.2. Estrutura do micélio

Um aspecto importante a ter em consideração é a distribuição e posição que o micélio ocupa no solo. A estrutura do micélio dos fungos ocupa uma área superior às das raízes das plantas. Em 1 centímetro cúbico de solo superficial podem existir 2 a 4 centímetros de raízes de plantas e 50 metros de hifas. As hifas têm um diâmetro muito fino (2 a 4 nanómetros) o que as permite penetrar nos microporos do solo. Os micélios dos cogumelos crescem fundamentalmente no sentido horizontal, ocupando normalmente a superfície do solo. Esta distribuição depende do tipo do solo e das espécies [7, 26, 38, 44]. Na superfície do solo encontra-se a maior concentração de metais pesados como o cádmio, cobre, chumbo e zinco, onde se encontra a maior parte do micélio dos cogumelos saprófitas, os quais concentram maiores concentrações destes metais [27, 40].

1.4.2.3. Nutrição e actividade decompositora dos cogumelos e acumulação de metais

A nutrição dos fungos baseia-se na libertação de enzimas que decompõem a matéria orgânica. A sua forma de nutrição e as suas associações (saprófitas, parasitas e micorrízicas) são aspectos muito importantes na captação e acumulação de metais pesados nos cogumelos.

Os macromicetes são capazes de produzir uma grande variedade de enzimas degradativas: celulasas, lacases, lignina-peroxidases, manganês-peroxidases e peroxidases. A maior parte destas enzimas pertencem ao grupo das fenoloxidasas, que os fungos utilizam para a decomposição da celulose, lignina, ácido húmico e ácido fúlvico que são os principais constituintes da madeira e matéria orgânica do solo florestal e campestre. Estas substâncias orgânicas são essencialmente polifenóis com uma grande capacidade de fixação dos metais por quelatação ou trocas catiónicas. A decomposição da matéria orgânica favorece a libertação dos metais que se encontram em formas pouco disponíveis [7, 26, 38, 44].

A actividade destas enzimas pode estar comprometida pelos metais pesados. Um estudo realizado por Baldrian *et al.* em 2002 [49] consistiu na avaliação da influência de dois metais pesados, cobre e cádmio, na actividade da enzima lacase da espécie *Pleurotus ostreatus*. Esta enzima é uma cobre-oxidase, que participa na degradação de alguns componentes da madeira. Neste estudo concluiu-se que os metais pesados podem ser moduladores da actividade enzimática, o que pode alterar a biodegradação de alguns compostos. Ao adicionar-se cádmio ao cogumelo, numa fase avançada do seu desenvolvimento, a actividade da enzima em estudo, a lacase, aumentava, mas este aumento não se verificava quando se adicionava este metal numa fase inicial de crescimento. Em solos pouco contaminados por cádmio, a actividade desta enzima era elevada. Também foi verificado que com o aumento de cádmio nos solos, a actividade da lacase e da manganês-peroxidase nas espécies *Stereum hirsutum* e *Phanerochaete chrysosporium*, diminuiu. O mesmo não aconteceu com o cobre,

visto que, com o aumento de cobre também houve um aumento da enzima em estudo. Metais como o chumbo e o mercúrio inibem a actividade desta enzima.

Os fungos saprófitas são os que apresentam uma maior quantidade de enzimas degradativas como as celulasas e o substrato em que vivem contém uma elevada quantidade de vegetais ricos em celulose e lignina, e devido a esta grande capacidade decompositora, normalmente apresentam maiores concentrações de mercúrio, cádmio, cobre e zinco. Os cogumelos micorrízicos, ao contrário dos saprófitas, apresentam uma menor capacidade decompositora. Num estudo efectuado por Alonso *et al.* em 2000 [38] concluiu-se que as espécies saprófitas acumulam maiores concentrações de mercúrio que as micorrízicas devido à sua grande actividade decompositora e à actividade da catalase.

Num estudo realizado por Fisher em 1995 [50] em que se pretendia estudar a bioacumulação de metilmercúrio em cogumelos e a transformação de mercúrio em metilmercúrio, concluiu-se que os cogumelos saprófitas são capazes de metilar o mercúrio e de acumular o produto final, enquanto que os cogumelos micorrízicos, não possuem esta capacidade de metilação e só são capazes de acumular o metilmercúrio através do húmus ou de plantas com as quais têm relações simbióticas. Com este resultado, este estudo demonstra a maior capacidade de concentração de mercúrio orgânico nas espécies saprófitas.

1.4.2.4. Composição química dos cogumelos e acumulação de metais

A composição química dos cogumelos também é um factor muito importante a ter em conta pois pode influenciar a bioacumulação dos metais a dois níveis: 1 - por fixação dos metais à parede celular e 2 – por absorção, transporte e captação dos metais para o interior da célula fúngica. Esta absorção dos metais está dependente da actividade metabólica do fungo e das macromoléculas captadoras de metais existentes nele [17, 44].

A fixação de metais à parede celular pode ser efectuada de dois modos: 1 - captação directa por grupos funcionais componentes da parede celular (fosfato,

carboxilo, amino e diéster) e 2 – por interacções de adsorção inorgânicas físico-químicas [17, 44].

A quitina e o quitosano encontram-se entre os principais fixadores de iões metálicos na parede celular dos cogumelos, juntamente com polímeros fenólicos, melaninas e outros péptidos, hidratos de carbono e ácidos gordos, sendo estes compostos envolvidos na fixação e transporte dos metais [17, 44]

O transporte de elementos essenciais como o cobre e o zinco é feito normalmente através de proteínas transportadoras e sistemas de canalização. Desde o micélio para o carpóforo, os metais podem ser transportados a partir dos doliporos que garantem a passagem de citoplasma entre todas as partes micelares.

A nível celular, a captação dos metais pesados é feita através de compostos implicados na sua fixação como as metalotioneínas, proteínas e polipéptidos ricos em enxofre. As metalotioneínas são polipéptidos de baixo peso molecular que se caracterizam por conterem elevadas quantidades de cisteína e que têm a capacidade de fixar metais em forma de metal-tiolatos. As metalotioneínas intervêm no metabolismo dos metais dada a capacidade que têm de se ligar aos iões metálicos. As metalotioneínas que se encontram nos fungos são essencialmente constituídas por unidades de α -glutamilcisteinilo.

A captação dos metais pesados também pode ser efectuada pelos ácidos orgânicos presentes nos cogumelos, nomeadamente os ácidos cítrico, oxálico e quínico [41]. Estes ácidos possuem uma grande afinidade para os metais pesados, como cádmio e chumbo [42, 43].

Outras proteínas para fixação de metais como as proteínas de tamanho médio presentes na espécie *Laccaria amethystina* foram caracterizadas [40, 48]. Estas proteínas fixam arsénio. Na espécie *Agaricus arvensis* também foram descobertas proteínas fixadoras de cádmio. Também, num estudo de Michelot et al., 1998, foram descritas micofosfatinas, uma fosfoglicoproteína com aminoácidos e fosfoserinas que têm a capacidade de captarem metais [40].

Os metais também podem ser captados por grânulos de polifosfatos. O ião fosfato desloca-se como grânulo que se deposita em vacúolos e que se considera um mecanismo de reserva importante deste ião. Diversos metais como o cádmio, zinco, chumbo e crómio acumulam-se nestes grânulos, nos vacúolos [17].

Os fungos podem transformar as formas metálicas inorgânicas em orgânicas. Esta transformação é importante por exemplo para o mercúrio, pois as suas formas orgânicas como o metilmercúrio são as que apresentam uma maior toxicidade para o Homem.

Os fungos micorrízicos são muito importantes na nutrição das plantas, e devido aos mecanismos de acumulação descritos anteriormente, em muitos casos, estes protegem a planta da contaminação metálica, visto que conseguem diminuir o acesso dos metais às plantas [43].

1.4.2.5. Idade

A bioacumulação dos metais é determinada pela idade dos cogumelos. O desenvolvimento do cogumelo desde o estado juvenil até ao seu estado adulto também pode afectar a presença de metais devido à evolução da composição proteica durante o crescimento [26].

De acordo com uma revisão feita por Kalac e Svoboda, 2000 [27] em cogumelos mais jovens foi encontrada uma maior concentração de metais. Isto é explicado pelo facto do transporte do micélio para o cogumelo ser efectuado desde o início da frutificação. Durante o crescimento do cogumelo, a massa aumenta, e a concentração do metal diminui por diluição.

1.4.2.6. Tamanho do cogumelo

O tamanho do cogumelo é característico de cada espécie, podendo variar com a idade. Um cogumelo que ocupe uma superfície maior pode ter uma maior contaminação metálica por deposição atmosférica [17, 27].

1.4.2.7. Constituintes do cogumelo

A contaminação metálica dos cogumelos pode verificar-se de um modo desigual no cogumelo visto que as concentrações de metais podem variar nas diferentes partes do cogumelo. Normalmente o himenófero possui as maiores quantidades dos metais [27-39]. Para o mercúrio são encontradas concentrações superiores no chapéu do que no pé. Isto é devido ao facto de que no chapéu se encontra uma maior concentração de proteínas com grupo sulfidrilo com alta afinidade para o metal [26, 50].

Em regra, o chumbo, devido às suas baixas concentrações acumuladas nos cogumelos, distribui-se de modo igual por todo o fungo [40, 44].

1.5. METAIS TÓXICOS

A capacidade dos cogumelos acumularem metais tóxicos pode ter consequências toxicológicas e ambientais. Os cogumelos com grandes concentrações de metais pesados podem ser a causa de algumas intoxicações. A ingestão continuada por humanos destes cogumelos pode provocar essencialmente efeitos crónicos como a nefrotoxicidade devido à acumulação dos metais [7, 27, 40].

Considera-se metal tóxico todo aquele que pertence a um grupo de elementos que não possui características benéficas nem essenciais para o organismo vivo, produzindo efeitos danosos para as funções metabólicas normais, mesmo quando presentes em quantidades vestigiais [51-53].

Os metais essenciais são necessários ao funcionamento do organismo, mas quando ingeridos em doses superiores às nutricionalmente desejáveis podem provocar efeitos tóxicos.

Por vezes concentrações elevadas de metais no solo podem ser tóxicas para bactérias, fungos e plantas [42]. No caso das plantas, alguns dos metais susceptíveis de causar problemas de toxicidade podem ser metais pesados como o cádmio ou essenciais como o zinco e cobre, reduzindo a sua produtividade ou provocando a sua morte [54]. Estes organismos captam a maior parte destes elementos tóxicos do solo e da água. A contaminação metálica do solo resulta essencialmente dos resíduos industriais, sendo também importante a constituição geológica do local. A contaminação aquática pode ser proveniente da atmosfera, minas e fundição e pela extracção de lamas activas [55].

Os metais pesados podem estar presentes no solo sob várias formas, tais como iões metálicos livres, complexos metálicos solúveis, iões metálicos ligados a matéria orgânica, precipitados ou insolúveis como óxidos, carbonatos e hidróxidos e podem também estar ligados a estruturas minerais de sílica. A toxicidade destes elementos no solo depende da sua biodisponibilidade, sendo esta definida como a sua capacidade de serem transferidos do solo para organismos vivos. Esta

biodisponibilidade é em função da sua concentração no solo, de factores físico-químicos, nomeadamente pH deste e também da quantidade em matéria orgânica, a capacidade de adsorção, bioacumulação e solubilidade do metal [42] e características morfológicas e minerais dos solos [56]. A mobilidade dos metais pesados diminui com o aumento do pH. De facto, a subida de pH tem como consequência o aumento do número de cargas negativas presentes no solo que tem grande afinidade para os metais pesados como o cádmio [57].

A concentração dos metais nos vegetais, nomeadamente nos cogumelos, é função das condições ambientais onde crescem, como a sua interacção com o solo, a espécie a que pertence e o tipo de alimentação (micorrízico ou saprófita) e também é em função do seu processamento e das condições de armazenamento.

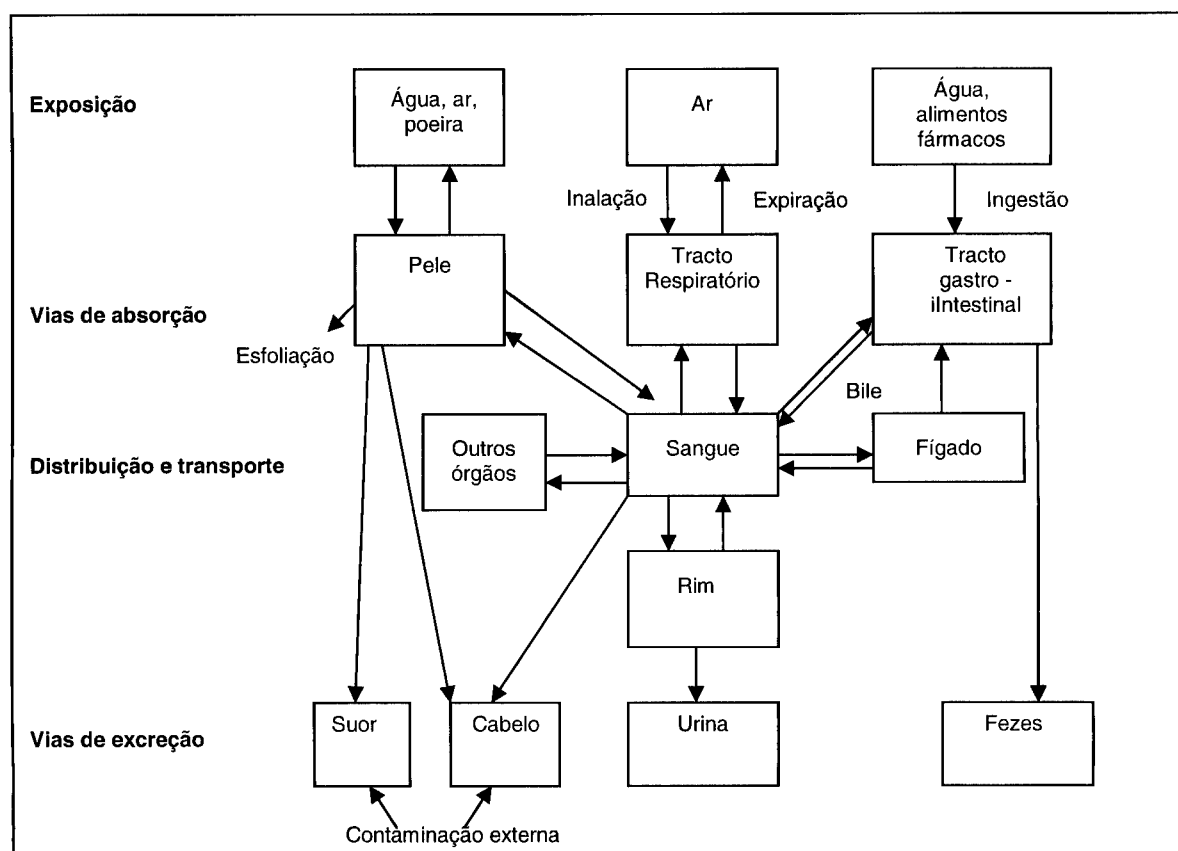


Figura 5 – Disposição dos metais pesados no organismo (adaptado de Goyer e Clarkson, 2000) [53].

No organismo a maioria dos metais é proveniente da dieta. Quando um metal é ingerido nos alimentos, as quantidades absorvidas e retidas dependem das características físico-químicas, da composição dos alimentos, estado nutricional e factores genéticos [52]. A relação entre a exposição, vias de absorção no organismo, transporte e distribuição dos metais para os vários sistemas está representada na figura 5.

Os mecanismos comuns de toxicidade relacionados com os metais baseiam-se na interacção destes com proteínas, nomeadamente enzimas, podendo resultar a inibição ou a activação das mesmas. A inibição pode ocorrer devido à interacção entre o metal e o grupo sulfidrilo (SH) das enzimas ou pela substituição do co-factor metálico pelo metal tóxico. Os metais podem ainda ser carcinogénicos e alterar a função de vários sistemas como o renal, nervoso, reprodutor e respiratório [51]. O cádmio, crómio, chumbo e mercúrio são responsáveis pelo aparecimento de problemas renais e o metilmercúrio pode causar danos neurológicos [40].

Devido ao facto dos cogumelos serem capazes de transformar o mercúrio inorgânico em metilmercúrio e de ser bioacumulado em cogumelos, o metilmercúrio pode entrar na cadeia alimentar e ser muito perigoso para os humanos, dada a sua lipofilia. Por esta razão, a análise do mercúrio em cogumelos comestíveis é muito importante e tem sido extensivamente analisado. [26, 44, 50, 58].

Após ingestão de doses elevadas de metais pesados, o tratamento de uma intoxicação por metais consiste na administração de quelantes como DMSA (ácido dimercaptossuccínico), EDTA – cálcio (ácido etilenodiaminatetracético) e BAL (British Anti-Lewisite) com o objectivo de remover os metais tóxicos do organismo.

1.5.1. CÁDMIO

1.5.1.1. Considerações gerais

O cádmio é um elemento de símbolo Cd, de número atómico 48 e de massa atómica de 112,4. Está situado no grupo 12 (II B) na Tabela Periódica. É um metal relativamente pouco abundante, sendo um elemento escasso na crosta terrestre. As suas reservas são difíceis de serem encontradas e existem em pequenas quantidades. O cádmio não se encontra na natureza no seu estado puro, existindo principalmente em associação com o chumbo e o zinco. A contaminação dos solos resulta essencialmente da exploração mineira e de actividades industriais várias.

1.5.1.2. Exposição ao cádmio

O cádmio pode ter imensas utilizações. Pode ser utilizado em alguns pigmentos de tintas, por exemplo, o sulfato de cádmio é empregado como pigmento amarelo. Alguns compostos de cádmio são usados como estabilizantes de plásticos como, por exemplo, no PVC, também no fabrico de pilhas e baterias, especialmente nas baterias de níquel-cádmio e em indústrias que utilizam a electrodeposição. A galvanoplastia é uma actividade que usa grandes quantidades de cádmio.

Pequenas quantidades de cádmio são encontradas naturalmente no ar, na água, no solo e nos alimentos [59]. A contaminação ambiental é feita essencialmente por fundições e pela indústria em geral, sendo a fonte mais importante de descarga do cádmio para o meio ambiente a queima de combustíveis fósseis (como carvão e petróleo) e pela incineração de lixo doméstico. Este metal está também presente em alguns fertilizantes, como os adubos fosfatados [54].

Para a maioria das pessoas, os alimentos constituem a principal fonte de exposição ao cádmio porque muitos alimentos tendem a absorvê-lo e retê-lo. As principais fontes de cádmio na alimentação são os cereais e leguminosas [59]. As plantas absorvem este elemento principalmente do solo e da água. Os vegetais retiram o cádmio do solo mais eficazmente que o chumbo, como é o caso do arroz e da planta do tabaco [51-53]. A aplicação de certos fertilizantes ou de excrementos de animais no solo destinado ao cultivo de alimentos pode aumentar o nível de cádmio que, por sua vez, causa um aumento no nível deste elemento nos produtos cultivados. Esta absorção por parte das plantas depende da sua disponibilidade no solo que por sua vez está relacionado com o pH do mesmo, visto que este metal se encontra mais disponível em solos ácidos e com pouca matéria orgânica [60]. Este metal pode ser consideravelmente móvel no solo, ao contrário de outros metais como o chumbo e o crómio [54].

Os cogumelos que crescem perto de fundições de chumbo, mercúrio e de cobre contêm níveis elevados de cádmio. Em cogumelos foram encontradas concentrações de cádmio que variam entre 0,5 a 50 mg/kg de matéria seca, dependendo do nível de contaminação da área de colheita, sendo o género *Agaricus* o que acumula este metal em maiores concentrações [27]. No cogumelo *Agaricus macrosporus* foi isolada uma fosfoglicoproteína que fixa o cádmio, a cádmio-micofosfatina, em cuja constituição está presente enxofre, aminoácidos, glucose e galactose [27].

O teor máximo de cádmio permitido em cogumelos de cultura, segundo a legislação europeia é de 0,20 mg/ Kg de peso fresco [61].

1.5.1.3. Toxicocinética

A exposição ao cádmio nos humanos ocorre geralmente através de duas fontes principais: a primeira é por via oral (por ingestão de água e de alimentos contaminados), e a segunda por inalação. Os fumadores são os mais expostos ao cádmio porque o tabaco pode conter este elemento. Também pode ser absorvido em quantidades menores por via dérmica.

Apenas uma pequena percentagem (5 a 8%) do cádmio ingerido é absorvido no tracto gastrointestinal. A sua velocidade de absorção pode aumentar devido a vários factores, como o baixo consumo de vitamina D, cálcio, zinco e cobre [59]. Um consumo elevado de fibras também pode aumentar a quantidade de cádmio no organismo. Baixas concentrações de ferro no sangue estimulam a expressão de DCT-1, um transportador de iões metálicos, para o qual o cádmio também tem afinidade. Ao ligar-se a este transportador, uma maior quantidade de cádmio é absorvida [62]. Numa alimentação pobre em cálcio existe um aumento da síntese de proteínas que têm grande afinidade para o cálcio, mas a estas proteínas também se liga o cádmio [53].

A absorção de cádmio por inalação (15 a 30%) é superior à obtida pelo tracto gastrointestinal. O cádmio inalado é absorvido para a circulação sanguínea através da formação de complexos de cisteína [62].

Pelo sistema dérmico, os iões livres de cádmio ligam-se a radicais sulfidrilo da cisteína das queratinas da epiderme ou por complexação com metalotioneínas [62].

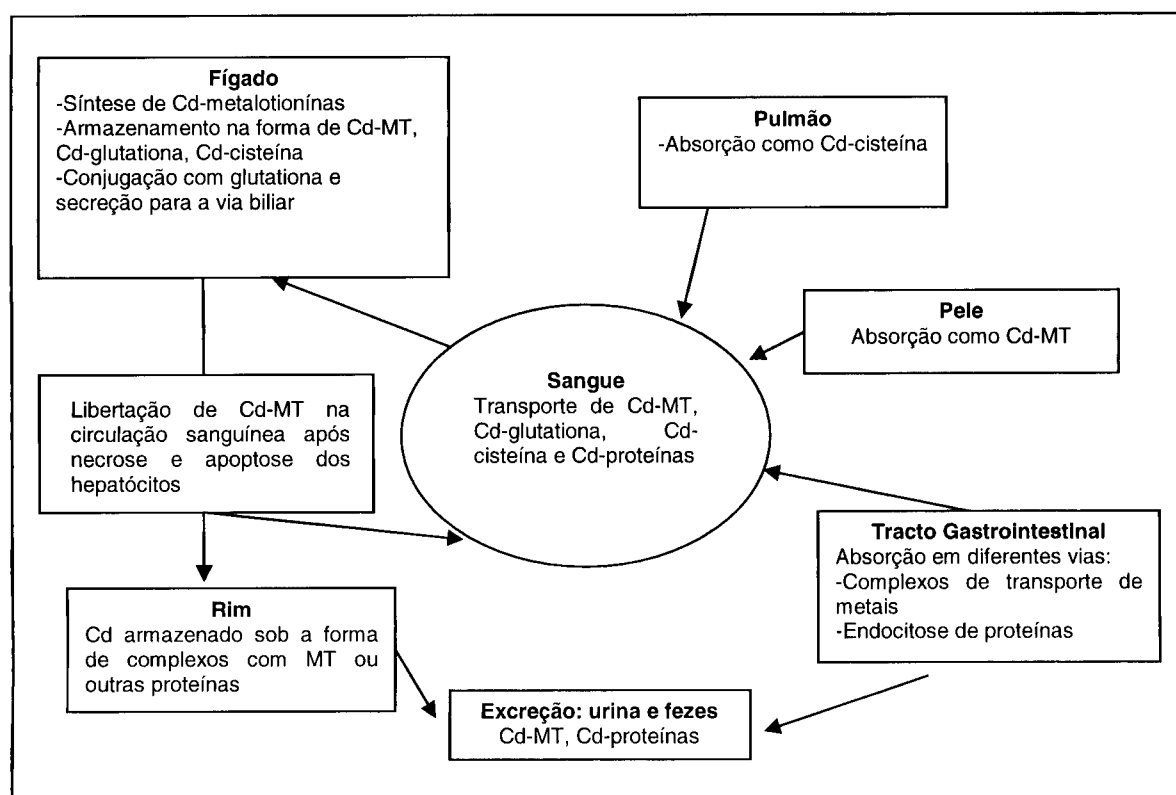


Figura 6 – Metabolismo e distribuição de cádmio no organismo humano (adaptado de Godt., et al, 2006) [62].

Depois de absorvido, o cádmio é transportado no sangue ligado aos eritrócitos e às proteínas de elevado peso molecular como a albumina. Distribui-se inicialmente no fígado e nos rins. Na corrente circulatória liga-se a proteínas, nomeadamente a metaloproteínas produzidas no fígado. Após a filtração glomerular nos rins, esta associação de metal com proteína é reabsorvida eficazmente nas células do túbulo proximal, armazenando-se em lisossomas.

Após a necrose dos hepatócitos e apoptose, o complexo Cd-metalotioneínas (Cd-MT) entra no sangue sinusoidal, onde entra no ciclo entero-hepático, via secreção no tracto biliar, na forma de Cd-glutathione. Enzimaticamente, a ligação Cd-cisteína é degradada na via biliar e o cádmio reentra a nível intestinal [62].

A excreção de cádmio é feita na urina e nas fezes. O metabolismo e distribuição do cádmio estão esquematizados na figura 6.

1.5.1.4. Toxicidade do cádmio

O cádmio é um metal pesado que produz efeitos tóxicos nos organismos vivos, mesmo em concentrações muito pequenas. Podendo ser tóxico a nível hepático, renal, pulmonar, cardiovascular, hematopoiético e reprodutivo [63, 64].

Uma intoxicação aguda por ingestão deste metal pode provocar náuseas, vómitos e dor abdominal e uma intoxicação por inalação pode causar pneumocite e edema pulmonar.

Os efeitos crónicos são preocupantes visto que a sua excreção é lenta, com um tempo de semi-vida de 30 anos no homem. O órgão alvo da toxicidade do cádmio é o rim, sendo os túbulos proximais o local inicial de acção. O Cádmio atinge o rim na forma de Cd-metalotioneínas onde é filtrado no glomérulo e reabsorvido nos túbulos proximais. A degradação do complexo Cd-MT leva à libertação de cádmio que inibe a função lisossomal, resultando na inviabilidade celular [53].

O primeiro sinal da lesão renal é o aumento da excreção de proteínas de baixo peso molecular como β 2-microglobulina e de α 2-microglobulina e da enzima

N-acetil- β -D-glucosamidase (NAG). A intoxicação pode manifestar-se por proteinúria, cálculos renais, danos tubulares e glomerulares e em casos mais extremos cancro renal. O aumento de cálculos renais pode estar possivelmente relacionado com o aumento de excreção de cálcio [60].

A função respiratória, por uma intoxicação crónica devido a uma exposição pulmonar de cádmio, pode ficar comprometida devido a edemas pulmonares, destruição das membranas da mucosa, pneumocites e em alguns casos cancro.

Aos efeitos nefastos do cádmio também podem associar-se problemas ósseos devido à fraca mineralização nos ossos com elevada frequência de fracturas, aumento de osteoporose e dor e está associado à doença Itai-itai [62]. Esta perturbação foi reconhecida em mulheres na fase pós-menopausa, residentes na zona Fuchu, Japão, durante a segunda guerra mundial. Esta doença consiste na presença de deformações ósseas e deficiência renal crónica. O problema ósseo está possivelmente associado à diminuição da síntese de vitamina D e ao distúrbio do metabolismo da hormona da paratiróide.

Alguns efeitos cardiovasculares e hipertensão são atribuídos ao cádmio. Estudos epidemiológicos sugerem um aumento da pressão sistólica e não diastólica. Ratos expostos a níveis elevados de cádmio desenvolveram alterações no miocárdio [53]. Este efeito pode estar relacionado com a diminuição de fosfato na forma de energia neste músculo, redução da contractibilidade do miocárdio e diminuição da excitabilidade do sistema cardíaco [53].

1.5.2. CHUMBO

1.5.2.1. Considerações gerais

O chumbo é um elemento com o símbolo Pb, número atómico 82, com massa atómica 207,2, pertencente ao grupo 14 da classificação periódica dos elementos químicos. Este metal encontra-se em grande quantidade na crosta terrestre. Aparece no ambiente maioritariamente sob a forma de sulfuretos e o estado de oxidação mais comum é o +2 com capacidade de ligar-se a proteínas com grupos sulfidrilo [65].

1.5.2.2. Exposição ao chumbo

A exposição ao chumbo pode acontecer através do ar, água e alimentos. Nestes casos, a contaminação dos alimentos pelo chumbo pode resultar da constituição intrínseca dos mesmos ou da constituição secundária resultante, por exemplo do contacto com recipientes de cerâmica para conter ou preparar alimentos. Este metal tem imensas utilidades, sendo usado na construção civil, baterias de ácido, em munições, ligas metálicas para a produção de soldas, fusíveis, revestimentos de cabos eléctricos, materiais antifricção e metais de tipografia. Também pode ser útil nas pinturas de transportes náuticos visto que inibe a incrustação nos cascos de bactérias e fungos marinhos. Devido à sua excelente resistência à corrosão, existem muitas aplicações para este elemento na indústria de construção e, principalmente, na indústria química.

Durante muito tempo se tem empregado o chumbo como protector para os aparelhos de raio X. Em virtude das aplicações cada vez mais intensas da energia atómica, torna-se cada vez mais importante a aplicação do chumbo como blindagem contra a radiação.

O uso de chumbo em pigmentos tem sido muito importante, porém a sua utilização tem vindo a diminuir. O pigmento, que contém este elemento, é o branco de chumbo, $2\text{PbCO}_3 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2$; outros pigmentos importantes são o sulfato básico de chumbo e os cromatos de chumbo.

Compostos orgânicos de chumbo, como o tetraetilo de chumbo foi utilizado como aditivo de combustíveis, nomeadamente na gasolina.

Uma grande percentagem da contaminação do ar é proveniente do petróleo. O chumbo inorgânico é proveniente de minas e fundições.

O chumbo presente no solo, apesar de pouco disponível em função da sua baixa hidrossolubilidade, pode ser transferido para os vegetais cultivados. O chumbo presente no solo não é facilmente translocado para a parte aérea das plantas. A absorção deste metal pode ser aumentada pelo aumento da acidez do solo e diminuição da quantidade de húmus [51-53].

Os cogumelos têm baixa capacidade de acumular chumbo. As espécies *Lycoperdon perlatum*, *Chlorophyllum rachodes* (*Macrolepiota rachodes*) e *Lepista nuda* que crescem perto de fundições de chumbo, minas e auto-estradas são as que acumulam o chumbo em maiores quantidades [27]. Em diferentes estudos realizados em cogumelos [27], os valores encontrados de chumbo variam entre 0,5 a 20 mg/kg de matéria seca. Segundo a legislação europeia, o teor máximo de chumbo permitido nos cogumelos de cultivo é de 0,20 mg/ Kg de peso fresco [61].

1.5.2.3. Toxicocinética

O chumbo inorgânico pode ser absorvido através do tracto gastrointestinal, sistema respiratório e pele. Aproximadamente 50% de chumbo inalado é absorvido nos pulmões, dependendo do tamanho das partículas. Erros nutricionais como a ingestão deficiente de cálcio e de ferro, favorecem a absorção do chumbo porque a cinética de absorção do chumbo é semelhante à do cálcio. O chumbo inorgânico é mais rapidamente absorvido no tracto gastrointestinal das crianças do que nos adultos, numa extensão de 50% nas crianças, sendo nos adultos cerca de 5-10%.

Uma vez na corrente circulatória, o chumbo pode ser distribuído de várias maneiras, uma parte pode estar associado a membranas dos eritrócitos e a outra associada à hemoglobina e outros componentes das células. O chumbo é distribuído no sangue, fígado e rins. Este metal atravessa facilmente a barreira placentária e nas crianças penetra facilmente a barreira hemato-encefálica. O chumbo orgânico, tetrametilo de chumbo, consegue atravessar a pele e também a barreira hemato-encefálica. O primeiro alvo no cérebro são as células endoteliais da barreira hemato-encefálica. Devido às suas semelhanças com o cálcio, o chumbo modifica o “uptake” do cálcio, substituindo-o nas bombas ATP cálcio-sódio. Também bloqueia a entrada de cálcio nas mitocôndrias cerebrais, ocorrendo deste modo um decréscimo da produção de energia. Os compostos orgânicos de chumbo têm uma afinidade especial para o tecido nervoso. Cerca de 50% do chumbo orgânico como o tetraetilo de chumbo é metabolizado principalmente no fígado, sendo catalizado pelo citocromo P450, dependente do sistema monooxigenase [65]. O tetraetilo de chumbo é metabolizado a trimetilo de chumbo e um dos metabolitos deste último é o chumbo inorgânico.

Parte do chumbo absorvido pode ser excretado pela urina, por via renal, por filtração glomerular e pode ocorrer absorção tubular renal, e em menor quantidade pode ser excretado na bile e suor. Pode ainda ser armazenado nos pêlos, dentes e unhas. Após uma longa exposição ao chumbo ele deposita-se sobretudo nos tecidos ósseos onde é lentamente libertado e o seu tempo de semi vida pode ser de 20 a 30 anos, enquanto no sangue é somente de 1 mês. A fracção não absorvida é eliminada pelas fezes [53, 66].

1.5.2.4. Toxicidade do chumbo

Tanto na forma elementar, como na forma de compostos orgânicos ou inorgânicos, o chumbo provoca intoxicação nos organismos que a ele se expõem.

No homem, as exposições não-ocupacionais estão geralmente restritas às que ocorrem através da dieta, representando este a principal fonte de absorção diária de compostos inorgânicos para a população em geral, apesar de serem pouco relatados os casos de intoxicações através deste tipo de exposição [53].

Os sintomas de intoxicação aguda pelos compostos orgânicos de chumbo são cefaleias, irritabilidade, dor abdominal, fraqueza muscular, e alguns sintomas relacionados com o sistema nervoso. A intoxicação rapidamente progride para efeitos mais graves, como convulsões, coma e em alguns casos, morte.

O chumbo inorgânico exerce dois tipos de efeitos nefrotóxicos: lesão tubular e nefropatia. O túbulo contornado proximal pode ser lesado produzindo aminoacidúria, glicosúria e fosfatúria. As lesões podem progredir para insuficiência renal.

Os principais alvos da acção do chumbo são o sistema hematopoiético e o sistema nervoso. Várias enzimas envolvidas na síntese do grupo heme são inibidas por este metal. As principais enzimas inibidas são a ALAD (ácido δ -aminolevulínico desidratase), coproporfirinogénio oxidase, ferroquelatase e a heme sintetase. Uma intoxicação pelo chumbo pode provocar anemia, em que os eritrócitos são microcíticos e hipocrómicos. Este sintoma é causa de uma síntese insuficiente do grupo heme e um tempo de vida dos eritrócitos diminuído. A presença na urina de ALA (ácido δ -aminolevulínico) pode ser um indicador da exposição ao chumbo.

O sistema nervoso também é um alvo importante em crianças cuja barreira hemato-encefálica não se encontra bem desenvolvida. Nas crianças o chumbo inorgânico consegue ultrapassar a barreira hemato-encefálica, podendo causar problemas neurológicos. A baixos níveis de exposição de chumbo as crianças podem apresentar uma certa hiperactividade, deficiência de aprendizagem, dificuldades na leitura, diminuição da atenção, deficiências mentais, retardamento no crescimento e visão alterada. Em doses elevadas podem ocorrer encefalopatias em crianças e adultos. O chumbo também pode danificar arteríolas e capilares, resultando num edema cerebral e degeneração neuronal. Clinicamente estes sintomas manifestam-se por ataxia, coma e convulsões [53].

Este metal também pode afectar o sistema reprodutor masculino e feminino. O chumbo está associado a esterilidade, disfunção testicular, diminuição de testosterona e morte neonatal [67].

1.5.3. CRÓMIO

1.5.3.1. Considerações gerais

O crômio é um elemento com o símbolo Cr, número atômico 24 e de massa atômica de 52. É um metal encontrado no grupo 6 (6B) na Tabela periódica. O crômio é um elemento abundante na crosta terrestre. As formas mais representativas deste metal são a trivalente [Cr(III)] e hexavalente [Cr(VI)], seu estado de oxidação máximo. Os estados de oxidação +4 e +5 são pouco frequentes. Enquanto que a forma trivalente é a mais comum no ambiente, as formas hexavalentes provêm essencialmente da contaminação industrial [53].

1.5.3.2. Exposição ao crômio

A contaminação dos solos com este elemento pode ser de origem natural, em solos derivados de rochas ultrabásicas, como as serpentinas [54].

Os níveis deste elemento são aumentados no ambiente pela exploração de minas, fundições e usos industriais [68]. Este elemento é utilizado para o fabrico de aço e de pigmentos [51]. O crômio é usado em metalurgia para aumentar a resistência à corrosão e dar um acabamento brilhante às ligas metálicas. É também usado em processos de cromagem que consiste na deposição sobre uma dada peça, uma capa protetora de crômio através da eletrodeposição. Os cromatos e óxidos são usados em corantes e pinturas, como o dicromato de sódio [69]. O mineral cromita ($\text{Cr}_2\text{O}_3\text{FeO}$) é utilizado em moldes para o fabrico de ladrilhos, geralmente materiais refractários. Entretanto, uma grande parte de cromita é usada para obter o crômio ou em ligas metálicas.

O crômio tem a capacidade de precipitar e de depositar-se na água e no solo. Este elemento possui baixa mobilidade no solo, sendo raramente

translocado para a parte aérea das plantas, acumulando-se nas raízes. Os cromatos (CrO_4^{2-}), bicromatos (HCrO_4^-) e dicromatos ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) são fracamente adsorvidos pelo solo a pH alcalino ou pouco ácido, tendo estes grande mobilidade na superfície dos solos, estando rapidamente disponíveis para a absorção pelas plantas. O Cr(III) é menos móvel e precipita rapidamente sob a forma de $\text{Cr}(\text{OH})_3$ ou $\text{Fe}_x\text{Cr}_{1-x}(\text{OH})_3$ em solos alcalinos [47, 70]. As reacções que podem ocorrer o crómio no solo são hidrólises, oxidações, reduções e precipitações [70]. O Cr(VI) no ambiente pode ser reduzido a Cr(III), sendo esta reacção induzida por agentes inorgânicos, orgânicos e microbianos. Na redução do Cr(VI), a matéria orgânica é dadora de electrões e os microrganismos potenciam a redução do crómio, embora, em solos fortemente contaminados com Cr(VI), a actividade enzimática destes seres diminui, diminuindo assim a reacção [71, 72]. A solubilidade do Cr(III) e mobilidade no solo pode ser aumentada, quando este elemento forma complexos com ácidos orgânicos, exsudados pelas raízes, e que reagem fortemente com os iões metálicos [71, 72].

Em certas condições, o Cr(III) pode ser oxidado a Cr(VI), sendo esta oxidação provocada pelo oxigénio ou o dióxido de magnésio. Apesar de rara, esta reacção ocorre mais frequentemente em solos alcalinos. A oxidação do crómio não ocorre em solos reductores e que tenham fortes condições anaeróbias [73].

A quantidade de crómio nos alimentos é baixa e estima-se que diariamente se ingira 100 μg deste elemento através da dieta humana [45]. A quantidade presente nos cogumelos pode variar entre 0,1 e 2 mg /Kg de matéria seca e as espécies que são bioindicadoras de poluição são *Agaricus spp.*, *Macrolepiota procera* e *Lactarius deliciosus* [27]. Ainda não foi estabelecido um limite de teor máximo para o Cr(VI) em cogumelos, mas na água este limite é de 0,05 mg/L.

1.5.3.3. Toxicocinética

As principais vias de exposição humana ao crómio são a via pulmonar, por inalação de partículas na indústria metalúrgica, e a via cutânea na indústria química. A via gastro-intestinal está associada ao consumo alimentar habitual,

geralmente com níveis vestigiários de crómio, e a situações acidentais, principalmente por contaminação dos alimentos. Nos alimentos, o crómio encontra-se essencialmente na forma de Cr(III). O crómio presente nos alimentos é mal absorvido pela mucosa gastro-intestinal, numa extensão de cerca de 2%.

O Cr(III) é um nutriente essencial, sendo um co-factor da insulina, tem-se observado que alguns dos seus complexos parecem participar na potencialização da acção da insulina, sendo por isso, denominado de "factor de tolerância à glicose". A deficiência de crómio provoca uma intolerância à glicose, e como consequência o aparecimento de diversos distúrbios. O Cr(III) forma complexos com os receptores da insulina, facilitando a ligação desta hormona com os seus receptores e por sua vez a entrada na célula.

O transporte plasmático do crómio no sangue é realizado principalmente pela transferrina e pela albumina.

A excreção de crómio ocorre na maior parte por via urinária.

1.5.3.4. Toxicidade do crómio

O contacto com o Cr(VI) pode causar úlceras e perfusões no septo nasal e hipersensibilidade cutânea [74]. Uma exposição ocasional também pode causar asma.

Associa-se o crómio, essencialmente pela exposição a cromatos, ao cancro no tracto respiratório [68, 69, 75]. Esta toxicidade de Cr(VI) está relacionada com a rápida absorção a nível celular e à sua redução a Cr(III). Os cromatos conseguem entrar a nível celular através de canais para transferência de aniões isoelectrónicos, como para os sulfatos e fosfatos e os cromatos insolúveis são absorvidos para a célula por fagocitose. A redução intracelular do Cr(VI) envolve a oxidação de pequenas moléculas como a glutatona e macromoléculas como o DNA [76, 77]. O Cr(III) consegue formar complexos com moléculas intracelulares. Os complexos formados podem induzir alterações na expressão genética e

mutações, das quais podem resultar lesões no DNA e inibição da síntese proteica [53], consequentemente no aparecimento de cancros.

O Cr(VI) ingerido é nefrotóxico, tanto a nível tubular como glomerular.

1.5.4. NÍQUEL

1.5.4.1. Considerações gerais

O níquel é um elemento de símbolo Ni, de número atómico 28 e de massa atómica 58,7. É um elemento de transição situado no grupo 10 (8 B) da Tabela Periódica. É resistente à corrosão, e só pode ser utilizado como revestimento por eletrodeposição. O seu estado de oxidação mais comum é +2, podendo apresentar outros nomeadamente 0, +1 e +3.

1.5.4.2. Exposição ao níquel

O níquel é um metal ubíquo no ambiente, existindo em grandes quantidades em solos serpentínicos [54]. Este metal provém de contaminação industrial, e surge principalmente nas formas de sulfitos, óxidos e de silicatos. O níquel pode estar presente em diferentes utensílios domésticos, como os de cozinha e em jóias [53]. O metal e algumas das suas ligas metálicas são utilizados para manusear o flúor e alguns fluoretos porque reage com dificuldade com estas substâncias. O níquel é usado no fabrico de aço inoxidável, na produção de ligas metálicas, baterias recarregáveis, reacções de catálise, cunhagens de moedas, revestimentos metálicos e fundição. As ligas níquel-cobre são muito resistentes à corrosão, utilizando-se em motores de transportes marítimos e na indústria química.

O níquel foi doseado em diferentes espécies de cogumelos e os valores encontrados situavam-se entre 0,4 a 2 mg/kg de matéria seca. Os cogumelos que podem ser considerados bioindicadores deste metal são *Laccaria amethystina* e *Leccinum spp* [27].

A Environmental Protection Agency (EPA), estima que em média um adulto consome 100 a 300 µg de níquel diariamente [53].

1.5.4.3. Toxicocinética

A exposição humana ao níquel ocorre por inalação, ingestão e contacto dérmico. A quantidade de níquel inalado depende largamente do tamanho das partículas e da concentração deste metal. Do níquel inalado, 35% é absorvido para o sangue, onde se liga com metaloproteínas, as niqueloplasminas. Também forma complexos com vários compostos, como a cisteína, histidina e ácido aspártico. O tempo de semi-vida do níquel inalado é de 1 a 3 dias no caso do sulfato de níquel, 5 dias para o subsulfido de níquel e 100 dias para o óxido de níquel. A capacidade do níquel penetrar pela epiderme e ser absorvido depende da espécie química. Por exemplo, os cloretos de níquel têm uma melhor capacidade de penetrar na pele que o sulfato de níquel. Só uma pequena parte do Ni ingerida é absorvida e esta é dependente do sal ingerido.

Após entrar na circulação sanguínea, é rapidamente distribuído pelos rins, pituitária, pulmões, pele, ovários e glândulas adrenais. Este metal é eliminado pelo rim e numa intoxicação provocada pelo níquel, provoca uma maior excreção de β 2-microglobulina na urina.

1.5.4.4. Toxicidade do níquel

O níquel metálico combina-se com o monóxido de carbono para formar o carbonilo de níquel $[\text{Ni}(\text{CO})_4]$, que é extremamente tóxico. Uma intoxicação com este composto pode provocar cefaleias, náuseas, vômitos, dor epigástrica e peitoral. Segue-se hiperpneia, cianose e astenia. Os sintomas podem ser acompanhados por febre e leucocitose e em casos mais graves, pneumonia, falha respiratória, edema cerebral e morte [53].

A toxicidade dérmica que ocorre devido ao contacto do níquel manifesta-se essencialmente em eczemas e dermatites de contacto. Esta sintomatologia é

consequência da sensibilização por contacto na epiderme com matérias em que este metal se encontra na sua composição, como moedas e peças de joalharia.

O níquel pode ser carcinogénico do tracto respiratório, tanto a nível pulmonar como nasal. Embora não esteja devidamente demonstrada a sua carcinogenicidade, pensa-se que o subsulfureto de níquel (Ni_3S_2) pode ser carcinogénico [78-80]. Estudos da toxicidade do níquel revelam que este metal é predominantemente genotóxico e não mutagénico, e também demonstram que os compostos carcinogénicos de níquel danificam a heterocromatina e consequentemente a condensação da cromatina do DNA [81, 82] e também metilação do DNA [76, 77].

1.6. ANÁLISE DE METAIS

Existem na literatura diversos trabalhos referentes ao doseamento de metais pesados em cogumelos, utilizando diferentes técnicas, como a EAA/AE, a voltametria e o ICP (espectrometria de emissão por plasma).

Na voltametria são usados vários métodos de detecção, mas na análise dos metais pesados são usadas a voltametria de redissolução aniónica e a catiónica. As técnicas de dissolução têm um limite de detecção baixo, pois existe uma fase de pré-concentração. Basicamente esta análise é efectuada em dois passos. No primeiro passo, o analito em análise é depositado electronicamente numa superfície do eléctrodo, formando um filme muito fino. Depois desta fase, segue-se uma electrólise reversa, em que o analito é libertado da superfície do eléctrodo e quantificado [83].

O ICP é uma técnica muito recente utilizada para o doseamento dos metais. Na espectrofotometria de emissão atómica, uma pequena parte da amostra é atomizada e excitada para provocar a emissão. No ICP acoplado à espectrofotometria de emissão atómica (ICP – AES) a energia requerida para este processo de excitação dos átomos pode ser provocada por um plasma composto por um gás inerte. Normalmente o plasma é um meio muito energético e praticamente inerte [83-86]. A amostra que geralmente está sob a forma de uma solução é introduzida no plasma. Os átomos aí produzidos e excitados emitem luz com comprimentos de onda característicos para cada elemento. A intensidade de emissão é medida a um dado comprimento de onda, e esta intensidade serve de sinal analítico para a identificação e determinação quantitativa dos elementos da solução. O ICP também pode estar acoplado a um espectrómetro de massa (ICP – MS) o que permite a determinação da composição de isótopos [83-86].

A EAA/AE é, no entanto, a técnica mais vulgarmente usada no doseamento de metais em subníveis e também a adoptada neste trabalho para o doseamento de cádmio, chumbo, crómio total e níquel.

1.6.1. Espectrofotometria de absorção atómica com atomização electrotérmica

A espectrofotometria de absorção atómica é uma técnica muito utilizada para a análise de metais pesados, como cádmio, cobre, crómio, níquel e chumbo. Esta técnica é um método instrumental de análise vocacionado para efectuar medidas de espécies presentes nas amostras em quantidades muito pequenas. As medidas da EAA baseiam-se na absorção da radiação electromagnética por átomos de um determinado elemento num conjunto limitado e definido de comprimentos de onda [83-86].

A absorção de energia pelos átomos constitui uma potente técnica analítica, tanto quantitativa como qualitativa. Nesta técnica a absorvância é medida e relacionada com a concentração do analito segundo a lei de Lambert – Beer.

A espectrofotometria de absorção atómica tem várias vantagens dado que é uma técnica muito sensível, analisa pequenas quantidades de amostras líquidas e o sinal não é afectado pelo ruído da câmara. A sensibilidade desta técnica deve-se ao facto de que a produção de átomos livres a analisar é mais eficiente do que quando se utiliza só a espectrofotometria de absorção atómica com chama [83].

1.6.1.1. Instrumentação

Os passos analíticos da espectrofotometria de absorção atómica (figura 7) são essencialmente as seguintes: colocar a amostra na câmara, induzir a transmissão de espectros necessários para a determinação dos analitos, isolar as linhas espectrais requeridas para análise, detectar o aumento ou diminuição da radiação e por fim registar os resultados. A instrumentação utilizada é a típica da espectrofotometria com chama onde se dispõe de um dispositivo de atomização electrotérmica que inclui a câmara de atomização (câmara de grafite) e um sistema regulador da temperatura no interior da câmara [83].

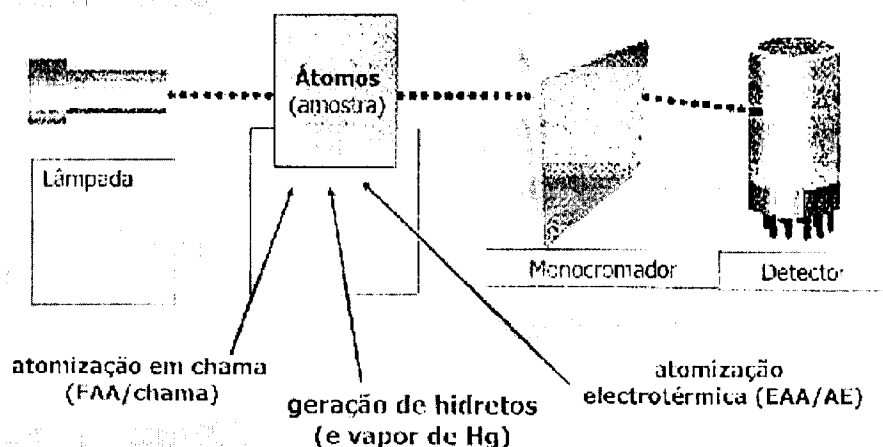


Figura 7 – Esquema de fundamento da espectrofotometria de absorção atômica.

Para existir a transmissão dos espectros é necessário uma fonte de radiação. Esta fonte pode ser uma lâmpada de descarga de vapor, descarga sem eléctrodo ou lâmpada de cátodo oco, sendo estas últimas as mais utilizadas. As lâmpadas de cátodo oco normalmente têm na sua constituição argon ou néon a pressões reduzidas, visto que estes dois gases têm um espectro de emissão muito simples. No interior destas lâmpadas estão eléctrodos (ânodo e cátodo construído com o elemento a que a lâmpada se destina) que ao ser aplicado uma diferença de potencial, origina ionização do gás raro e os iões formados podem adquirir energia suficiente para excitarem os átomos do elemento ao bombardearem o cátodo, e estes ao voltarem ao estado fundamental emitem a radiação característica [83-86].

Segue-se um dispositivo de atomização. A câmara de grafite (figura 8) é um pequeno cilindro posicionado por forma que a radiação externa passe através do centro do tubo. O interior do cilindro é revestido com grafite pirolítica.

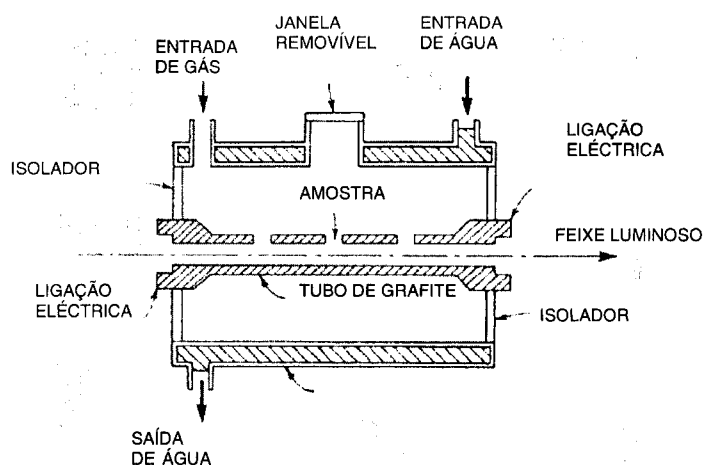


Figura 8 – Esquema de uma câmara de grafite [83].

As amostras líquidas são introduzidas por uma microseringa através de uma pequena abertura no topo do tubo. A amostra lá colocada é aquecida por radiação das paredes. Utiliza-se um gás inerte como o árgon, para garantir que toda a matriz é vaporizada e rapidamente removida para que nada fique depositado nas paredes da câmara e assim evitar um grande ruído (interferências) [83].

Após cada atomização é necessário restaurar rapidamente a temperatura ambiente e, para tal, a câmara encontra-se envolvida numa estrutura de metal que é arrefecida por água corrente. Os tubos pirolíticos contêm incorporada uma pequena partícula conhecida como plataforma de L'vov, para um melhor controlo da atomização.

Após injeção das amostras na câmara de grafite inicia-se um processo de aquecimento constituído por três etapas: secagem, pirólise e atomização. O controlo destas etapas é feito por computador em que se programa o tempo e a temperatura de cada ciclo. Na secagem pretende-se evaporar o solvente ou componentes voláteis da matriz, uma vez que a maioria das determinações se realizam sobre as amostras na forma líquida. O ritmo de variação da temperatura e o seu valor final depende do solvente que estiver presente. A pirólise destina-se à volatilização e destruição da matriz, bem como de espécies moleculares e

iónicas resultantes da mineralização de substâncias orgânicas existentes na amostra. Esta etapa é a que condiciona mais fortemente a qualidade dos resultados analíticos. Um dos problemas desta etapa consiste na perda de analito quando a temperatura é muito alta e é mantida por tempo em excesso. Na última etapa, a atomização, o analito é transformado em átomos livres que serão os que irão absorver a radiação. O tempo de cada etapa deve ser muito bem seleccionado segundo a natureza do analito e a composição da matriz [83].

Nesta técnica analítica utiliza-se um monocromador que tem como finalidade isolar os comprimentos de onda usados na análise. Este componente tem a capacidade para distinguir entre a risca do espectro que se selecciona para realizar a análise e outras riscas próximas [83].

Por fim, no espectrofotómetro encontra-se um detector de radiação e um sistema de ampliação e medição do sinal [83-86].

1.6.1.2. Preparação das amostras

Na maior parte dos casos, a amostra para análise por EAA/AE está convertida numa solução. Nesta solução não devem constar substâncias que interfira com a absorção medida. Quando estas substâncias existem na amostra devem ser retiradas (por exemplo: filtração) ou mascaradas, por um processo de complexação. Os reagentes utilizados são de elevada pureza e não devem conter interferentes ou o analito em análise.

Nem todas as amostras estão na fase líquida, por isso é necessário previamente submetê-las a um pré-tratamento. Este tratamento pode ser por vários métodos, normalmente a calcinação ou a digestão ácida.

A calcinação consiste em submeter a amostra a altas temperaturas num forno ou mufla até à sua mineralização. A temperatura de calcinação varia com o elemento em estudo, para evitar a volatilização deste. Quando as amostras estiverem calcinadas dissolvem-se em ácidos diluídos [83-86].

As amostras depois de secas e trituradas, sofrem uma digestão ácida, em que lhes são adicionados ácidos fortes, geralmente muito oxidantes. Estas misturas são colocadas em recipientes apropriados que consigam suportar a temperatura de ebulição do ácido.

Actualmente também se utiliza a digestão em microondas, em que se colocam as amostras e uma solução de um ácido forte em recipiente fechado, colocando-se a seguir num aparelho de microondas até solubilização total da matéria em estudo [83-86], sendo este método de mais rápida digestão e evitando perdas.

1.6.1.3. Interferências

A deterioração da superfície do atomizador é um dos grandes problemas que afecta directamente o resultado da análise. O pico que fornece o valor da concentração do analito diminui com o uso do atomizador e altera o seu valor com a variação da resistência eléctrica. Estes problemas podem ser resolvidos por um pré-aquecimento da grafite, que irá formar um revestimento pirolítico na superfície [83].

Quando ocorre uma combustão incompleta ou uma decomposição das moléculas durante o final da atomização podem ocorrer interferências de fundo (background). Estas interferências podem ser evitadas por um aquecimento muito alto e rápido da câmara de grafite. Outras interferências de fundo também são resolvidas quando a matriz do branco e a das amostras são semelhantes, visto que o valor do branco é utilizado para corrigir as medidas obtidas nas soluções de calibração e de amostras.

Os resultados obtidos por esta técnica também podem ser afectados por interferências de atomização. Este tipo de interferência aumenta quando alguns componentes da amostra alteram a percentagem de sais atomizados que contêm o analito em estudo.

A certa temperatura, os átomos com baixo potencial de ionização, ionizam-se, havendo redução da quantidade de átomos livres. A este tipo de interferência designa-se por interferência de ionização. Este problema é facilmente resolvido pela adição de outros elementos que ionizam mais rápido. Um dos elementos adicionados pode ser o potássio que diminui a ionização das amostras e das soluções de calibração [83].

1.6.2. Doseamento de cádmio, chumbo, crómio total, crómio hexavalente e níquel em cogumelos

Na Tabela 1 encontram-se resumidos vários estudos realizados por outros autores, nos quais se dosearam os metais objecto também do presente estudo, cádmio, chumbo, crómio e níquel em diferentes espécies de cogumelos. Para obtenção destes resultados, diferentes metodologias foram utilizadas, relativamente à preparação das amostras, à sua digestão e à técnica analítica utilizada.

De um modo geral, a preparação das amostras para o doseamento dos metais em análise consistiu na remoção de resíduos presentes no cogumelo, seguindo-se, em alguns estudos, a separação nas duas partes dos cogumelos, himenófero e restantes constituintes. As amostras foram a secar em estufas a diferentes temperaturas, algumas foram calcinadas em mufla submetidas a digestão ácida ou por microondas. As técnicas analíticas foram várias, entre as quais ICP/AE e EAA/AE, sendo esta última a utilizada no presente trabalho.

Não foram encontrados estudos em cogumelos em que o crómio hexavalente fosse doseado. No presente estudo utilizou-se a extracção alcalina, um método já utilizado em amostras de papel e solos [87, 88], que consiste na dissolução selectiva do crómio hexavalente a elevados valores de pH.

Tabela 1 - Resumo de estudos realizados noutros países.

País (referências)	Técnica Analítica	Espécies estudadas	Metais			
			Cd	Cr	Ni	Pb
África do Sul [89]	EAA/AE (mg/ kg)	<i>Rhizina undulata</i>	1,64 ±1,8 (CV%)	2,73 ± 2,2(CV%)	--	4,13 ± 1,8(CV%)
		<i>Agaricus xanthodermus</i>	2,12±2,5 (CV%)	1,08 ±2,5 (CV%)	--	3,66 ± 1,6(CV%)
		<i>Agaricus bisporus</i>	0,35± 1,8 (CV%)	0,25 ±2,1(CV%)	--	0,04 ± 1,9(CV%)
Espanha [29]	EAA/AE (ppm)	<i>Agaricus campestris</i>	--	--	--	H - 1,89 ±0,95 RF 1,40 ±0,69
		<i>Agaricus macrosporus</i>	--	--	--	H -1,25 RF - 0,73
		<i>Amanita rubescens</i>	--	--	--	H -0,59 ± 0,25 RF - 0,73 ±0,27
		<i>Boletus pinicola</i>	--	--	--	H - 0,51± 0,32 RF - 0,45± 0,27
		<i>Boletus badius</i>	--	--	--	H -0,37± 0,12 RF -0,52 ± 0,21
		<i>Cantharellus cibarius</i>	--	--	--	H - 0,81 ± 0,32 RF -0,79 ± 0,37
		<i>Clitocybe nebularis</i>	--	--	--	H -1,96 ±0,85 RF - 1,31 ± 0,77
		<i>Coprinus comatus</i>	--	--	--	H -2,06 ±2,05 RF - 2,79 ± 3,39
		<i>Lactarius deliciosus</i>	--	--	--	H - 0,71± 0,19 RF - 0,46 ± 0,20
		<i>Lepista nuda</i>	--	--	--	H -2,03 ±2,41 RF - 1, ± 1,04

(Continuação)	Macrolepiota procera	--	--	--	--	H- 2,05 ± 1,87 RF -0,92± 0,61
	Russula cyanoxantha	--	--	--	--	H -0,54 ± 0,18 RF -0,59 0,26
	Tricholoma portentosum	--	--	--	--	H -0,38 0,18 RF -0,50 0,22
	Thamnomycetes derdoidea	3,82	4,40	13,30	50,2	
França [39]	Auricularia auricula-judae	1,54	1,81	5,47	19,5	Cogumelos colhidos em florestas da América Latina
	Auricularia mesenterica	1,23	1,37	3,66	15,3	
	Ramaria cyanocephala	2,60	14,70	8,55	28,6	
	Coprinus disseminatus	5,46	4,26	18,40	64,5	
	Crepidotus mollis	1,47	1,06	4,49	19,5	
	Hericium clathroides	0,70	0,72	1,99	6,3	
	Dictyophora indusiata	2,64	14,80	5,28	29,6	
	Ganoderma lucidum	0,52	0,00	1,36	4,7	
	Lentinus tigrinus	1,10	0,00	3,97	15,0	
	EAA/AE (ppm)					

(continuação)		<i>Octospora</i> sp	2,02	2,89	3,96	15,8	
		<i>Lentinus crinitus</i>	2,13	1,76	7,03	31,3	
		<i>Agaricus haemorrhoidarius</i>	2,87	1,26	9,91	131,0	
		<i>Xylaria hypoxylon</i>	3,08	0,92	10,80	38,0	
França [40]	ICP/AE (ppm)	<i>Boletus edulis</i>	1,39	1,34	5,35	21,2	Cogumelos colhidos em zonas não poluídas, situadas nos arredores de Paris
		<i>Boletus erythropus</i>	2	2,19	5,84	22,2	
		<i>Suillus bovinus</i>	2,26	2,67	8,04	26,1	
		<i>Suillus grevillei</i>	2,12	1,74	7,24	31,1	
		<i>Suillus luteus</i>	1,6	1,8	11	22,7	
		<i>Xerocomus badius</i>	3,27	27,1	5,38	17,6	
		<i>Agaricus sylvaticas</i>	2,4	1,6	6,5	32	
		<i>Agaricus sylvicola</i>	30,6	1,47	3,78	19,8	
		<i>Amanita muscaria</i>	13,9	1,69	7,54	33,3	
		<i>Amanita rubescens</i>	2,44	1,21	7,78	30,3	
		<i>Calocybe gambosa</i>	3,85	2,65	7,34	27,6	
		<i>Clitocybe nebularis</i>	3,23	2,43	9,24	42,5	

(continuação)		<i>Hypholoma fasciculare</i>	2,7	3,3	10,1	33,6	
Polónia [32]	ICP/AE (µg/ g)	<i>Suillus luteus</i>	0,56±0,16	--	--	1,3±0,2	Cogumelos colhidos em zonas não poluídas em Buszkowy, Górne, Debki, Żarnowiec e Lubiana, no norte da Polónia
		<i>Suillus bovinus</i>	0,57±0,36	--	--	0,54±0,31	
		<i>Boletus edulis</i>	12±3	--	--	1,2±0,8	
		<i>Laccaria amethystina</i>	0,68±0,21	--	--	1,2±0,9	
Portugal [37]	Espectrofotometria de Raio X (µg/ g)	<i>Boletus badius</i>	--	--	--	18,3 ±0,8	Cogumelos colhidos perto de auto-estradas no Porto
		<i>Tricholoma equestre</i>	--	--	--	19,5 ±0,9	
		<i>Lepiota procera</i>	--	--	--	29±2	
Portugal [37]	Espectrofotometria de Raio X (µg/ g)	<i>Boletus badius</i>				2,7±0,8	Cogumelos colhidos em florestas no norte de Portugal
		<i>Lactarius deliciosus</i>				2,2±0,3	
		<i>Tricholoma equestre</i>				2,6±0,8	
		<i>Lepiota procera</i>				2,5±0,5	
República Checa [31]	EAA/AE (mg/ kg de material seca)	<i>Boletus edulis</i>	11,5±3,03			3,25±8,73	Cogumelos colhidos nas proximidades de uma fundição de cobre em Krompachy, República Checa
		<i>Boletus badius</i>	12,4±4,34			2,79 ±9,59	
		<i>Suillus luteus</i>	1,68±3,00			1,36±5,43	
		<i>Macrolepiota procera</i>	14,0±26,4			27,3±95,7	
		<i>Lepista nuda</i>	4,72 ±15,3			5,55±19,2	
		<i>Lactarius pinicola</i>	10,2 ±1,71			0,30±2,02	

(continuação)		Lactarius piperatus	2,81± 2,55			0,38 ±2,91	
Turquia [90]	EAA/AE (mg/ kg)	Lentinus tigrinus	5,45 ±0,66	1,53± 0,12	5,14 ±0,42	2,78± 0,31	Cogumelos colhidos em Tokat, Turquia
		Amanita solitaria	7,50 ±0,56	2,66± 0,18	4,64 ±2,3	4,17 ±0,35	
		Lactarius deliciosus	2,84± 0,22	0,87±0,05	1,73±0,14	1,96 ±0,15	
		Russula delica	4,27± 0,32	1,28± 0,08	2,69 ±0,14	2,30 ±0,12	

Legenda: H – himenófero, RF – restantes constituintes, CV% - coeficiente de variação.

2. OBJETIVOS

O objectivo deste trabalho consistiu em quantificar por Espectrofotometria de Absorção Atómica com Atomização Electrotérmica (EAA/AE), as concentrações de cádmio, chumbo, crómio total, crómio hexavalente [Cr(VI)] e níquel em cogumelos e solos colhidos em diversas zonas das regiões da Beira Interior e Trás-os-Montes. Também se pretendeu comparar os resultados obtidos nas diferentes partes dos cogumelos (chapéu e pé), a sua ecologia (saprófitas e micorrízicos), bem como os resultados obtidos nas duas regiões. Pretendeu-se ainda, relacionar as concentrações dos metais pesados encontradas nestes macromicetes com as presentes nos solos pela quantificação do factor de bioacumulação (BCF) e caracterizar eventuais diferenças entre espécies no que respeita à capacidade acumuladora de metais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. LOCAL DE COLHEITA DOS COGUMELOS PARA ANÁLISE

As amostras de cogumelos e solos para análise foram colhidas em duas regiões de Portugal, Beira Interior, nomeadamente no distrito de Castelo Branco, e Trás-os-Montes, no distrito de Bragança.

O distrito de Castelo Branco (figura 9) encontra-se integrado na Região da Beira Baixa e consta de 11 concelhos. As colheitas das amostras foram realizadas em dois concelhos, Idanha-a-Nova e Vila Velha de Ródão.

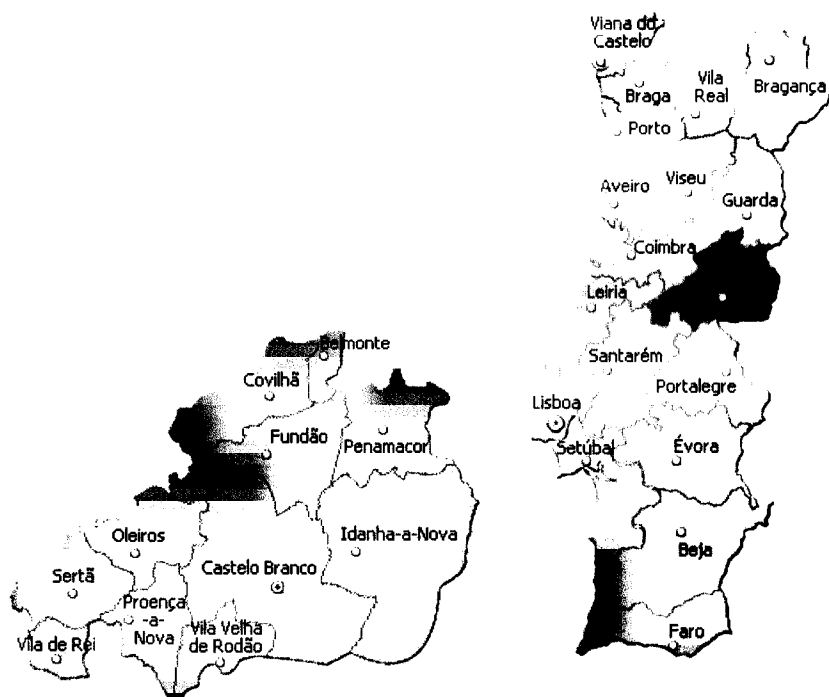


Figura 9– Distrito de Castelo Branco.

No concelho de Idanha-a-Nova (figura 10), as amostras foram colhidas em duas zonas distintas, nas freguesias de Toulões e de Rosmaninhal. Em Toulões

os cogumelos e os seus solos adjacentes foram colhidos no Monte dos Amarelos e em Avaril. O Monte dos Amarelos é uma zona não poluída, enquanto que as amostras colhidas em Avaril, situavam-se em zonas próximas de uma plantação de tabaco e de uma estrada. Na freguesia de Rosmaninhal, os locais escolhidos para a colheita foram Cegonhas, Monte das Soalheiras e Rosmaninhal, zonas não poluídas. Os solos deste concelho são em grande parte constituídos por xisto, terciário e granito, sendo a sua área florestal composta por azinheira, sobreiro, oliveira e carvalho.

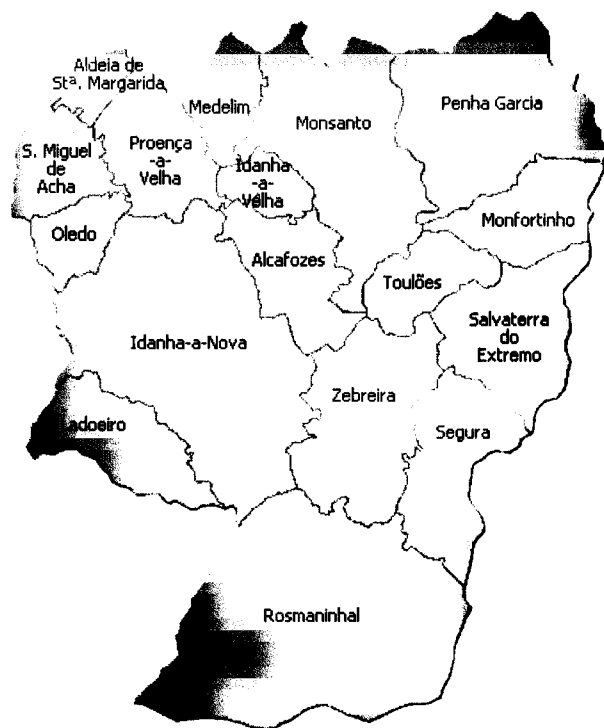


Figura 10 – Concelho de Idanha – a – Nova.

As amostras colhidas no concelho de Vila Velha de Ródão (figura 11) foram efectuadas na freguesia com o mesmo nome. A geologia deste concelho é marcada pela presença de afloramentos quartzíticos e terrenos constituídos por xisto e arcoses. A área florestal é predominantemente pinheiro bravo, azinheira, sobreiro e eucalipto. Algumas amostras foram colhidas em zonas próximas de

locais com possível contaminação por metais, nomeadamente perto de linhas férreas, indústrias de fabrico de papel e estradas, e em zonas não poluídas.

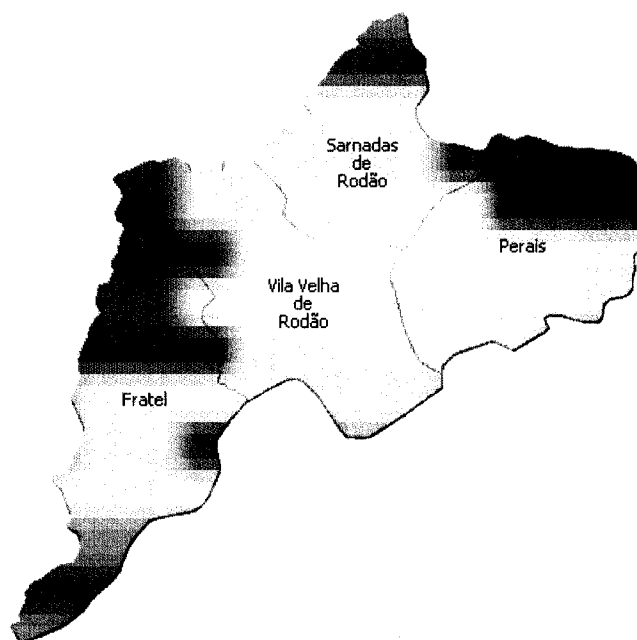


Figura 11 – Concelho de Vila Velha de Ródão

O Distrito de Bragança (figura 12) está totalmente integrado na Região de Trás-os-Montes e Alto Douro, que compreende um total de 12 concelhos. A sua área florestal é composta essencialmente por azinheiras, pinheiros, carvalhos e castanheiros. Os solos desta região são compostos essencialmente por rochas ultrabásicas e solos serpentínicos, que são ricos em teores de crómio e níquel. As rochas ultrabásicas contêm pouca sílica e são ricas em minerais ferromagnesianos e as rochas serpentínicas são metamórficas, xistosas ou nematoblásticas, que além de serpentina e olivina, podem conter granadas, cromita, hornblenda e magnetita. No concelho de Bragança, os locais de recolha foram Lameiro, Oleiros, Pinhal de Montelomeu, Sardoal Donai e Bragança. No concelho de Vinhais, o local escolhido foi Grandais, cuja constituição geológica é semelhante à de Bragança. Outras zonas onde se realizaram algumas colheitas foram Zedes, na freguesia de Carrazeda de Ansiães e Trindade, no concelho de Vila Flor (figura 13). Os locais de colheita não são poluídos, visto que se

encontram em zonas florestais longe de indústria, povoações e outras fontes de contaminação.

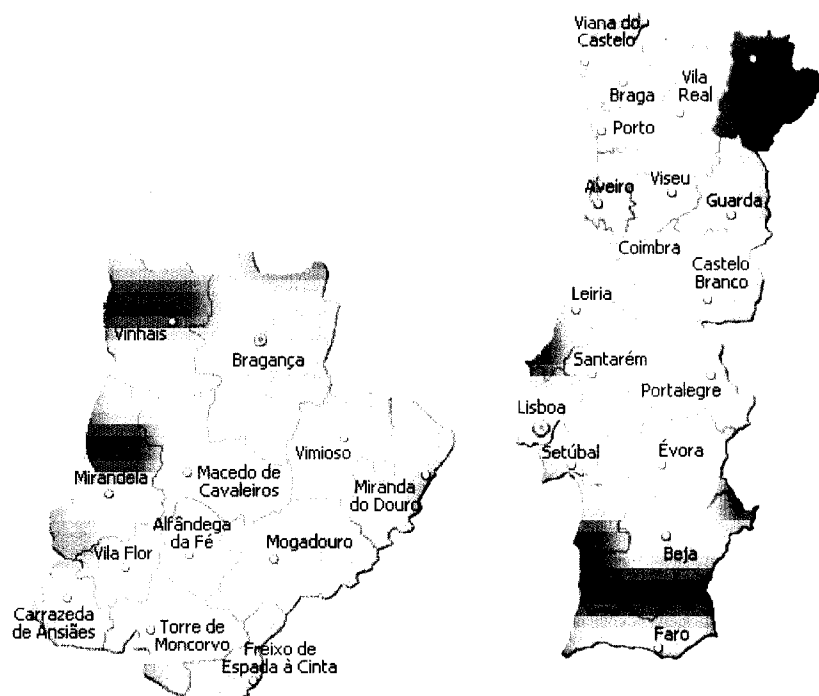


Figura 12 – Distrito de Bragança.

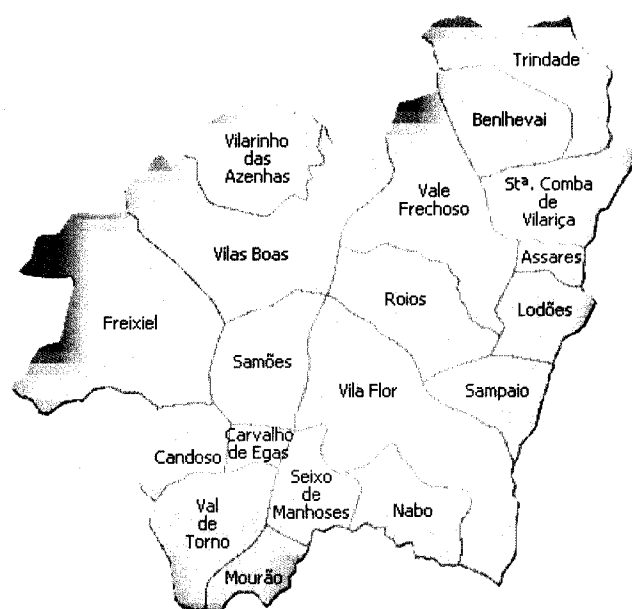


Figura 13– Concelho de Vila Flor.

3.2. AMOSTRAS DE COGUMELOS: SUA CARACTERIZAÇÃO

3.2.1. Amostras de cogumelos colhidas na Beira Interior

Agaricus sylvicola (Vittad.) Peck (figura 14) [91-93] – espécie edível, saprófita. A carne é esbranquiçada e tem cheiro a anis. O chapéu, cujo diâmetro pode variar entre 6 a 12 centímetros, é convexo quando jovem, podendo ao amadurecer tornar-se plano. A superfície é branca e seca. As lamelas são separadas e esbranquiçadas. O pé pode medir entre 6 a 12 centímetros e por vezes apresenta a forma de bolbo. A base do pé pode apresentar uma cor amarelada [94].

Local de colheita: Toulões, concelho de Idanha-a-Nova (zona não poluída), sendo colhidas 2 amostras.



Figura 14 – *Agaricus sylvicola* [94].

Amanita caesarea (Scop.: Fr.) Pers. [91-93] (figura 15) [91]– cogumelo edível, cuja nutrição é micorrízica. A carne é branca, de cheiro agradável. O chapéu pode medir até 15 cm, tem cor de laranja com uma grande placa branca no meio. A margem é estriada e a pele é lisa e brilhante. As lâminas amarelas, livres e

desiguais, têm a cor gema de ovo. O pé também é amarelo, liso e bulboso. Tem uma volva grossa em forma de saco e um anel membranoso e amarelo [94].

Local de colheita: Toulões, concelho de Idanha-a-Nova (zona não poluída), sendo colhida 1 amostra.



Figura 15 – *Amanita caesarea* [94].

Amanita ponderosa Malençon & Heim [91-93] (figura 16) - espécie edível e micorrízica. A carne é branca, rosada quando em contacto com o ar e com cheiro característico a terra. O chapéu pode medir até 15 cm de diâmetro. É de cor branca, mas pode adquirir cores ocre. A pele é lisa, fácil de separar da carne. As lâminas são livres, separadas e desiguais, de início brancas, depois tornam-se ocre. O pé é branco, com tonalidades vermelhas, robusto e cheio. A volva é grossa [6].

Local de colheita: Vila Velha de Ródão (zona poluída), sendo colhidas 4 amostras, e Soalheiras, Cegonhas e Rosmaninhal, concelho de Idanha- a – Nova (zona não poluída), onde também se colheram 4 amostras.



Figura 16 - *Amanita ponderosa* [6].

Amanita rubescens Pers. [91-93] (figura 17) – cogumelo edível, micorrízico, cuja carne é branca e que fica avermelhada quando em contacto com o ar, muito aromática. O chapéu pode chegar aos 15 – 20 cm de diâmetro, de cor rosada, por vezes acinzentada recoberto de restos de véu branco, cinzento ou rosa, de consistência farinácea, que se retira facilmente com a unha. As lâminas são desiguais e, inicialmente são brancas e depois ficam vermelhas. O pé é vermelho na base. Tem um anel cinzento ou vermelho em forma de pêndulo e estriado [8]. Local de colheita: Toulões, concelho de Idanha-a-Nova (zona não poluída), sendo colhidas 1 amostra.



Figura 17 - *Amanita rubescens* [94].

Boletus regius Krombh. [91-93] (figura 18) – espécie edível, micorrízica, em que a carne é amarela azulada e aromática. O chapéu pode medir até 15 cm de diâmetro, de cor rosa, roxo claro ou vinoso. No estado adulto pode ficar castanho. Os poros têm uma cor amarela limão, são pequenos. O pé é de cor amarela pálida [94].

Local de colheita: Toulões, concelho de Idanha-a-Nova (zona não poluída), sendo colhidas 3 amostras.



Figura 18 - *Boletus regius* [94].

Volvariella gloiocephala (D.C.: Fr.) Boekhout & Enderle [91-93] (figura 19) – cogumelo edível e saprófita. A carne é branca. O chapéu é viscoso e pode medir de 6 a 14 cm. As lâminas são rosadas. Tem cor branca acinzentada e uma forma que varia entre ovóide e convexa ou expandida. O pé é esbranquiçado, fino e liso e na base encontra-se uma pequena volva esbranquiçada, acinzentada [8].

Local de colheita: Avaril, concelho de Idanha-a-Nova (zona poluída), sendo colhidas 2 amostras.



Figura 19 - *Volvariella gloiocephala* [8].

3.2.2. Amostras de cogumelos colhidas em Trás-os-Montes

Amanita muscaria (L.: Fr.) Lam. [91-93] (figura 20) – Cogumelo alucinogénico e micorrízico. A carne é grossa e branca, sendo amarela alaranjada debaixo do chapéu. O chapéu pode ter até 20 cm de diâmetro, convexo. A sua cor varia entre o vermelho e o alaranjado, e a superfície está coberta de restos de véu branco. As lâminas nascem livres desde o pé, ligeiramente juntas e são brancas. O pé é mais ou menos cilíndrico, sedoso, com um anel membranoso e estriado. A base do pé é bulbosa [94].

Local de colheita: Grandais, concelho de Vinhais (zona não poluída) e Bragança (zona não poluída), sendo colhidas 2 amostras.

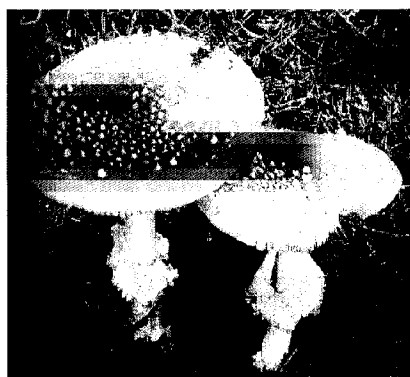


Figura 20 - *Amanita muscaria* [94].

Lactarius deliciosus (L.: Fr.) Gray [91-93] (figura 21) – espécie edível, micorrízico, em que a carne é de cor alaranjada e que passa a verde em contacto com o ar. O chapéu, de 10 a 12 cm, acaba por adquirir a forma de funil. É de cor cenoura com bandas concêntricas com distintas tonalidades. A pele é lisa e algo viscosa. As lâminas são desiguais, da mesma cor do chapéu. O pé é oco e curto e da mesma cor que os restantes constituintes do cogumelo [6, 8].

Local de colheita: Zedes, Carrazedas de Ansiães (zona não poluída), Grandais, concelho de Vinhais (zona não poluída); Trindade, concelho de Macedo de

Cavaleiros (zona não poluída) e Vila Flor (zona não poluída), sendo colhidas 4 amostras.



Figura 21 - *Lactarius deliciosus* [6].

Lactarius piperatus (L.: Fr.) Pers. [91-93] (figura 22) – cogumelo não comestível e micorrízico. É uma espécie semelhante à *Lactarius vellereus* mas as suas lâminas são muito apertadas e de cor ligeiramente rosada [94].

Local de colheita: Oleiros, concelho de Bragança (zona não poluída), sendo colhida 1 amostra.



Figura 22 – *Lactarius piperatus* [94].

Lactarius vellereus (L.: Fr.) Fr. [91-93] (figura 23) – cogumelo comestível de pouca qualidade e micorrízico. A carne é preta e branca e de sabor muito acre, que diminui ao ser cozinhado. O chapéu pode ter 30 cm de diâmetro, convexo,

relativamente ondulado, branco. As lâminas, de cor ocre, estão juntas e são anastomosadas. O pé é curto, branco com manchas castanho claro [94].

Local de colheita: Oleiros, concelho de Bragança (zona não poluída), sendo colhida 1 amostra.



Figura 23 – *Lactarius vellereus* [94].

Leucopaxillus giganteus (Leyss.: Fr.) Singer [91-93] (figura 24) – cogumelo edível, saprófita, de sabor agradável; o chapéu pode medir entre 8 a 30 centímetros, afunilado, cuja coloração é esbranquiçada e acastanhada no centro deste. O pé é liso, também esbranquiçado, cujo comprimento pode variar entre 4 a 7 centímetros. Os esporos podem ter forma de amêndoa e são lisos [8].

Local de colheita: Cova Lua, Lameiro, concelho de Bragança (zona não poluída), sendo colhida 1 amostra.

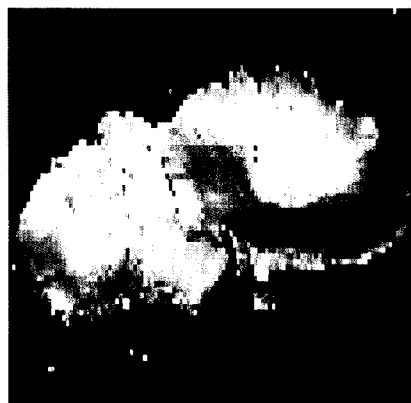


Figura 24 – *Leucopaxillus giganteus* [8].

Lycoperdon perlatum Pers.: Pers. [91-93] (figura 25) – cogumelo comestível de pouca qualidade, saprófita, em que a carne é esbranquiçada. O chapéu é em forma de pêra a globulosa que pode ter um diâmetro até 6 cm. Possui papilas que exibem colorações desde o branco ao castanho acinzentado. O pé é da mesma cor que o chapéu [8].

Local de colheita: Grandais, concelho de Vinhais (zona não poluída) e Oleiros, concelho de Bragança (zona não poluída), sendo colhidas 4 amostras.

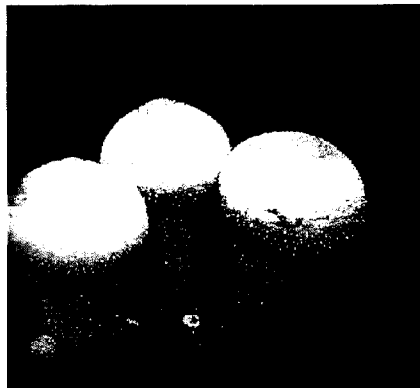


Figura 25 – *Lycoperdon perlatum* [8].

Macrolepiota procera (Scop.: Fr.) Singer [91-93] (figura 26) – cogumelo edível e saprófita. A carne é branca. O chapéu de cor amarelo acastanhado, com zonas concêntricas de castanho-escuro, é plano e pode ter de diâmetro até 25 cm. O pé é de cor creme, cuja base é bolbosa e com um anel na zona superior [8].

Local de colheita: Zedes, Carrazedas de Ansiães (zona não poluída), Sardoal Donai, concelho de Bragança (zona não poluída), Bragança (zona não poluída), sendo colhidas 4 amostras.



Figura 26 – *Macrolepiota procera* [8].

Psilocybe fascicularis (Huds.: Fr.) Noordel. [91-93] (figura 27) – cogumelo venenoso, saprófita ou parasita em que a carne é amarela pálida. O chapéu pode medir cerca de 6 a 8 cm, é semi-esférico, liso e de tons alaranjados. As lâminas nascem junto ao pé e estão relativamente unidas, de um tom amarelado. O pé é fino e da mesma cor que o chapéu [94].

Local de colheita: Grandais, concelho de Vinhais (zona não poluída), senco colhida 1 amostra.



Figura 27 - *Psilocybe fascicularis* [94].

Suillus granulatus (L.: Fr.) Roussel [91-93] (figura 28) – cogumelo edível, micorrízico, cuja carne é branca amarelada, suave, com sabor a fruta. O chapéu pode medir até 10 cm de diâmetro e é viscoso, de cor amarela a castanha. Os

poros são muito pequenos e amarelos. O pé é amarelo com pontos escuros na ponta [94].

Local de colheita: Pinhal de Montelomeu, Bragança, concelho de Bragança (zona não poluída), sendo colhida 1 amostra.



Figura 28 – *Suillus granulatus* [94].

Suillus luteus (L.: Fr.) Gray [91-93] (figura 29) – Cogumelo edível, micorrízico. A carne é amarela e rosa pálida na base do pé e liberta um odor ácido. O chapéu é convexo, viscoso, brilhante e pode medir até 10 cm. A cor deste é castanha. Os poros e os tubos são grandes e amarelos. O pé é amarelo e tem pontos mais escuros e a sua base é rosada. Tem anel viscoso, de cor castanha escura [8, 94]. Local de colheita: Grandais, concelho de Vinhais (zona não poluída), sendo colhida 1 amostra.



Figura 29 – *Suillus luteus* [94].

Tricholoma acerbum (Bull.: Fr.) Quél. [91-93] (figura 30) – espécie de cogumelo não comestível e micorrízico. O chapéu pode medir entre 7 a 12 centímetros. A sua cor é amarelada e a sua forma é convexa e curva na margem. O pé tem forma de bolbo e pode ser pontuada na base. A carne é branca, amarga e por vezes de cheiro frutado. Os esporos também são brancos e tem uma forma oval [6].

Local de colheita: Grandais, concelho de Vinhais (zona não poluída) e Oleiros, concelho de Bragança (zona não poluída), sendo colhidas 4 amostras.



Figura 30 – *Tricholoma acerbum* [6].

3.3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1. Reagentes

Todas as soluções foram preparadas com água bidesionizada e os reagentes utilizados foram ácido fluorídrico (HF), ácido clorídrico (HCl), ácido nítrico (HNO_3), cloreto de cálcio (CaCl_2), hidróxido de sódio (NaOH) e nitrato de amónio (NH_4NO_3) (grau suprapuro da Merck).

As soluções padrão de 1000 $\mu\text{g/mL}$ utilizadas foram preparadas diariamente a partir de soluções da Spectrol, BDH. A solução de crómio foi preparada a partir de uma solução 1000 mg/L de nitrato de crómio (III) em HNO_3 (0,2 % v/v). A preparação da solução stock de Cr(VI) consistiu na dissolução de 0,2829 g de dicromato de potássio (Riedel-de-Haen, Germany), em 100 mL de água bidesionizada. As amostras diluídas de Cr(VI) foram feitas diariamente a partir da solução mãe.

Os modificadores de matriz utilizados foram 1g/L de nitrato de magnésio [$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$] e 2g/L de [$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$] e 3g/L de nitrato de paládio [$\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$], de grau suprapuro, Merck. Estes modificadores foram preparados em ácido nítrico suprapuro a 15% (v/v).

O material de referência utilizado para o doseamento de cádmio, chumbo, crómio e níquel foi Lichen CRM 482 da Community Bureau of Reference –BCR. Para o solo utilizou-se o NCZ/ 7001 da Prochem.

Para evitar contaminações, todo o material (recipientes de teflon®, pipetas, pontas para micropipetas e cuvettes) foi imerso em solução a 15% (v/v) de HNO_3 (*pro analysis* da Merck) durante 24 horas; depois o material foi lavado com água bidesionizada e seco numa zona protegida do pó e poeiras até ser utilizado.

3.3.2. Equipamento

- a) Sistema de purificação de água - Seralpur PRO 90 CN and Seradest LFM 20
- b) Balança –Mettler Toledo AB265-S model
- c) Estufa – Heraeus stove D-6450 model
- d) Agitador – GFL 3006
- e) pH meter – WTW pH 330/SET-2, Best. NR 100 788, Germany
- f) Espectrofotômetro –Perkin-Elmer HGA-850 Furnace acoplado a model AAnalyst 300 Spectrometer com corrector de background de detério equipado com AS-800 Autosampler e hp Deskjet 920C. As análises forma realizadas em tubos Perkin-Elmer HGA com plataforma integrada.

3.3.3. Colheita e preparação das amostras

3.3.3.1. Colheita e preparação das amostras de cogumelos

As amostras de cogumelos e solos foram colhidas com a ajuda de facas de plástico e limpas com o auxílio de um pincel e papel. Os cogumelos foram lavados com água suprapura, divididos em chapéu, pé e em alguns casos volva, colocados a secar numa estufa a 30-40°C. O tempo de secagem dependeu de cada espécie. Depois de secos, os cogumelos foram pulverizados num almofariz de ágata.

3.3.3.2. Colheita e preparação das amostras de solos

As amostras de solos, subjacentes às amostras de cogumelos foram colhidas em ambas as regiões e tratadas do mesmo modo. Para a recolha das amostras, limpou-se uma pequena parte do solo, removendo a matéria orgânica e pedras. Em seguida retirou-se com ajuda de um tubo de plástico de diâmetro aproximado de 15 cm, uma porção de solo até 15 cm de profundidade. A estas

amostras removeu-se toda a matéria orgânica e pedras visíveis macroscopicamente, depois foram colocadas em cápsulas de porcelana, e em estufa onde secaram a 30 - 40°C. O processo de tratamento teve em conta todas as possíveis fontes de contaminação, e para tal, as amostras foram manuseadas com material não metálico.

3.3.4. Digestão ácida das amostras para doseamento de cádmio, chumbo, crómio total e níquel

Para cada recipiente de teflon foram pesados 0,250 g de amostra (cogumelos e solos). Adicionou-se a cada teflon 1mL de HF e 3 mL de HNO₃. Colocou-se na estufa a 105°C durante 8 horas até digestão completa e volatilização dos silicatos. Ao resíduo, adicionou-se 1 mL HNO₃ e 1 mL de HCl e os contentares foram de novo colocados em estufa a 105°C até dissolução completa das amostras. Os digestos obtidos foram transferidos para tubos de plástico, perfazendo um volume de 8 mL/10 mL com água desionizada, para as amostras de cogumelos e solos, respectivamente. Os “brancos” das amostras foram preparados utilizando recipientes sem amostra, e adicionando-se as mesmas quantidades de reagentes.

3.3.5. Extracção alcalina do crómio hexavalente

Foram pesadas alíquotas de aproximadamente 0,200 g de amostras de cogumelos e solos em tubos de 10 mL de polipropileno. Às amostras de cogumelos adicionaram-se 2,5 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 0,01M e às amostras de solo adicionaram-se 2 mL de NaOH, na mesma concentração, em tubo rolhado. Após agitação, as amostras foram colocadas num agitador horizontal durante 7 horas, a 300 oscilações por minuto e à temperatura ambiente, para extrair o crómio hexavalente. Após este tempo adicionaram-se a cada amostra 0,5 mL de nitrato de amónio (NH₄NO₃) 1M, agitaram-se muito bem

com o auxílio de um vortex e centrifugaram-se a 4000 rpm, durante 20 minutos. Foi doseado o crómio hexavalente presente na fase sobrenadante. Os padrões utilizados foram preparados nas mesmas condições de extracção das amostras.

3.3.6. Análise das amostras

O doseamento dos metais (cádmio, chumbo, crómio total, crómio VI e níquel) foi realizado num aparelho de EAA/AE. As temperaturas e os modificadores químicos utilizados para cada metal estão referidos na Tabela 2.

O corrector de background foi deutério, e utilizaram-se tubos HGA com plataforma integrada. O árgon foi o gás de arraste utilizado, com um fluxo de 250 mL por minuto. As leituras no espectrofotómetro foram obtidas através da área do pico (integração da absorvância). O pipetador automático foi programado para pipetar, sequencialmente, o modificador de matriz (10 µL), seguido pela solução padrão / amostra (15µL) e dispensados juntos no tubo.

Tabela 2 - Condições de análise por EAA/AE.

Parâmetros	Cádmio	Chumbo	Crómio	Crómio VI	Níquel
Comprimento de onda	228.8	283.3	357.9	357.9	232.0
Modificador	Pd + Mg	Pd + Mg	Pd + Mg	Pd + Mg	Mg
Pirólise	700	700	1600	1600	1300
Atomização	1100	1800	2500	2500	2500
Volume de injeção da amostra/modificador	15/ 10 µL				
Gás inerte / Fluxo	Árgon / 250 mL/ min				
Corrector de background	Deutério				
Modo de medição	Absorvância integrada				

3.3.7. Medição do pH do solo

Para a medição dos valores de pH do solo, efectuou-se uma suspensão preparada com 1g de solo em 2,5 mL de 0,01 mol/L de cloreto de cálcio (CaCl_2). Após 30 minutos de contacto entre o solo e a solução, a suspensão foi centrifugada e mediu-se o pH.

3.3.8. Análise estatística

As amostras de cogumelos foram analisadas em duplicado. Para cada valor apresenta-se a média, o intervalo de confiança, a mediana, o valor mínimo e máximo. Para os valores do factor de bioacumulação, apresenta-se a média geométrica, o intervalo de confiança, a mediana, o valor mínimo e máximo. A comparação de valores foi realizada pelo paired t test $\alpha=0,05$ e a comparação das concentrações das diferentes espécies de cogumelos foi efectuada por ANOVA, teste Tukey ($\alpha<0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Para demonstrar o rigor do método e dos resultados, foi feita a validação do método, sendo avaliados a linearidade, precisão, exactidão, recuperação pelo método das adições, limites de detecção e quantificação e o estudo das interferências. Para o estudo de validação utilizaram-se amostras de cogumelos da espécie *Agaricus bisporus*.

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados, directamente proporcionais à concentração da substância em estudo, dentro de uma determinada faixa de aplicação. O estudo da linearidade da metodologia analítica adoptada foi realizado recorrendo ao método da curva de calibração. A curva de calibração é obtida por diluições convenientes de uma solução concentrada da substância a analisar, de teor e pureza conhecidos e certificados, destinada a ser utilizada como referência no processo analítico. Para estabelecer a curva de calibração usou-se no mínimo cinco níveis de concentração, incluindo o branco (Tabela 3) [95]. Para tal, prepararam-se diferentes soluções-padrão com as concentrações dos diferentes metais.

Tabela 3 – Concentração de soluções padrão utilizadas para a realização da curva de calibração.

	Cádmio	Chumbo	Crómio	Crómio VI	Níquel
Concentração	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
de soluções-	0,25	1,00	1,00	0,25	2,50
padrão µg/L	0,50	2,50	2,50	0,50	5,00
	1,00	5,00	5,00	1,00	10,0
	2,00	10,0	10,0	2,50	25,0
		20,0	20,0		50,0

As zonas de linearidade para o cádmio estão compreendidos entre 0,062-2,5 µg/l, para crómio total 0,15-25 µg/l, para crómio hexavalente 0,17-20 µg/l, para chumbo 0,45-20 µg/l e para o níquel estes valores situam-se entre 0,63-50 µg/l, como está evidenciado na Tabela 4.

Para avaliar a eficácia do método, também foram realizadas outras determinações, nomeadamente a precisão da técnica analítica (repetibilidade instrumental e repetibilidade global), o limite de detecção e o limite de quantificação, cujos resultados estão apresentados na Tabela 4. A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra sob as mesmas condições (repetibilidade instrumental). A mesma amostra foi doseada 20 vezes no mesmo equipamento e o resultado foi expresso em termos de coeficiente de variação (%).

$$\text{Coeficiente de variação (C V) (\%)} = \text{desvio padrão} / \text{média} * 100$$

Para o cádmio, o coeficiente de variação foi de 2,2 %, para o crómio 1,3 %, crómio hexavalente 1,6 % níquel 9,6% e para o chumbo 2,2%.

A repetibilidade global ou precisão global representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efectuadas sob as mesmas condições de medição (mesmo operador, mesmo método, as mesmas condições de trabalho). O resultado foi expresso em coeficiente de variação. Para este estudo, pesou-se 20 vezes a mesma quantidade de uma amostra de cogumelos (0,250 g) em que, após digestão ácida, se dosearam os metais em estudo. Para o cádmio este valor foi de 7,77%, crómio total 10,0%, crómio hexavalente 6,2%, níquel 9,7% e para o chumbo o valor obtido foi de 8,65%. Os coeficientes de variação obtidos para a repetibilidade e para a repetibilidade global para os metais em estudo foram menores ou iguais a 10%, sendo os valores obtidos muito próximos uns dos outros, deste modo, comprovando a precisão da técnica analítica adoptada. Estes valores estão de acordo com a legislação europeia [95].

Outros parâmetros analisados foram os limites de detecção e de quantificação. O limite de detecção representa a menor concentração do elemento em estudo que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Para obtenção deste valor, mediu-se 20 vezes o mesmo branco da

amostra. Após leitura efectuou-se a média das medidas e o desvio padrão. O limite de detecção é 3 vezes o valor do desvio padrão do ruído de fundo.

$$\text{Limite de detecção (LD)} = 3 * (\text{desvio padrão/ declive da recta})$$

O valor do limite de detecção para o cádmio foi de 0,062 µg/L, crómio total 0,15 µg/L, crómio hexavalente 0,17 µg/L, níquel 0,63 µg/L e chumbo 0,45 µg/L.

O limite de quantificação representa a menor concentração de substância em estudo que pode ser medida. Para a obtenção deste valor, mediu-se 20 vezes o mesmo branco da amostra. Após a leitura efectuou-se a média dos valores e o desvio padrão. O limite de quantificação é 10 vezes o valor do desvio padrão do ruído de fundo.

$$\text{Limite de quantificação (LQ)} = 10 * (\text{desvio padrão/ declive da recta})$$

O valor mínimo que pode ser medido de cádmio é de 0,21 µg/L, para o crómio 0,51 µg/L, crómio hexavalente 0,56 µg/L, níquel 2,08 µg/L e para o chumbo, o limite de quantificação é de 1,48 µg/L.

Tabela 4 - Eficácia do método.

	Precisão (CV%)		Linearidade	Limite de detecção		Limite de quantificação	
	Repetibilidade	Repetibilidade global		µg/L	ng/g	µg/L	ng/g
Cd	2,2	7,77	0,062- 2,5	0,062	1,98	0,21	6,61
Cr	1,3	10,0	0,15-25	0,15	4,8	0,51	16,3
Cr (VI)	1,6	6,2	0,17-20	0,17	2,6	0,56	8,4
Ni	9,6	9,7	0,63-50	0,63	20	2,08	66,7
Pb	2,2	8,65	0,45-20	0,45	14,3	1,48	47,5

A exactidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em determinado ensaio e um valor de referência aceite como verdadeiro. A exactidão do método para o doseamento de cádmio, chumbo, crómio e níquel foi avaliada pelo doseamento destes mesmos metais em materiais certificados de líquen (Lichen – CRM 482) e de solo (NCS ZC 73001). Preparam-se estes por digestão ácida e a sua análise foi semelhante à das amostras. Os valores esperados e encontrados encontram-se nas Tabelas 5 e 6, respectivamente. Os resultados obtidos são muito semelhantes aos valores esperados, o que demonstra a exactidão da técnica analítica.

Tabela 5 – Resultados obtidos na medição do material certificado de líquens (Lichen – CRM 482).

Elemento	Resultado esperado	Resultado encontrado
Cádmio	0,56 mg/kg ($\pm 0,02$)	0,53 mg/kg ($\pm 0,025$) n= 11
Chumbo	40,9 mg/kg ($\pm 1,4$)	38,8 mg/kg ($\pm 1,4$) n= 12
Crómio	4,12 mg/kg ($\pm 0,15$)	3,86 mg/kg ($\pm 0,18$) n=11
Níquel	2,47 mg/kg ($\pm 0,07$)	2,45 mg/kg ($\pm 0,05$) n= 15

Tabela 6 – Resultados obtidos na medição do material certificado de solo (NCS ZC 73001).

Elemento	Resultado esperado	Resultado encontrado
Cádmio	0,105 $\mu\text{g/g}$ ($\pm 0,013$)	0,101 $\mu\text{g/g}$ ($\pm 0,005$)
Chumbo	22 $\mu\text{g/g}$ (± 2)	22,7 $\mu\text{g/g}$ ($\pm 0,3$) n=10
Crómio	58 $\mu\text{g/g}$ (± 2)	57 $\mu\text{g/g}$ (± 2) n=10
Níquel	26 $\mu\text{g/g}$ (± 1)	26,3 $\mu\text{g/g}$ ($\pm 0,8$)

Para a avaliação da exactidão do método de doseamento do crómio VI foi realizado o método das adições de padrões e estudo das recuperações. No método de adição de padrões, adiciona-se quantidades conhecidas do elemento em estudo, crómio hexavalente, em concentrações diferentes, numa matriz de cogumelos, (0,25, 0,5, 1 e 2,5 µg/L) (Tabela 7) e a um dos tubos não se adicionou nenhuma concentração de padrão. As concentrações de padrão adicionadas foram seleccionadas tendo em conta o intervalo linear da curva de calibração. Após extracção alcalina, a concentração de Cr(VI) foi doseada. Os valores de recuperação obtidos foram superiores a 92%, provando a exactidão do método.

Tabela 7 - Resultado estatístico dos valores obtidos no método das adições para Cr(VI).

	C₁ (µg/L)	C₂ (µg/L)	C₃ (µg/L)	Recovery (%)
Cr (VI)	0,63 ±0,084	0,25	0,865 ±0,010	94 ±4
		0,5	1,105 ±0,015	95 ±3
		1,0	1,59 ±0,02	96 ±2
		2,5	2,93 ±0,05	92 ±2

C₁- Concentração inicial de Cr(VI) na amostra de cogumelos

C₂-Concentração de solução padrão de Cr(VI) adiciona à amostra de cogumelos

C₃-Concentração final doseada na amostra de cogumelos

A selectividade do método é a capacidade de conseguir medir os elementos na presença de compostos que possam interferir na sua medição. A selectividade garante que o valor obtido na medição seja exclusivamente do elemento em interesse. Para estudar-se a selectividade do método efectuou-se um estudo de interferências [96], em que se preparou uma solução simuladora da matriz de cogumelos, que continha uma constituição média dos principais

constituintes majoritários e minoritários, à exceção do analito em estudo, de acordo com a Tabela de composição das diversas matrizes (Tabela 8) [97].

Tabela 8 – Constituintes principais dos cogumelos, usados para preparar a matriz simuladora utilizada no estudo de interferências [97].

Constituintes Inorgânicos	Concentração (mg/ 100g)	Constituintes Orgânicos	Concentração (g/ 100g)
Potássio	320	Hidratos de carbono	0,4
Fósforo	80	Gordura	0,5
Cloreto	69	Proteína	1,8
Magnésio	9	Açúcares totais	0,2
Cálcio	6		
Sódio	5		
Ferro	0,6		
Manganês	0,1		
Zinco	0,4		
Selênio	9 µg/ 100g		

Os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas 9 e 10. Os coeficientes de variação para os vários metais foram inferiores a 10%, e os valores de recuperação calculados no estudo de interferências para o cádmio, chumbo e níquel foram superiores a 90%, demonstrando deste modo, que não existe nenhum constituinte nos cogumelos, que interfira no doseamento destes metais.

Tabela 9 - Estudo de interferências para cádmio, chumbo e níquel.

	Concentração adicionada µg/L	Concentração Obtida µg/L	Coeficiente de variação %	Recuperação obtida %
Cádmio	0,25	0,23	3,5	93± 3
	0,50	0,47	4,6	94±3
	1,00	0,98	2,0	98±2
	2,00	1,84	2,3	92±2
Chumbo	2,50	2,48	1,0	99±1
	5,0	4,8	2,2	95±2
	10,0	9,1	0,4	91±1
	20,0	18,6	2,9	93±2
Níquel	2,50	2,38	5,3	95±4
	5,0	4,7	4,7	94±4
	10,0	9,6	3,7	96±3
	25,0	24,5	1,6	98±1

No estudo de interferências para o crómio, optou-se por se verificar, se o crómio total interferia no doseamento de crómio hexavalente e também o inverso. Da matriz simuladora de cogumelos, retiraram-se 4 porções iguais. A uma adicionou-se a concentração menor de crómio total encontrada nas amostras de cogumelos, e à outra adicionou-se a concentração maior obtida. Às outras duas realizou-se o mesmo procedimento mas com crómio (VI). As matrizes simuladoras contaminadas com crómio total dividiram-se em várias tomas, e adicionaram-se 4 diferentes concentrações de crómio (VI) e as matrizes simuladoras contaminadas com crómio (VI), também se dividiram em várias tomas, e a cada uma adicionou-se uma das 4 concentrações diferentes de crómio (Tabela 10). Neste estudo, a variação dos valores esperados foi inferior a 4%, o que significa que as concentrações baixas e elevadas de crómio total, não interferem no doseamento de crómio hexavalente e também demonstra o inverso, que as concentrações

baixas e elevadas de crómio hexavalente não interferem com o doseamento de crómio total.

Tabela 10 – Estudo de interferências de Cr e Cr (VI).

Espécies interferentes	Concentração adicionada (µg/ L)		Concentração encontrada (µg/ L)		Variação dos valores esperados (%)	
	Cr	Cr (VI)	Cr	Cr (VI)	Cr	Cr (VI)
Cr _{min.} (a)		1		0,95±0,04		1,6
		2,5		2,40±0,08		2,2
		5		4,85±0,15		2,0
		10		9,60±0,30		2,1
Cr _{max.} (b)		1		0,93±0,03		1,9
		2,5		2,37±0,08		2,2
		5		4,75±0,20		2,0
		10		9,80±0,10		2,1
Cr(VI) _{min.} (c)	2,5		2,38±0,08		2,5	
	5		4,60±0,10		1,5	
	10		9,20±0,20		1,4	
	20		19,40±0,50		1,6	
Cr(VI) _{max.} (d)	2,5		2,38±0,12		3,4	
	5		4,75±0,25		4,0	
	10		9,40±0,50		3,7	
	20		19,60±0,20		0,5	

(a), (b), Concentração mínima e máxima de Cr encontradas nas amostras de cogumelos analisados e adicionada à matriz simuladora (0,03 e 13,8 µg/g, respectivamente).

(c), (d), Concentração mínima e máxima de Cr (VI) encontrado nas amostras de cogumelos analisados e adicionada à matriz simuladora (0,0085 e 2,1 µg/g, respectivamente).

Para verificar o método do doseamento de crómio (VI) e a eficácia da extracção alcalina, prepararam-se oito alíquotas das mesmas amostras de chapéu, pé e solo, contendo três níveis diferentes de concentrações, (<0,0085, 0,103, 0,580 µg/g nos chapéus, <0,0085, 0,143, 0,81 µg/g nos pés e 0,086, 0,427, 1,78 µg/g nos solos), nas quais após extracção alcalina do crómio (VI) e seu doseamento, se determinou o coeficiente de variação. Os valores obtidos estão descritos na Tabela 11. O coeficiente de variação é menor que 11,4% para todas

as amostras em análise. Estes resultados demonstram que tanto nas concentrações elevadas como nas baixas, os valores de quantificação obtidos são precisos e reprodutíveis.

Tabela 11 – variação da medição de amostras de cogumelos analisados com concentrações mínimas, médias e elevadas de Cr(VI), nos diferentes constituintes.

	Concentração mínima C V %	Concentração media C V %	Concentração Alta C V %
Chapéu 0,103 (<0,0085- 0,580) µg/g	11,4	6,2	9,8
Pé 0,143 (<0,0085- 0,81) µg/g	7,8	9,0	6,2
Solo 0,427 (0,086-1,78) µg/g	4,5	8,5	7,0

Para verificar a estabilidade do crómio (VI) durante o processo de extracção, efectuou-se a extracção alcalina numa amostra de cogumelos, de solo e de solução padrão durante 1, 3, 5, 7 e 17 horas. Após o doseamento do elemento nos vários extractos, verificou-se que 7 horas era um tempo razoável para extrair este metal nas amostras e que, o crómio (VI) ainda se encontrava estável após 17 horas, sem alteração do estado de oxidação. Para confirmar este tempo, realizou-se uma extracção alcalina durante 7 horas, em amostras de cogumelos (chapéu e pé), bem como de solo, contendo níveis de concentração baixos, médios e altos. Os resultados obtidos confirmaram o método descrito.

Para verificar a influência de diferentes valores de pH na selectividade do crómio (VI) durante a extracção alcalina, a uma amostra de solo com valor de pH

mais elevado (6,66) foi-lhe adicionado diferentes concentrações de crómio (III) (de 0,5 a 5,0 $\mu\text{g/L}$). Após adição, procedeu-se à extracção alcalina e quantificou-se o elemento na fase sobrenadante. Para verificar a selectividade do crómio (VI) nos solos com a extracção alcalina, analisaram-se solos com diferentes níveis de crómio (VI) (baixo, 0,069 $\mu\text{g/g}$; médio, 0,48 $\mu\text{g/g}$; alto, 1,78 $\mu\text{g/g}$) aos quais se adicionaram diferentes concentrações de Cr (III) (de 0,5 a 5,0 $\mu\text{g/L}$). Os resultados obtidos não mostraram diferenças significativas, entre as concentrações encontradas naturalmente nos solos com as concentrações obtidas após adição de Cr (III), e pode concluir-se, que o Cr(III) presente nas amostras não é extraído pelo procedimento adoptado.

4.2. AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO METÁLICA

4.2.1. CÁDMIO

4.2.1.1. Teores de cádmio em cogumelos e solos

Os conteúdos de cádmio foram avaliados em 37 amostras de cogumelos e solos (Tabela 12). Os níveis de cádmio encontrados nos cogumelos analisados variaram no chapéu entre 0,013 e 4,961 µg/g e no pé 0,007 e 4,017 µg/g de matéria seca.

Tabela 12 – Concentrações (µg/g) de cádmio em cogumelos e solos.

	CHAPÉU (µg/g)	PÉ (µg/g)	Relação chapéu/pé	SOLO (µg/g)
Amostras n=37	0,693±0,343 ^a med=0,308 (0,013-4,961)	0,391±0,255 ^a med= 0,144 (0,007-4,017)	3,47±1,92 med= 2,33 (0,75-38,11)	0,012±0,004 med= 0,011 (<0,002-0,038)
Beira Interior n=17	0,443±0,240 ^b med=0, 279 (0,015-1,738)	0,205±0,132 ^b med= 0,108 (0,008-1,058)	4,67±4,13 med= 2,38 (0,89-38,11)	0,009±0,003 med= 0,013 (<0,002-0,014)
Trás-os- Montes n=20	0,905±0,592 ^c med= 0,393 (0,013-4,961)	0,549±0,453 ^c med= 0,145 (0,007-4,017)	2,46±0,534 med= 2,18 (0,75-5,21)	0,016±0,007 med= 0,010 (<0,002-0,038)
Saprófitas n=10	0,382±0,190 ^d med=0, 338 (0,015-0,979)	0,138±0,101 ^d med= 0,084 (0,008-0,481)	6,36±6,95 med= 2,76 (1,42-38,11)	0,012±0,007 med= 0,011 (<0,002-0,038)
Micorrízicas n=27	0,808±0,459 ^e med= 0,279 (0,013-4,961)	0,485±0,343 ^e med= 0,149 (0,007-4,017)	2,41±0,44 med= 2,03 (0,75-5,05)	0,012±0,005 med= 0,011 (<0,002-0,038)

Nota: (a,b,c,d,e – valores estatisticamente diferentes por paired t test) média + intervalo de confiança; med= mediana; (mínimo - máximo)

Numa revisão de Kalac e Svoboda de 2000 [27], sobre o conteúdo metálico em cogumelos, é referido que foram encontrados valores compreendidos entre 0,5 e 50 mg/kg de cádmio em matéria seca, dependendo do nível de contaminação da área de colheita. Os valores obtidos no presente estudo situam-se próximo dos valores mínimos referidos nesta revisão.

Considerando na globalidade, os resultados obtidos no presente estudo, apresentados na Tabela 12, pode-se verificar que o chapéu dos cogumelos apresenta concentrações de cádmio significativamente superiores aos do pé, sendo em média, no chapéu e no pé, $0,693 \pm 0,343$ e $0,391 \pm 0,255$ $\mu\text{g/g}$, respectivamente. Resultados semelhantes foram já descritos anteriormente noutros estudos [7, 44], e uma possível justificação para esta diferença deve-se ao facto de que é no chapéu que se encontra uma maior concentração de proteínas com grupo sulfidrílo com alta afinidade para o metal [26, 50]. Como resultado dos cogumelos conterem uma maior concentração de cádmio no chapéu do que no pé, os valores de relação entre o chapéu e o pé são superiores a 1.

Os valores de cádmio encontrados nos cogumelos da Beira Interior, em média, foram de $0,443 \pm 0,240$ $\mu\text{g/g}$ para o chapéu e de $0,205 \pm 0,132$ $\mu\text{g/g}$ para o pé. Nas amostras de cogumelos da região de Trás-os-Montes encontrou-se no chapéu um teor de cádmio de $0,905 \pm 0,592$ e $0,549 \pm 0,453$ $\mu\text{g/g}$ no pé. Embora os valores obtidos em Trás-os-Montes sejam superiores aos encontrados nas amostras da Beira Interior, não existe uma diferença significativa, devido à dispersão dos resultados. Em ambas as regiões verifica-se uma concentração significativamente superior de cádmio nos chapéus dos cogumelos.

Neste estudo, não foi possível estabelecer diferenças entre as espécies saprófitas e micorrízicas quanto à capacidade de acumulação do cádmio. Nas espécies saprófitas foram encontradas no chapéu uma concentração média de $0,382 \pm 0,190$ $\mu\text{g/g}$ e no pé $0,139 \pm 0,101$ $\mu\text{g/g}$ e nas espécies micorrízicas, os teores encontrados nos chapéus e nos pés foram de $0,808 \pm 0,459$ e $0,485 \pm 0,343$ $\mu\text{g/g}$, respectivamente. Apesar dos cogumelos micorrízicos apresentarem valores médios superiores do metal em estudo, esta diferença não é estatisticamente significativa. É de notar, que a maioria das espécies colhidas são micorrízicas. Contudo, noutros estudos realizados anteriormente [27, 40], verificou-se que as espécies saprófitas contêm maiores concentrações de cádmio

devido às suas maiores capacidades decompositoras e com isto, conseguirem libertar os metais pesados dos solos, facilitando a sua disponibilidade [7, 40, 44].

Os solos de Trás-os-Montes contêm um valor médio superior aos da Beira Interior ($0,016 \pm 0,007$ e $0,009 \pm 0,003$ $\mu\text{g/g}$, respectivamente), mas esta diferença não é estatisticamente significativa.

4.2.1.2. Factores de bioacumulação de cádmio

Neste estudo também se pretendeu estudar a capacidade de acumulação pelo cogumelo de um dado metal a partir do solo, e para tal calculou-se o factor de bioacumulação (BCF) pela seguinte fórmula [98]:

$$\text{BCF} = \text{Concentração do metal no cogumelo} / \text{concentração do metal no solo}$$

Os resultados foram expressos pela média geométrica. Quando o BCF é superior a 1, a concentração do metal encontrado é superior no cogumelo do que no solo, o que indica que os macromicetes podem ser considerados como bioacumuladores e portanto, bioindicadores de contaminação. Alguns autores consideram que quando este factor é menor que 1, os cogumelos são considerados bioexclusores [38].

Segundo os valores apresentados na Tabela 13, podemos considerar que os cogumelos são bons bioindicadores de contaminação de cádmio porque os seus factores de bioacumulação são superiores a 1 [38]. Considerando todos os cogumelos analisados, os chapéus têm um BCF médio de $47,54 \pm 113,66$ e os pés $19,56 \pm 106,44$. Com estes resultados verifica-se que o chapéu tem uma maior capacidade de bioacumular o metal em estudo do que o pé, pelas razões referidas anteriormente. A única excepção encontra-se nas espécies saprófitas, em que, embora o BCF do chapéu fosse superior ao do pé, ($23,53 \pm 54,53$ e $6,90 \pm 13,83$, respectivamente), não se encontraram diferenças significativas entre estes dois valores.

Num trabalho realizado anteriormente na Galiza, Espanha [7], em amostras colhidas em áreas próximas de fontes de contaminação e em zonas não contaminadas, encontraram-se valores médios de BCF de cádmio no himenófero

de 24,16 e no resto do carpóforo de 14,56, ligeiramente inferiores aos obtidos no presente trabalho.

Tabela 13 – Factores de bioacumulação de cádmio obtidos e relação entre as concentrações encontradas no chapéu e no pé.

	BCF Chapéu	BCF Pé
Amostras n=37	47,54 ±113,66 ^a med= 82,60 (0,35-2102,64)	19,56±106,44 ^a med= 31,32 (0,17-2028,83)
Beira Interior n=17	38,98±49,18 ^b med= 44,87 (1,12-369,99)	14,12±32,52 ^b med= 16,28 (0,64-243,45)
Trás-os-Montes n=20	56,28±205,45 ^c med= 93,92 (0,35-2102,64)	25,80±195,23 ^c med= 40,87 (0,17-2028,83)
Saprófitas n=10	23,53±54,53 med= 34,78 (1,12-288,56)	6,90±13,83 med= 8,81 (0,64-55,43)
Micorrízicas n=27	55,28±155,15 ^d med= 82,60 (0,35-2102,64)	28,76±144,72 ^d med= 144,72 (0,17-2028,83)

(a, b, c, d – valores com diferenças significativas estatisticamente por paired t test)

4.2.1.3. Influência da poluição na bioacumulação de cádmio pelos cogumelos

Neste trabalho pretendeu-se averiguar a influência de algumas fontes de poluição, na acumulação de metais pesados pelos cogumelos (Tabela 14). Na região da Beira Interior algumas das amostras foram colhidas nas proximidades de estradas, linhas-férreas, plantações de tabaco e eucalipto e de uma indústria de papel. Tanto nas amostras colhidas em zonas supostamente contaminadas, como nas colhidas em zonas distantes de fontes de contaminação, verificou-se novamente que os chapéus bioacumulam mais cádmio que os pés. As amostras colhidas em zonas não contaminadas apresentavam concentrações médias superiores às colhidas em zonas supostamente contaminadas (nos chapéus dos cogumelos não contaminados a concentração média é de 0,704±0,401 µg/g e nos

pés $0,419 \pm 0,299 \mu\text{g/g}$, enquanto que nos cogumelos supostamente contaminados a concentração média nos chapéus e nos pés é de $0,632 \pm 0,474$ e de $0,270 \pm 0,321 \mu\text{g/g}$, respectivamente), mas esta diferença não é estatisticamente significativa, visto que o número de amostras de zonas não contaminadas era muito superior às colhidas em zonas supostamente contaminadas. Realça-se o facto de o valor da relação entre a concentração de cádmio no chapéu e no pé ser superior nas amostras colhidas perto de fontes de poluição, sendo no entanto esta diferença não significativa.

Tabela 14 – Teores de cádmio em cogumelos colhidos em áreas com possível contaminação e não contaminadas.

	Concentração no Chapéu ($\mu\text{g/g}$)	Concentração no pé ($\mu\text{g/g}$)	Relação Chapéu/pé	Concentração no Solo ($\mu\text{g/g}$)
Amostras de áreas não contaminadas n=31	$0,704 \pm 0,401^a$ med= 0,279 (0,003-4,961)	$0,419 \pm 0,299^a$ med= 0,143 (0,007-4,017)	$2,43 \pm 0,42$ med= 2,03 (0,75-5,21)	$0,013 \pm 0,005$ med= 0,011 ($<0,002$ -0,038)
Amostras de áreas possivelmente contaminadas n=6	$0,632 \pm 0,474^b$ med= 0,500 (0,089-1,738)	$0,270 \pm 0,321^b$ med= 0,108 (0,009-1,058)	$8,88 \pm 11,49$ med= 3,31 (1,64-38,11)	$0,006 \pm 0,006$ med= 0,005 ($<0,002$ -0,014)

(a,b -diferenças entre chapéu e pé significativas estatisticamente por paired t test)

Das amostras colhidas nas proximidades de locais supostamente contaminados, as que continham maiores concentrações de cádmio foram as colhidas perto de plantações de tabaco e eucalipto, como a *Volvariella gloiocephala*, colhida perto de uma plantação de tabaco, que continha no chapéu $0,632 \mu\text{g/g}$ e no pé $0,163 \mu\text{g/g}$ e a *Amanita ponderosa* colhida numa encosta do rio Tejo, onde se situam algumas plantações de eucalipto, que tinha a concentração no chapéu e no pé de $1,738$ e $1,058 \mu\text{g/g}$, respectivamente. Uma possível justificação para estes valores consiste no facto de o cádmio ser um contaminante de fosfatos, que são usados como fertilizantes em algumas culturas. A amostra de *Amanita ponderosa* colhida perto da indústria de papel também continha valores elevados de cádmio, $0,733 \mu\text{g/g}$ no chapéu e $0,308 \mu\text{g/g}$ no pé. Como a concentração encontrada no solo é muito inferior à encontrada no

cogumelo, não se pode excluir a hipótese de que alguma contaminação de cádmio presente nos cogumelos, seja devida a contaminação aérea [13, 22, 25]. Embora não seja demonstrada a influência da poluição no presente trabalho, outros autores já a tinham demonstrado.

Tabela 15 – Valores encontrados para o factor de bioacumulação nos cogumelos, a relação entre as concentrações no chapéu e no pé e pH dos solos.

	BCF chapéu	BCF pé	pH
Amostras de áreas não contaminadas n=31	34,25±34,02 med= 60,38 (0,35-393,28)	17,21±28,10 med= 27,50 (0,17-379,47)	5,37±0,26 ^a med= 4,96 (4,58-6,66)
Amostras de áreas possivelmente contaminadas n=6	86,49±105,41 med= 81,67 (25,57-369,99)	12,63±52,92 med= 21,32 (0,67-155,43)	4,90±0,87 ^a med= 4,55 (3,88-6,26)

(a- diferenças significativas estatisticamente por paired t test)

Num estudo realizado na República Checa [31], em 1996, em que as amostras de cogumelos foram colhidas nas proximidades de uma mina de cobre perto de Krompachy, nos cogumelos das espécies *Boletus edulis* e *Macrolepiota procera* encontraram-se elevadas concentrações de cádmio. No *Boletus edulis* esta concentração era de 6,58 mg de cádmio/kg de matéria seca e a *Macrolepiota procera* continha 5,92 mg de cádmio/kg de matéria seca, sendo estes valores influenciados pela contaminação ambiental. Segundo este estudo há uma grande possibilidade de que os cogumelos colhidos a mais de 6 quilómetros de distância das fundições possam conter ainda elevadas concentrações de metais. Também num estudo realizado por Falandysz et al., [32] se concluiu que os cogumelos colhidos em zonas poluídas podem ser muito ricos em cádmio, chumbo e mercúrio. Lodenius et al., [99], num trabalho efectuado com o objectivo de determinar o cádmio em cogumelos colhidos em área florestal após o tratamento com cinzas de madeira com cádmio, verificou que as espécies *Russula emetica*, *Lycoperon perlatum*, *Hygrophoropsis aurantiaca*, *Clitocybe sp.* continham valores de cádmio superiores aos encontrados nas amostras controlo, colhidas em áreas em que não se adicionaram cinzas; como exemplo, a espécie *R. emetica* colhida

em solos tratados com cinzas continham valores de cádmio de 3,6 µg/g de matéria seca, enquanto a colhida no solo controlo, continha 0,57 µg/g.

Ao comparar-se os valores de BCF dos cogumelos analisados neste trabalho, verificou-se que os chapéus dos cogumelos colhidos em zonas poluídas continham valores para o factor de bioacumulação superiores ao dos chapéus de zonas não poluídas, mas esta diferença não é significativa.

Com os resultados obtidos, também se verifica que nas zonas próximas de locais supostamente contaminados, o valor de pH do solo é mais baixo, o que torna os metais mais acessíveis aos cogumelos e vegetais em geral. Em solos com pH mais baixo, o metal tem uma menor afinidade para a matéria orgânica, devido a diminuição das cargas negativas [56] à diminuição da formação de precipitados de óxidos, hidróxidos, carbonatos e fosfatos minerais com os metais, como o cádmio e o chumbo [100].

Tabela 16 – Valores encontrados de cádmio nas diferentes partes de *Amanita ponderosa*, em zonas não contaminadas e em locais próximos de zonas com possível contaminação e também as concentrações nos respectivos solos.

	Concentração no Chapéu (µg/g)	Concentração no pé (µg/g)	Relação Chapéu/pé	Concentração no solo (µg/g)
Amostras de áreas não contaminadas n=4	0,343±0,094 med= 0,349 (0,243-0,430)	0,264±0,165 med= 0,178 (0,108-0,482)	1,76±0,59 med= 1,94 (0,89-2,26)	<0,002±0,00 med= <0,002 (<0,002)
Amostras de áreas possivelmente contaminadas n=4	0,699±0,731 med= 0,484 (0,089-1,738)	0,362±0,471 med= 0,180 (0,032-1,058)	2,82±1,19 med= 2,57 (1,64-4,50)	0,002 ±0,005 med= <0,002 (<0,002-9,19)

A acumulação dos metais pesados é dependente da espécie de cogumelos, dado que umas têm melhor apetência para acumular que outras. Para melhor estudo da influência da poluição na acumulação de cádmio pelos cogumelos, estudou-se uma única espécie colhida em diferentes zonas supostamente contaminadas e não contaminadas. A espécie estudada foi a *Amanita ponderosa*. A espécie em causa foi escolhida devido à sua predominância em vários locais da Beira Interior, e à sua grande utilização na gastronomia da região. As amostras contaminadas foram colhidas no concelho de

Vila Velha de Ródão e as não contaminadas foram obtidas no concelho de Idanha-a-Nova.

Nas amostras colhidas em locais não contaminados (Tabela 16), verificou-se que o cádmio se distribui de um modo uniforme em todo o cogumelo (nos chapéus e nos pés encontraram-se, $0,343 \pm 0,094$ e $0,264 \pm 0,165$ $\mu\text{g/g}$, respectivamente) e nas amostras colhidas em locais possivelmente contaminados, a concentração de cádmio no chapéu evidenciou-se superior à encontrada nos pés, ($0,699 \pm 0,731$ e $0,362 \pm 0,471$, respectivamente) mas os valores encontrados não são significativamente diferentes. Embora as concentrações encontradas nas amostras colhidas nas proximidades de zonas com possível contaminação sejam superiores às das não poluídas, não se encontraram diferenças significativas entre as concentrações, o que não permite concluir pelo efeito da poluição. O mesmo se passa com o solo. Embora se encontrasse um teor de cádmio superior nos solos das zonas possivelmente contaminadas, esta diferença não é significativa. Mas encontrou-se diferenças relativamente ao pH (Tabela 17); o pH dos solos contaminados era mais ácido, permitindo uma maior acessibilidade do metal ao fungo, dado que a um pH mais baixo, existe uma maior mobilidade no solo de alguns metais como o cádmio. Este aumento da mobilidade do cádmio deve-se ao facto de que em solos com pH mais baixo, o metal tem uma menor afinidade para a matéria orgânica, devido a diminuição das cargas negativas.

Tabela 17 – Valores encontrados para o factor de bioacumulação no cogumelo *Amanita ponderosa*, a relação entre as concentrações no chapéu e no pé e pH dos solos.

	BCF chapéu	BCF pé	pH
Amostras de áreas não contaminadas n=4	$167,84 \pm 47,34$ med= 176,10 (122,71-217,26)	$101,11 \pm 83,50$ med= 90,12 (54,36-243,45)	$5,16 \pm 0,05^a$ med= 5,14 (5,11-5,23)
Amostras de áreas possivelmente contaminadas n=4	$138,89 \pm 136,53$ med= 153,88 (44,85-369,99)	$52,64 \pm 66,59$ med= 70,75 (16,28-155,43)	$4,23 \pm 0,38^a$ med= 4,18 (3,88-4,66)

(a – diferença significativa estatisticamente por paired t test)

Ao comparar-se os valores de BCF (Tabela 17) das amostras de *Amanita ponderosa* colhidas nas áreas não poluídas com as amostras poluídas, não se notaram diferenças significativas. Também se verifica que os factores de bioacumulação da *Amanita ponderosa*, são muito semelhante tanto no pé como no chapéu.

4.2.1.4. Diferenças entre algumas espécies de cogumelos na bioacumulação de cádmio

A acumulação dos metais pelos cogumelos é dependente da espécie, como foi referido anteriormente. Tentou-se então verificar diferenças entre amostras de espécies diferentes colhidas em maior quantidade, tanto na zona de Trás-os-Montes como da Beira Interior, provenientes de áreas distantes de fontes de contaminação. Segundo os resultados apresentados na Tabela 18, das espécies estudadas as que continham maiores teores de cádmio eram a *Amanita muscaria*, encontrando-se no chapéu e no pé $4,562 \pm 0,782$ e $3,390 \pm 1,230$ $\mu\text{g/g}$, respectivamente e *Lycoperdon perlatum* que continha $5,223 \pm 2,845$ $\mu\text{g/g}$. Quando estes valores são comparados com as concentrações obtidas nas outras espécies, encontram-se diferenças significativas. BCF das amostras de *Amanita muscaria* são os mais elevados, mas não têm significado estatístico, quando são comparados com os BCF das outras amostras.

Vários estudos foram já realizados para encontrar diferenças entre as espécies na acumulação de cádmio. Num estudo realizado por Michelot em 1998 [40], em várias espécies de cogumelos colhidos nos arredores de Paris, verificou-se que, para além do *Agaricus sylvicola*, a *Amanita muscaria* continha valores elevados de cádmio em relação às outras espécies analisadas (*Agaricus sylvicola* e a *Amanita muscaria* continham 30,6 e 13,9 $\mu\text{g/g}$ de cádmio, respectivamente). Também numa revisão de Kalac e Svoboda de 2000 [27] é referido o género *Agaricus* como um dos géneros que acumulam elevados valores de cádmio, podendo conter valores compreendidos entre 100 e 300 mg/kg de matéria seca em zonas com possível contaminação ambiental. Alonso em 2002 [7], verificou

que a espécie *Agaricus urinascens* era a que continha valores mais elevados de cádmio, 33,22 mg/kg de matéria seca.

Tabela 18 – Concentrações obtidas de cádmio nos chapéus e pés em diferentes espécies, bem como a sua relação e os factores de bioacumulação.

	Concentração chapéu (µg/g)	Concentração pé µg/g	Relação Chapéu/pé	BCF chapéu	BCF pé
<i>Agaricus sylvicola</i> n=2	0,018±0,007 med= 0,018 (0,015-0,022)	0,009±0,002 med= 0,009 (0,008-0,010)	2,03±1,20 med= 2,03 (1,42-2,64)	1,38±0,56 med= 1,41 (1,12-1,70)	0,71±0,14 med= 0,72 (0,64-0,79)
<i>Amanita muscaria</i> n=2	4,562±0,782 med= 4,562 (4,163-4,961)	3,390±1,230 med=3,390 (2,762-4,017)	1,42±0,75 med= 1,42 (1,04-1,80)	522,26±1933,43 med=1116,18 (129,72- 2102,64)	382,79±1917,44 med=1050,53 (72,22-2028,83)
<i>Amanita ponderosa</i> n=4	0,342±0,0094 med= 0,349 (0,243-0,430)	0,263±0,165 med= 0,178 (0,107-0,482)	1,76±0,59 med= 1,94 (0,89-2,26)	167,84±47,34 med= 176,10 (122,71-217,26)	101,11±83,50 med= 90,12 (54,36-243,45)
<i>Boletus regius</i> n=3	0,133±0,118 med= 0,075 (0,070-0,253)	0,042±0,031 med= 0,045 (0,014-0,068)	3,48±1,91 med= 3,70 (1,69-5,05)	8,42±9,01 med= 5,75 (5,36-19,34)	2,66±2,36 med= 3,40 (1,06-5,22)
<i>Lactarius deliciosus</i> n= 4	0,156±0,043 med= 0,144 (0,120-0,214)	0,098±0,066 med= 0,078 (0,040-0,195)	2,07±1,32 med= 1,57 (1,10-4,05)	36,44±43,81 med= 71,49 (3,27-108,14)	20,03±40,93 med= 30,89 (1,94-98,31)
<i>Lactarius perlatus</i> n=4	5,223 ± 2,845 * med= 6,022 (1,053-7,795)			284,62 ±306,16 * med= 364,90 (99,49-736,39)	
<i>Macrolepiota procera</i> n=4	0,585±0,303 med= 0,570 (0,221-0,979)	0,257±0,199 med= 0,243 (0,062-0,481)	3,08 ±1,63 med= 2,80 (1,51-5,21)	120,00±98,47 med= 108,54 (61,06-288,56)	43,63±10,78 med= 46,04 (31,31-55,43)
<i>Tricholoma acerbum</i> n=4	0,732±0,388 med= 0,568 (0,477-1,316)	0,213±0,077 med= 0,209 (0,143-0,291)	3,40±0,87 med= 3,34 (2,37-4,52)	76,76±300,28 med= 128,85 (12,90-664,78)	23,21±66,28 med= 40,61 (3,75-147,04)
<i>Volvariella gloiocephala</i> n=2	0,500±0,259 med= 0,500 (0,367-0,632)	0,087±0,151 med= 0,087 (0,010-0,163)	20,99 ±33,56 med= 20,99 (3,87-38,11)	33,54±18,04 med= 34,78 (25,57-43,98)	2,76 ±10,49 med= 6,02 (0,67-11,37)

* - os cogumelos foram analisados inteiros.

Não se verificou no presente estudo uma elevada acumulação de cádmio pela *Agaricus sylvicola*. As amostras desta espécie estudadas neste trabalho foram obtidas em solos pobres em cádmio e em locais distantes de plantações e

outras fontes de cádmio, não estando também sujeitas a contaminação aérea. Num estudo realizado por Falandysz et al., em 2001 [32] na espécie *Boletus edulis*, o chapéu continha as concentrações mais elevadas de cádmio, podendo conter 12 µg/g de matéria seca.

Segundo a legislação europeia, o teor máximo de cádmio permitido em cogumelos de cultura é de 0,20 mg/kg de peso fresco [61]. Considerando que na constituição dos cogumelos existe 88 a 92% de água, só duas espécies continham valores superiores ao permitido, sendo estas *Amanita muscaria* e *Lycoperdon perlatum*. A *Amanita muscaria* continha um teor médio no chapéu e no pé, aproximadamente de 0,46 e de 0,34 mg/kg de matéria fresca, respectivamente, e o *Lycoperdon perlatum* continha 0,52 mg/kg de matéria fresca. Embora estes valores sejam preocupantes, pode não se considerar um perigo para a saúde pública, dado que a *Amanita muscaria* é um cogumelo não edível, devido as suas propriedades alucinogénicas e o *Lycoperdon perlatum* é uma espécie edível de fraca qualidade.

4.2.2. CHUMBO

4.2.2.1. Teores de chumbo em cogumelos e solos

Os teores de chumbo encontrados em 37 amostras de cogumelos (Tabela 19) no chapéu e no pé variam entre $<0,014$ - $2,976$ e $<0,014$ - $3,264$ $\mu\text{g/g}$ de matéria seca, respectivamente.

Tabela 19 – Resultados obtidos para o chumbo em amostras de cogumelos e solos, bem como os factores de bioacumulação e a relação entre as concentrações encontradas no chapéu e pé.

	Concentração Chapéu ($\mu\text{g/g}$)	Concentração pé ($\mu\text{g/g}$)	Relação Chapéu/pé	Concentração Solo ($\mu\text{g/g}$)	BCF chapéu	BCF pé
Amostras n=37	$0,167 \pm 0,163^a$ med= 0,054 ($<0,014$ - $2,976$)	$0,2301 \pm 0,172^a$ med= 0,127 ($<0,014$ - $3,264$)	$0,43 \pm 0,19$ med= 0,00 (0,00- $2,58$)	$0,447 \pm 0,079$ med= 0,297 (0,197-0,997)	$0,00 \pm 0,52^e$ med= 0,10 (0,00-9,21)	$0,65 \pm 0,54^e$ med= 0,32 (0,00-10,10)
Beira Interior n=17	$0,315 \pm 0,344^b$ med= 0,083 ($<0,014$ - $2,976$)	$0,404 \pm 0,3612^b$ med= 0,248 (0,080- $3,264$)	$0,62 \pm 0,30$ med= 0,53 (0,00- $2,57$)	$0,518 \pm 0,071$ med= 0,568 (0,256-0,709)	$0,02 \pm 1,10$ med= 0,227 (0,00-9,21)	$1,10 \pm 1,16$ med= 0,44 (0,00-10,10)
Trás-os- Montes n=20	$0,041 \pm 0,030^c$ med= 0,00 ($<0,014$ -0,253)	$0,083 \pm 0,029^c$ med= 0,082 ($<0,014$ -0,182)	$0,27 \pm 0,22$ med= 0,00 (0,00-1,69)	$0,387 \pm 0,128$ med= 0,271 (0,197-0,997)	$0,00 \pm 0,10$ med= 0,00 (0,00-0,93)	$0,01 \pm 0,12$ med= 0,16 (0,00-0,92)
Saprófitas n=10	$0,110 \pm 0,049$ med= 0,122 ($<0,014$ -0,253)	$0,130 \pm 0,068$ med= 0,130 ($<0,014$ -0,318)	$0,87 \pm 0,50$ med= 0,73 (0,00- $2,57$)	$0,528 \pm 0,183$ med= 0,568 (0,197-0,997)	$0,03 \pm 0,17$ med= 0,18 (0,00-0,93)	$0,03 \pm 0,14$ med= 0,18 (0,00-0,56)
Micorrízicos n=27	$0,189 \pm 0,223^d$ med= 0,00 ($<0,014$ - $2,976$)	$0,267 \pm 0,235^d$ med= 0,098 ($<0,014$ - $3,264$)	$0,27 \pm 0,15$ med= 0,00 (0,00-1,22)	$0,417 \pm 0,083$ med= 0,297 (0,197-0,997)	$0,00 \pm 0,71^f$ med= 0,00 (0,00-9,21)	$0,79 \pm 0,74^f$ med= 0,37 (0,00-10,10)

(a,b,c,d, e, f – valores estatisticamente diferentes pelo paired t test)

Foi encontrada uma concentração média de chumbo nos cogumelos colhidos na Beira Interior de $0,167 \pm 0,163$ $\mu\text{g/g}$ nos chapéus e de $0,230 \pm 0,172$ $\mu\text{g/g}$ nos pés. Nas amostras de cogumelos colhidas em Trás-os-Montes, os valores médios obtidos foram inferiores, sendo nos chapéus e nos pés $0,041 \pm$

0,030 e $0,083 \pm 0,029$ $\mu\text{g/g}$, respectivamente. Mas estas diferenças entre os valores encontrados nas amostras da Beira Interior e de Trás-os-Montes não são significativas. O mesmo se passa com as amostras de solo de ambas as regiões. O teor de chumbo na Beira Interior é superior, $0,517 \pm 0,071$ $\mu\text{g/g}$ ao de Trás-os-Montes que é de $0,387 \pm 0,128$ $\mu\text{g/g}$, mas não existem diferenças significativas entre os valores.

Os resultados obtidos para o chumbo mostram que, ao contrário do cádmio, existe uma maior acumulação de chumbo nos pés do que nos chapéus. Tal diferença não ocorre nos cogumelos saprófitas, em que há uma distribuição uniforme do chumbo, sendo a concentração média nos chapéus e nos pés de $0,110 \pm 0,049$ e $0,130 \pm 0,068$ $\mu\text{g/g}$, respectivamente. Estes resultados estão concordantes com os encontrados para os BCF (Tabela 19), em que existe uma maior bioacumulação de chumbo nos pés do que nos chapéus, excepto para os saprófitas, em que a bioacumulação é uniforme. Resultados de estudos anteriores [29, 44] mostram que o chumbo acumula de um modo mais uniforme no cogumelo do que o cádmio e o mercúrio, devido às baixas concentrações encontradas nos solos. Só nos cogumelos saprófitas se verifica este resultado, tendo as espécies micorrízicas tendência a acumular em maior quantidade no pé.

A concentração de chumbo encontrada no solo foi superior à encontrada nos cogumelos. Uma possível explicação para este resultado pode consistir na grande afinidade que o chumbo tem para a matéria orgânica, devido à formação de complexos por troca catiónica, precipitados com carbonatos, sulfatos e hidróxidos [29, 44, 101] e por ser pouco móvel no solo [49], não sendo facilitado o seu acesso aos cogumelos.

Os valores obtidos no presente estudo estão de acordo com resultados já apresentados numa revisão [27], em que as concentrações de chumbo encontradas variaram entre 0,5 a 20 mg/kg de matéria seca, consoante a contaminação da área de colheita. Num estudo efectuado por Kalac et al., em 1996 [31] foi doseado o chumbo numa amostra de *Macrolepiota procera*, colhida na proximidade de uma mina de cobre, tendo-se encontrado 27,3 mg/kg de matéria seca, ultrapassando o limite estabelecido pela legislação de República Checa, de 10 mg/kg de matéria seca [31]. Os valores máximos obtidos de chumbo noutro estudo foram de 64,5 $\mu\text{g/g}$ numa amostra de *Coprinus*

disseminatus e 131 µg/g numa amostra de *Agaricus haemorrhoidarius*, colhida numa floresta da América Latina [39].

4.2.2.2. Influência da poluição na bioacumulação de chumbo pelos cogumelos

As amostras colhidas em locais situados nas proximidades de zonas com possível contaminação apresentavam concentrações de chumbo superiores que às colhidas em zonas mais rurais (nos chapéus dos cogumelos de zonas não contaminadas a concentração média é de $0,056 \pm 0,025$ µg/g e nos pés $0,121 \pm 0,035$ µg/g e nos cogumelos colhidos em locais supostamente contaminados a concentração média nos chapéus e nos pés é de $0,740 \pm 0,923$ e $0,792 \pm 0,995$ µg/g, respectivamente). Esta diferença não é estatisticamente significativa, o que pode dever-se ao facto das amostras colhidas em zonas não contaminadas ser muito superior às colhidas nas zonas supostamente contaminadas (Tabela 20), o que dificulta a análise estatística dos resultados.

Tabela 20 – Resultados obtidos de chumbo em cogumelos colhidos em locais supostamente contaminados e não contaminados, bem como os factores de bioacumulação nos diferentes constituintes do cogumelo e a relação entre as concentrações no chapéu e no pé.

	Concentração Chapéu (µg/ g)	Concentração pé (µg/ g)	Relação Chapéu/pé	Concentração Solo (µg/ g)	BCF chapéu	BCF pé
Amostras de áreas não contaminadas n=31	$0,056 \pm 0,025^a$ med= 0,00 (<0,014-0,253)	$0,121 \pm 0,035^a$ med= 0,097 (<0,014-0,326)	$0,52 \pm 0,18$ med= 0,45 (0,00-1,70)	$0,454 \pm 0,091$ med= 0,297 (0,197-0,997)	$0,00 \pm 0,07$ med= 0,05 (0,00-0,93)	$0,02 \pm 0,09$ med= 0,24 (0,00-0,92)
Amostras de áreas possivelmente contaminadas n=6	$0,741 \pm 0,923$ med=0,196 (<0,014-2,976)	$0,792 \pm 0,995$ med= 0,249 (0,076-3,264)	$0,97 \pm 0,71$ med= 0,76 (0,00-2,57)	$0,412 \pm 0,120$ med= 0,378 (0,256-0,590)	$0,12 \pm 2,94$ med= 0,39 (0,00-9,21)	$0,23 \pm 0,77$ med= 0,27 (0,02-2,54)

(a – valor estatisticamente diferente pelo paired t test)

As amostras que continham maiores teores de chumbo foram as de *Amanita ponderosa*, colhidas na proximidade da indústria de papel (2,976 µg/g no

chapéu e 3,264 µg/g no pé) e na proximidade da linha férrea, em que os teores doseados no chapéu e no pé foram 0,999 e 0,821 µg/g, respectivamente.

Nas amostras colhidas em zonas não contaminadas observou-se uma diferença significativa, entre os resultados encontrados nos chapéus e nos pés, enquanto que nas colhidas em áreas próximas de fontes de contaminação, o chumbo distribui-se de um modo uniforme (Tabela 20).

Na análise dos solos, não se verificou diferença nos teores de chumbo entre as áreas com diferentes graus de poluição, devido ao elevado número de amostras de zonas não contaminadas.

Nos factores de bioacumulação também não se encontraram diferenças significativas, entre as amostras colhidas com supostas diferenças nas contaminações. Embora os valores de BCF relativos às amostras contaminadas possuam valores mais elevados, estes não são estatisticamente diferentes. Embora não se tenha verificado a influência da poluição na acumulação de chumbo pelos cogumelos, num estudo efectuado por Garcia et al., em 1998 [29], em algumas espécies como a *Coprinus cromatus* (2,06 µg/g de chumbo no himenóforo e 2,79 nos restantes partes do cogumelo), colhidas em zonas com muito trânsito e no centro da cidade, foram encontradas quantidades superiores aos limites estabelecidos, (segundo a WHO/FAO o limite máximo por semana é de 0,025 mg/ kg de peso corporal). Este estudo concluiu que os cogumelos colhidos a distâncias inferiores a cinquenta metros das fontes de contaminação (estradas, auto-estradas e centro da cidade) não devem ser consumidos.

Noutro trabalho realizado em 2003 por investigadores checos, Svoboda e Kalac, foram estudados os cogumelos da região Ceske Budejovice, República Checa [43]. Para este estudo foram colhidos, entre 1999 – 2000, cogumelos das espécies *Agaricus arvensis*, *Agaricus bisporus*, *Agaricus maleolens* e do género *Macrolepiota* e *Lepista*. As amostras foram colhidas em várias zonas com diferentes tráfegos. Nestes cogumelos foi doseado chumbo por espectrofotometria de absorção atómica. Neste estudo, cinquenta por cento das amostras ultrapassaram os limites legislados [30]. Os limites destes metais permitidos na alimentação estão perfeitamente regulamentados na República Checa. Para o chumbo é de 10 mg/ kg de matéria seca.

Noutro estudo realizado por Carvalho et al., em 2005 [37] os cogumelos colhidos em zonas mais poluídas da cidade do Porto, como na proximidade de

auto-estradas, continham doses elevadas de chumbo (*Boletus badius* $18,3\pm0,8$ $\mu\text{g/g}$, *Tricholoma equestre* $19,5\pm0,9$ $\mu\text{g/g}$ e *Lepiota procera* 29 ± 2 $\mu\text{g/g}$). As amostras recolhidas perto da zona onde se realiza a incineração hospitalar, não estavam especialmente contaminadas por metais pesados atribuindo-se ao facto dos resíduos que são depositados no solo serem essencialmente orgânicos [37], como referido no estudo. Como exemplo, a espécie *Lepiota procera* colhida nas proximidades de auto-estradas, continha 29 μg de chumbo/g de matéria seca.

Tal como para o cádmio, estudou-se o efeito da contaminação numa só espécie (Tabela 21). Embora os valores encontrados de chumbo nas amostras contaminadas fossem superiores (sendo no chapéu e no pé das amostras supostamente contaminadas, respectivamente, $1,043\pm1,332$ e $1,137\pm1,421$ $\mu\text{g/g}$ e nas amostras não contaminadas, $0,038\pm0,043$ $\mu\text{g/g}$ nos chapéus e de $0,082\pm0,063$ $\mu\text{g/g}$ nos pés) esta diferença não é significativa. Também não se encontraram diferenças nos teores de chumbo presentes nos solos supostamente contaminados e não.

Tabela 21 – Valores encontrados nas amostras de *Amanita ponderosa*, em zonas não e contaminadas e também as concentrações nos solos e valores encontrados para os factores de bioacumulação.

	Concentração Chapéu ($\mu\text{g/g}$)	Concentração pé ($\mu\text{g/g}$)	Relação Chapéu/pé	Concentração Solo ($\mu\text{g/g}$)	BCF chapéu	BCF pé
Não contaminados n=4	$0,038\pm0,043$ med= 0,035 ($<0,014$ -0,083)	$0,082\pm0,063$ med= 0,085 ($<0,014$ -0,157)	$0,60\pm0,46$ med= 0,69 (0,00-1,00)	$0,587\pm0,213$ med= 0,668 (0,262-0,709)	$0,00\pm0,15$ med= 0,05 (0,00-0,32)	$0,01\pm0,14$ med= 0,18 (0,00-0,34)
Contaminados n=4	$1,043\pm1,332$ med= 0,598 ($<0,014$ -2,976)	$1,137\pm1,421$ med= 0,597 (0,090-3,264)	$0,67\pm0,51$ med= 0,72 (0,00-1,22)	$0,323\pm0,076$ med= 0,303 (0,256-0,432)	$0,09\pm4,17$ med=2,18 (0,00-9,21)	$1,73\pm4,41$ med= 2,04 (0,32-10,10)

O mesmo ocorre com os factores de bioacumulação, apesar de serem mais elevados nas amostras contaminadas, sendo no chapéu e no pé $0,09\pm4,17$ e $1,73\pm4,41$, respectivamente, não se encontraram diferenças significativas.

4.2.2.3. Diferenças entre algumas espécies de cogumelos na bioacumulação de chumbo

No presente estudo, comparou-se em diferentes espécies de cogumelos os teores de chumbo nas partes do cogumelo, chapéu e pé, bem como a sua bioacumulação (Tabela 22).

Tabela 22 – Concentrações obtidas de chumbo nos chapéus e pés de diferentes espécies, bem como a sua relação e os factores de bioacumulação.

	Concentração Chapéu (µg/g)	Concentração pé (µg/g)	Relação Chapéu/pé	BCF chapéu	BCF pé
<i>Agaricus sylvicola</i> n=2	0,133±0,008 ^a med= 0,133 (0,129-0,137)	0,310±0,016 ^a med= 0,310 (0,302-0,319)	0,43±0,05 med= 0,43 (0,40-0,45)	0,23±0,01 med= 0,23 (0,23-0,24)	0,55±0,03 med= 0,55 (0,53-0,56)
<i>Amanita muscaria</i> n=2	0,091±0,072 med= 0,091 (0,054-0,127)	0,087±0,171 med=0,087 (<0,014-0,174)	2,28±3,05 med= 2,28 (0,73-3,84)	0,28±0,24 med= 0,31 (0,18-0,43)	0,00±0,58 med=0,29 (0,00-0,59)
<i>Amanita ponderosa</i> n=4	0,038±0,043 med= 0,035 (<0,014-0,083)	0,082±0,063 med= 0,085 (<0,014-0,157)	0,00±0,15 med= 0,05 (0,00-0,32)	0,01±0,14 med= 0,18 (0,00-0,34)	0,60±0,46 med= 0,69 (0,00-1,00)
<i>Boletus regius</i> n=3	0,147±0,092 med= 0,190 (0,053-0,198)	0,280±0,046 med= 0,266 (0,248-0,326)	0,22±0,16 med= 0,33 (0,10-0,35)	0,49±0,08 med= 0,47 (0,44-0,57)	0,51±0,30 med= 0,61 (0,22-0,71)
<i>Lactarius deliciosus</i> n= 4	0,021±0,041 med= 0,00 (<0,014-0,083)	0,062±0,042 med= 0,075 (<0,014-0,098)	0,00±0,15 med= 0,00 (0,00-0,30)	0,01±0,16 med= 0,10 (0,00-0,37)	1,46±2,86 med= 0,00 (0,00-5,83)
<i>Lactarius perlatus</i> n=4	0,030±0,009* med= 0,028 (0,023-0,043)			0,11 ± 0,03* med= 0,11 (0,08-0,14)	
<i>Macrolepiota procera</i> n=4	0,141±0,079 med= 0,124 (0,064-0,253)	0,120±0,044 med= 0,139 (0,053-0,149)	0,25±0,38 med= 0,21 (0,12-0,93)	0,22±0,19 med= 0,19 (0,13-0,55)	1,17±0,37 med= 1,06 (0,87-1,69)
<i>Tricholoma acerbum</i> n=4	0,00±0,00 med= 0,00 (<0,014)	0,095±0,068 med= 0,117 (<0,014-0,148)	0,00±0,00 med= 0,00 (0,00-0,00)	0,03±0,24 med= 0,47 (0,00-0,50)	0,25±0,49 med= 0,00 (0,00-1,00)
<i>Volvariella gloiocephala</i> n=2	0,136±0,117 med= 0,136 (0,076-0,195)	0,101±0,049 med= 0,101 (0,076-0,127)	0,21±0,20 med= 0,23 (0,13-0,33)	0,17±0,08 med= 0,17 (0,13-0,21)	1,58±1,93 med= 1,58 (0,60-2,57)

(a – valor com diferenças significativas estatisticamente pelo paired t test) *- os cogumelos foram analisados inteiros.

Não se registaram diferenças significativas entre as espécies, mas verificou-se que as espécies que continham valores mais elevados eram principalmente saprófitas, como a *Agaricus sylvicola*, *Macrolepiota procera* e *Volvariella gloiocephala*.

Outros autores [27, 29] verificaram que as espécies saprófitas acumulavam mais chumbo que as espécies micorrízicas, devido à sua grande actividade enzimática e decompositora. Numa revisão de Kalac e Svoboda de 2000 [27], é referido o *Lycoperdon perlatum*, *Macrolepiota rhacodes* e *Lepista nuda* como espécies que acumulam muito chumbo. Num estudo efectuado por Garcia et al., em 1998 [29], verificou-se que a espécie *Macrolepiota procera* era uma das que mais bioacumulava chumbo (2,05 µg/g no himenófero e 0,92 µg/g nas restantes partes do cogumelo), o que também se verifica neste estudo, embora em concentrações diferentes. Os cogumelos da espécie *Agaricus sylvicola* foram os únicos que demonstraram diferenças entre os teores doseados no chapéu e no pé, sendo no pé onde se encontrava a maior concentração.

A legislação europeia permite um teor máximo de chumbo nos cogumelos cultivados de 0,20 mg/kg de matéria fresca [61]. Das amostras colhidas em locais distantes de zonas poluídas, não se encontrou nenhuma espécie que ultrapassasse esse limite. A única amostra que excedeu esse valor foi uma amostra de *Amanita ponderosa* colhida nas proximidades da indústria de papel, cujos valores no chapéu e no pé foram aproximadamente de 0,30 e 0,33 mg/kg de matéria fresca, respectivamente.

4.2.3. CRÓMIO

4.2.3.1. CRÓMIO TOTAL

4.2.3.1.1 Teores de crómio total em cogumelos e solos

Para avaliação do crómio total nos cogumelos, analisaram-se 34 amostras cujas concentrações e valores de BCF são apresentados na Tabela 23. Os teores deste elemento nos cogumelos variaram entre $1,14 \pm 1,03$ e $1,11 \pm 0,55$ $\mu\text{g/g}$ nos chapéus e nos pés, respectivamente, e os seus factores de bioacumulação foram $0,008 \pm 0,031$ e $0,012 \pm 0,022$ para o chapéu e para o pé. Não se verificou diferenças nem na concentração nem na bioacumulação de crómio entre as partes dos cogumelos, chapéu e pé. Este resultado também é visível na relação entre a concentração encontrada no chapéu e no pé, em que a maioria dos valores se aproxima de 1.

Outros autores em estudos anteriores quantificaram o crómio total em cogumelos, com máximo e mínimo de 0,2 e 2,0 $\mu\text{g/g}$ [45], 0,8 e 7,52 $\mu\text{g/g}$ [40] e 0,0 e 56 $\mu\text{g/g}$ [39]. Nos vários estudos encontra-se uma grande variabilidade nas concentrações de crómio total, visto que existem vários factores que contribuem para a absorção deste metal pelo cogumelo, nomeadamente, a concentração deste no solo, a espécie do cogumelo, a constituição geológica e pH do solo.

Na comparação dos valores de crómio das amostras de cogumelos da Beira Interior com as de Trás-os-Montes, não se verificaram diferenças, apresentando as amostras da primeira região as concentrações $1,30 \pm 1,94$ e $0,83 \pm 0,66$ $\mu\text{g/g}$, nos chapéus e nos pés, respectivamente, e as de Trás-os-Montes, $1,02 \pm 1,24$ e $1,33 \pm 0,90$ $\mu\text{g/g}$, nos chapéus e nos pés respectivamente. No entanto, nas amostras de solos, verificou-se uma diferença significativa, sendo os solos de Trás-os-Montes mais ricos em crómio total, sendo esta concentração de $126,3 \pm 53,8$ $\mu\text{g/g}$ e na Beira Interior de $30,4 \pm 15,6$ $\mu\text{g/g}$. (Tabela 23). Esta diferença é explicável com base na constituição geológica dos solos de Trás-os-Montes que são de natureza serpentínica e são ricos em cromita [102]. Estes solos podem

conter concentrações de crómio que variam entre 634 e 125 000 mg/kg [102]. Na comparação destas duas regiões também não se encontraram diferenças nos factores de bioacumulação.

Tabela 23 – Concentrações de crómio total em cogumelos e solos, factores de bioacumulação e relação entre as concentrações encontradas nos chapéus e pés.

	Concentração Chapéu ($\mu\text{g/g}$)	Concentração Pé ($\mu\text{g/g}$)	Relação chapéu/pé	Concentração Solo ($\mu\text{g/g}$)	BCF Chapéu	BCF Pé
Amostras n=34	1,14 $\pm$ 1,03 med= 0,30 (0,02-13,84)	1,11 $\pm$ 0,55 med= 0,41 (0,04-6,50)	0,99 $\pm$ 0,45 med= 0,73 (0,02-7,00)	84,0 $\pm$ 34,5 med= 71,8 (5,8-343,0)	0,008 $\pm$ 0,031 med= 0,006 (0,001-0,377)	0,012 $\pm$ 0,022 med= 0,009 (0,001-0,299)
Beira Interior n=15	1,30 $\pm$ 1,94 med= 0,27 (0,09- 13,84)	0,83 $\pm$ 0,66 med= 0,35 (0,13-4,57)	1,17 $\pm$ 1,02 med= 0,65 (0,02-7,00)	30,4 $\pm$ 15,6 ^b med= 15,3 (5,8-87,5)	0,019 $\pm$ 0,070 med= 0,020 (0,001-0,38)	0,024 $\pm$ 0,046 med= 0,030 (0,001-0,299)
Trás-os- Montes n=19	1,02 $\pm$ 1,24 med= 0,34 (0,02-11,54)	1,33 $\pm$ 0,90 med= 0,53 (0,04-6,50)	0,86 $\pm$ 0,36 med= 0,75 (0,05-3,33)	126,3 $\pm$ 53,8 ^b med = 71,8 (6,8-343,0)	0,004 $\pm$ 0,004 med= 0,004 (0,001-0,034)	0,007 $\pm$ 0,010 med= 0,006 (0,001-0,066)
Saprófitas n=9	0,20 $\pm$ 0,16 ^a med= 0,15 (0,02-0,70)	0,59 $\pm$ 0,56 med= 0,27 (0,04-2,31)	0,54 $\pm$ 0,23 med= 0,57 (0,18-0,95)	51,7 $\pm$ 35,4 med= 15,3 (6,1-144,0)	0,005 $\pm$ 0,008 med= 0,005 (0,001-0,028)	0,012 $\pm$ 0,052 med= 0,01 0,001-0,169
Micorrízicos n=25	1,49 $\pm$ 1,41 ^a med= 0,45 (0,08-13,84)	1,30 $\pm$ 0,73 med= 0,53 (0,11-6,50)	1,16 $\pm$ 0,61 med= 0,78 (0,02-7,00)	95,7 $\pm$ 44,7 med= 71,8 (5,8-343,0)	0,009 $\pm$ 0,042 med= 0,007 (0,01-0,377)	0,012 $\pm$ 0,025 med= 0,010 (0,001-0,299)

(a, b – valores com diferenças significativas estaticamente pelo paired t test)

Neste estudo verificou-se uma diferença significativa entre as concentrações encontradas nos chapéus das espécies saprófitas e micorrízicas (0,20 $\pm$ 0,16 e 1,49 $\pm$ 1,41 $\mu\text{g/g}$, respectivamente), sendo estas últimas as que possuem valores superiores e o mesmo acontece nos pés, apesar desta diferença não ser significativa (Tabela 23). No entanto, ao comparar-se os factores de bioacumulação, não se encontraram diferenças entre as partes analisadas dos cogumelos, nem entre as espécies saprófitas e micorrízicas. Num estudo efectuado por Michelot et al., em 1998 [40], verificou-se que espécies micorrízicas que crescem em área florestal, como as pertencentes aos géneros *Boletales*, *Aphyllophorales*, *Auriculariales*, *Lycoperdales*, *Sclerodermales* e *Tremallales*, tinham uma maior tendência para acumular metais como o crómio, embora o

acumulação dos metais seja dependente de outros factores, como a espécie, o pH do solo, a constituição geológica deste e a contaminação ambiental.

4.2.3.1.2. Influência da poluição na bioacumulação de crómio total pelos cogumelos

As amostras colhidas junto a locais passíveis de alguma contaminação apresentavam concentrações superiores de crómio relativamente às não contaminadas (nos chapéus dos cogumelos de zonas não contaminadas a concentração média é de $0,85 \pm 0,80 \mu\text{g/g}$ e nos pés $1,25 \pm 0,64 \mu\text{g/g}$, enquanto que nos cogumelos de zonas contaminadas a concentração média nos chapéus e nos pés é de $2,55 \pm 4,43$ e $0,45 \pm 0,27 \mu\text{g/g}$, respectivamente), mas esta diferença não é estatisticamente significativa. Também não se encontraram diferenças entre os factores de bioacumulação, dado que os valores obtidos para ambos os grupos são muito semelhantes (Tabela 24), e com estes resultados não se verifica uma relação entre a hipotética poluição e a concentração de crómio presente nos cogumelos.

Tabela 24 – Resultados de crómio total em cogumelos colhidos em locais supostamente contaminados e não contaminados, bem como os valores encontrados para o factor de bioacumulação e a relação entre as concentrações no chapéu e no pé.

	Concentração Chapéu ($\mu\text{g/g}$)	Concentração pé ($\mu\text{g/g}$)	Relação Chapéu/pé	Concentração Solo ($\mu\text{g/g}$)	BCF chapéu	BCF pé
Amostras de áreas não contaminadas n=28	$0,85 \pm 0,80$ med= 0,30 (0,02-11,54)	$1,25 \pm 0,64$ med= 0,41 (0,04 -6,50)	$1,04 \pm 0,50$ med= 0,74 (0,02-7,00)	$94,26 \pm 40,65$ med= 71,80 (5,75 -343,00)	$0,01 \pm 0,03$ med= 0,01 (0,00-0,38)	$0,01 \pm 0,02$ med= 0,01 (0,00-0,30)
Amostras de áreas com possível contaminação n=6	$2,55 \pm 4,43$ med= 0,26 (0,12-13,84)	$0,45 \pm 0,27$ med= 0,40 (0,13-1,03)	$15,02 \pm 28,02$ med= 0,83 (0,12-86,50)	$36,22 \pm 29,20$ med= 22,20 (6,10-87,50)	$0,02 \pm 0,11$ med= 0,02 (0,00-0,37)	$0,02 \pm 0,05$ med= 0,03 (0,00-0,17)

Num estudo anterior de Barcan et al., em 1998 [45] também não se verificou relação entre as concentrações de crómio nos cogumelos e a contaminação ambiental, como se pode confirmar na espécie *Suillus luteus*, que independentemente da distância à fundição de níquel e cobre, continha sempre o mesmo valor de crómio, 0,4 µg/g matéria seca.

Os BCF obtidos são inferiores a 1 e, como tal, não se pode considerar os cogumelos como bioindicadores de contaminação de crómio total [38].

Na análise de contaminação na *Amanita ponderosa*, verificou-se que embora as amostras provenientes de áreas supostamente contaminadas possuam uma concentração de crómio total superior no chapéu e no pé do que as não contaminadas, estas diferenças não são estatisticamente significativas (Tabela 25). No que respeita aos factores de bioacumulação, também não se verifica nenhuma diferença, tanto nas diferentes partes do cogumelo, como entre as amostras colhidas em locais junto de possíveis fontes de contaminação e distantes destas.

Tabela 25 – Valores de crómio total nas amostras de *Amanita ponderosa*, e nos solos, em zonas não e contaminadas, factor de bioacumulação nas difrentes partes do cogumelo e a relação entre as concentrações no chapéu e no pé.

	Concentração Chapéu (µg/ g)	Concentração pé (µg/ g)	Relação Chapéu/pé	Concentração Solo (µg/ g)	BCF chapéu	BCF pé
Amostras de áreas não contaminadas n=4	0,68± 0,98 med= 0,23 (0,09-2,17)	0,20±0,08 med= 0,19 (0,13-0,31)	2,69±1,00 med = 0,64 (0,14-2,44)	40,65±39,49 med= 40,43 (5,75-76,00)	0,02±0,18 med= 0,02 (0,00- 0,38)	0,01±0,02 med= 0,01 (0,00- 0,05)
Amostras de áreas possivelmente contaminadas n=4	3,75±6,60 med= 0,51 (0,13-13,84)	0,35±0,23 med= 0,35 (0,13-0,56)	22,34±41,92 med= 1,10 (0,66-86,50)	51,28±35,51 med= 55,25 (7,10-87,50)	0,02±0,17 med= 0,05 (0,00- 0,37)	0,01 ±0,04 med= 0,01 (0,00- 0,08)

4.2.3.1.3. Diferenças entre algumas espécies de cogumelos na bioacumulação de crómio total

Neste estudo compararam-se algumas espécies em relação à concentração de crómio total presente nos chapéus, pés, a relação entre estes e os respectivos factores de bioacumulação (Tabela 26).

Tabela 26 – Concentrações de crómio total, nos chapéus e pés de diferentes espécies de cogumelos, bem como a sua relação e os factores de bioacumulação.

	Concentração chapéu (µg/g)	Concentração pé (µg/g)	Relação Chapéu/pé	BCF chapéu	BCF pé
<i>Amanita ponderosa</i> n= 4	0,68± 0,98 med= 0,23 (0,09-2,17)	0,20± 0,08 med = 0,19 (0,13-0,31)	2,69± 1,00 med = 0,64 (0,14- 2,44)	0,02±0,18 med = 0,02 (0,00-0,38)	0,01±0,02 med = 0,01 (0,00-0,05)
<i>Boletus regius</i> n= 3	0,39± 0,21 med= 0,45 (0,18- 0,53)	0,71± 0,60 med= 0,46 (0,35-1,32)	0,63± 0,35 med= 0,51 (0,40-0,98)	0,02± 0,01 med= 0,03 (0,01- 0,04)	0,04± 0,04 med= 0,03 (0,02- 0,09)
<i>Lactarius delicious</i> n= 4	0,36± 0,45 med= 0,16 (0,08-1,04)	0,36±0,37 med= 0,21 (0,11-0,91)	0,84±0,20 med= 0,76 (0,69-1,14)	0,00±0,01 med= 0,00 (0,00-0,01)	0,00±0,01 med= 0,00 (0,00-0,02)
<i>Lactarius perlatum</i> n= 4	0,47±0,25* med= 0,45 (0,19-0,80)			0,00±0,00* med= 0,01 (0,00-0,01)	
<i>Macrolepiota procera</i> n= 4	0,09±0,08 med= 0,07 (0,02-0,20)	0,13±0,08 med= 0,14 (0,04-0,21)	0,67±0,23 med= 0,66 (0,42-0,95)	0,00±0,00 med= 0,00 (0,00-0,01)	0,00±0,00 med= 0,00 (0,00-0,01)
<i>Tricholoma acerbum</i> n= 4	3,70±5,13 med= 1,23 (0,79-11,54)	3,14±1,64 med= 3,71 (0,71-4,44)	1,26±1,41 med= 0,73 (0,25-3,34)	0,01±0,01 med= 0,02 (0,00-0,03)	0,03±0,03 med= 0,03 (0,00-0,06)
<i>Volvariella gloiacephala</i> n=2	0,15±0,05 med= 0,15 (0,12-0,17)	0,65±0,75 med= 0,65 (0,27-1,03)	0,37±0,50 med= 0,37 (0,12-0,63)	0,02±0,01 med= 0,02 (0,02-0,03)	0,08±0,12 med= 0,11 (0,04-0,17)

*- os cogumelos foram analisados inteiros

Embora não existam diferenças significativas entre as concentrações existentes nos diferentes constituintes dos cogumelos, chapéus e pés, intra-espécies e inter-espécies, verificou-se que algumas espécies micorrízicas continham um valor médio superior de crómio, nomeadamente, a *Tricholoma*

acerbum a que continha valores superiores, cuja concentração no chapéu e no pé foi de $3,70 \pm 5,13$ e $3,14 \pm 1,64$ $\mu\text{g/g}$, respectivamente. Numa revisão de Kalac e Svoboda de 2000 [27], são referidas *Agaricus spp.*, *Macrolepiota procera* e *Lactarius deliciosus*, como as espécies que consideram bioacumuladoras de crómio, podendo conter 0,1 a 2 mg/kg de matéria seca, não sendo considerados o seu consumo como um risco para a saúde pública. Os valores de *Tricholoma acerbum* obtidos no presente trabalho ultrapassam os valores citados da revisão referida.

4.2.3.2. CRÓMIO HEXAVALENTE

4.2.3.2.1. Teores de crómio hexavalente em cogumelos e solo

Os teores encontrados de crómio hexavalente em 34 amostras de cogumelos, nos chapéus e nos pés, variaram entre $<0,0085$ - $0,580$ e $<0,0085$ - $0,81\mu\text{g/g}$, respectivamente, sendo nos pés onde se encontrou a concentração maior (Tabela 27). Nos cogumelos colhidos na Beira Interior foi encontrada uma concentração média de crómio hexavalente de $0,058\pm 0,023\mu\text{g/g}$ nos chapéus e de $0,075\pm 0,042\mu\text{g/g}$ nos pés. Nas amostras de cogumelos colhidas em Trás-os-Montes, os valores obtidos foram superiores, sendo nos chapéus e nos pés $0,139\pm 0,078$ e $0,197\pm 0,103\mu\text{g/g}$, respectivamente. Mas estas diferenças entre os valores colhidos em ambas as regiões só são significativas nos pés.

O mesmo se passa com as amostras de solo de ambas as regiões. O teor de crómio hexavalente na Beira Interior é inferior, $0,307\pm 0,080\mu\text{g/g}$ enquanto que em Trás-os-Montes é de $0,623\pm 0,284\mu\text{g/g}$, sendo a diferença significativa. Uma possível explicação para este resultado reside na constituição geológica de Trás-os-Montes, que tem grandes quantidades de cromita, um mineral rico em crómio. Nas amostras de Trás-os-Montes verificou-se que existe uma maior concentração desta espécie de crómio nos pés que nos chapéus, mas não se traduz nos factores de bioacumulação, em que não existem diferenças entre os valores obtidos nas duas partes.

Também não se encontraram diferenças entre as espécies saprófitas e micorrízicas. No que respeita aos teores de crómio hexavalente, nas amostras saprófitas verificou-se uma maior concentração e uma maior capacidade de acumulação nos pés, visto estes revelarem um maior factor de bioacumulação que o encontrado nos chapéus. Nos cogumelos micorrízicos existe uma distribuição uniforme do crómio hexavalente.

Para todas as amostras de cogumelos analisadas, a percentagem de crómio hexavalente em relação ao crómio total era, em valores médios, 9,0% e

12,9%, para o chapéu e pé, respectivamente. Esta percentagem nos solos era de 0,57%. A elevada concentração de crómio total nos solos com a baixa percentagem de crómio hexavalente e a concentração deste último encontrada tanto no chapéu como no pé, permite concluir que os cogumelos acumulam crómio hexavalente em maior extensão, o que está em concordância com a biodisponibilidade de crómio hexavalente nos solos [47].

Tabela 27 – Concentrações de crómio hexavalente em cogumelos e solos, factores de bioacumulação de crómio hexavalente obtidos e relação entre as concentrações encontradas nos chapéus e pés.

	Concentração Chapéu ($\mu\text{g/g}$)	Concentração Pé ($\mu\text{g/g}$)	Relação chapéu/pé	Concentração Solo ($\mu\text{g/g}$)	BCF Chapéu	BCF Pé
Amostras n=34	0,103 $\pm$ 0,045 ^a med= 0,058 (<0,0085- 0,580)	0,143 $\pm$ 0,061 ^a med= 0,088 (<0,0085- 0,81)	0,97 $\pm$ 0,22 med= 0,87 (0,00-2,32)	0,483 $\pm$ 0,170 med= 0,286 (0,069-1,785)	0,142 $\pm$ 0,119 med= 0,171 (0,000- 1,696)	0,126 $\pm$ 0,178 med= 0,231 (0,000- 2,367)
Beira Interior n=15	0,058 $\pm$ 0,023 med= 0,049 (0,0196-0,179)	0,075 $\pm$ 0,042 ^d med= 0,048 (0,009-0,304)	1,26 $\pm$ 0,39 med= 1,28 (0,18-2,32)	0,307 $\pm$ 0,080 med= 0,262 (0,069-0,679)	0,187 $\pm$ 0,152 med= 0,190 (0,030- 0,990)	0,184 $\pm$ 0,273 med= 0,184 (0,010- 1,390)
Trás-os- Montes n=19	0,139 $\pm$ 0,078 ^b med= 0,065 (<0,0085- 0,580)	0,197 $\pm$ 0,103 ^{bd} med= 0,143 (<0,0085- 0,812)	0,74 $\pm$ 0,24 med= 0,71 (0,00-2,08)	0,623 $\pm$ 0,284 med= 0,342 (0,086-1,785)	0,115 $\pm$ 0,186 med= 0,155 (0,000- 1,696)	0,093 $\pm$ 0,256 med= 0,240 (0,000- 2,380)
Saprófitas n=9	0,105 $\pm$ 0,138 ^c med= 0,056 (<0,0085- 0,580)	0,178 $\pm$ 0,195 ^c med= 0,096 (<0,0085- 0,813)	0,52 $\pm$ 0,22 med= 0,65 (0,00-0,91)	0,266 $\pm$ 0,134 med= 0,257 (0,069-0,638)	0,091 $\pm$ 0,370 ^e med= 0,115 (0,000- 1,696)	0,162 $\pm$ 0,532 ^e med= 0,380 (0,000- 2,380)
Micorrízicos n=25	0,103 $\pm$ 0,045 med= 0,060 (0,019-0,497)	0,130 $\pm$ 0,059 med= 0,082 (<0,0085- 0,471)	1,13 $\pm$ 0,27 med= 1,08 (0,00-2,32)	0,562 $\pm$ 0,219 med= 0,286 (0,086-1,785)	0,167 $\pm$ 0,097 med= 0,186 (0,027- 1,000)	0,115 $\pm$ 0,116 med= 0,190 (0,000- 1,310)

(a, b, c, d, e – valores com diferenças estatísticas pelo paired t test)

4.2.3.2.2. Influência da poluição na bioacumulação de crómio hexavalente pelos cogumelos

As amostras colhidas em locais não contaminados apresentavam concentrações superiores de crómio hexavalente às colhidas em zonas próximas de supostas fontes de contaminação (nos chapéus dos cogumelos colhidos em zonas não contaminadas a concentração média foi de $0,108 \pm 0,052 \mu\text{g/g}$ e nos pés $0,164 \pm 0,069 \mu\text{g/g}$, enquanto que nos cogumelos colhidos em locais supostamente contaminados a concentração média nos chapéus e nos pés é de $0,081 \pm 0,042$ e $0,043 \pm 0,032 \mu\text{g/g}$, respectivamente) (Tabela 28), mas estas diferenças não são estatisticamente significativas, visto que a quantidade de amostras colhidas em zonas não contaminadas era muito superior. Às colhidas perto de supostas fontes de contaminação.

Nas amostras colhidas em zonas não contaminadas, o crómio hexavalente distribui-se de um modo desigual no cogumelo, sendo este elemento acumulado em maior quantidade nos pés, tendo este um factor de bioacumulação de valor superior, sendo o BCF nos chapéus e nos pés de $0,122 \pm 0,129$ e $0,129 \pm 0,186$, respectivamente.

Os cogumelos não são bons bioindicadores de contaminação de crómio hexavalente porque não se encontraram diferenças significativas entre os factores de bioacumulação obtidos nas amostras de zonas supostamente contaminadas e não, sendo os valores obtidos inferiores a 1.

Na comparação das concentrações de crómio hexavalente dos solos também não se encontraram diferenças, embora os solos dos locais não contaminados contenham um valor superior (Tabela 28). Isto deve-se ao facto de que a maioria das amostras de solos não contaminados é proveniente da região de Trás-os-Montes, que tem um valor mais elevado de crómio hexavalente, visto ser rico em cromita.

Vários trabalhos realizados anteriormente estudaram as reacções químicas do crómio no solo, bem como a sua acumulação pelas plantas. As reacções que podem ocorrer com o crómio no solo são hidrólises, oxidações, reduções e precipitações [70]. O Cr(VI) no ambiente pode ser reduzido a Cr(III), sendo esta

reação induzida por agentes inorgânicos, orgânicos e microorganismos [71, 72]. A solubilidade do Cr(III) e mobilidade no solo pode ser aumentada, quando este elemento forma complexos com ácidos orgânicos, exsudados pelas raízes, e que reagem fortemente com os iões metálicos [71, 72]. O Cr (III) é fortemente retido pelas partículas do solo, enquanto que o Cr(VI) é fracamente adsorvido, ficando disponível para a absorção pelas plantas. Neste estudo verifica-se que os BCF para o crómio hexavalente são superiores aos encontrados para o crómio total.

Tabela 28 – Conteúdos de crómio hexavalente em cogumelos colhidos em zonas supostamente contaminadas e não contaminadas, o factor de bioacumulação, a relação entre as concentrações no chapéu e no pé e pH dos solos.

	Concentração Chapéu ($\mu\text{g/g}$)	Concentração pé ($\mu\text{g/g}$)	Relação Chapéu/pé	Concentração Solo ($\mu\text{g/g}$)	BCF chapéu	BCF pé
Amostras de áreas não contaminadas n=28	0,108 $\pm$ 0,052 ^a med=0,058 (0,000-0,580)	0,164 $\pm$ 0,069 ^a med= 0,102 (0,000-0,813)	0,994 $\pm$ 0,493 med= 0,709 (0,00-7,346)	0,512, $\pm$ 0,200 med= 0,286 (0,086- 1,785)	0,122 $\pm$ 0,129 ^b med= 0,155 (0,00-1,696)	0,129 $\pm$ 0,186 ^b med= 0,247 (0,00-2,376)
Amostras de áreas possivelmente contaminadas n=6	0,081 $\pm$ 0,042 med=0,059 (0,043-0,178)	0,043 $\pm$ 0,032 med= 0,024 (0,009-0,095)	4,151 $\pm$ 3,049 med= 3,856 (0,464-10,904)	0,348 $\pm$ 0,202 med= 0,346 (0,069-0,679)	0,287 $\pm$ 0,285 med= 0,321 (0,087-0,986)	0,113 $\pm$ 0,552 med= 0,068 (0,014-1,388)

(a, b– valor com diferença significativa pelo paired t test)

Num trabalho efectuado por Bolan et al., em 2003 [47] pretendeu-se estudar o efeito de aditivos orgânicos na redução e na fitodisponibilidade do cromato em solos minerais. Os solos onde se semearam “mostarda da Índia”, foram incubados durante 4 semanas em diversos compostos biosólidos, como estrumes provenientes de aves, cavalos, peixes e porcos, a que foram adicionadas várias concentrações de Cr(VI) (0-1200 mg/kg de solo). Ao adicionarem-se os aditivos ao solo, aumentou a adsorção do Cr(III) por este, o que foi atribuído a um aumento na capacidade de troca catiónica pela matéria orgânica. Também aumentaram as reduções do Cr(VI), devido ao aumento de microorganismos. Neste estudo verificou-se que em concentrações elevadas de Cr(VI), as plantas não cresceram e nas concentrações mais baixas, houve um atraso no crescimento. O crescimento da planta também diminuiu com o aumento

da concentração de Cr(VI), e quanto maior a concentração de Cr(VI) adicionada ao solo, maior a concentração de crómio nos tecidos das plantas.

Quando se compararam diferentes amostras de *Amanita ponderosa* colhidas em zonas próximas de fontes de contaminação e não, também não se encontraram diferenças nos valores obtidos (Tabela 29). O crómio hexavalente distribui-se de um modo igual por todo o cogumelo, também não existindo diferenças nos BCF de ambas as partes. Nos solos colhidos nas áreas supostamente contaminadas notou-se uma concentração superior aos das áreas não contaminadas, sendo estas $0,488\pm0,166$ e $0,306\pm0,050$ $\mu\text{g/g}$, respectivamente, mas esta diferença não é significativa.

Tabela 29 – Valores de crómio hexavalente nas amostras de *Amanita ponderosa*, e nos solos, em zonas não contaminadas e supostamente contaminadas, a relação entre as concentrações no chapéu e no pé e o factor de bioacumulação.

	Concentração Chapéu ($\mu\text{g/g}$)	Concentração pé ($\mu\text{g/g}$)	Relação Chapéu/pé	Concentração Solo ($\mu\text{g/g}$)	BCF chapéu	BCF pé
Amostras de áreas não contaminadas n=4	$0,034\pm0,025$ med=0,021 (0,020-0,072)	$0,064\pm0,036$ med=0,061 (0,028-0,106)	$0,51\pm0,28$ med=0,61 (0,21-0,88)	$0,306\pm0,050$ med=0,305 (0,262-0,352)	$0,27\pm0,26$ med=0,27 (0,13-0,69)	$0,18\pm0,15$ med=0,21 (0,08-0,40)
Amostras de áreas possivelmente contaminadas n=4	$0,095\pm0,061$ med=0,077 (0,045-0,180)	$0,017\pm0,012$ med=0,013 (0,009-0,035)	$5,933\pm3,321$ med=4,724 (3,381-10,904)	$0,488\pm0,166$ med=0,474 (0,326-0,679)	$0,173\pm0,181$ med=0,145 (0,087-0,490)	$0,032\pm0,037$ med=0,031 (0,014-0,096)

4.2.3.2.3. Diferenças entre algumas espécies de cogumelos na bioacumulação de crómio hexavalente

Ao comparar-se as diferentes espécies no que respeita aos teores de crómio hexavalente, não se obteve diferenças entre as concentrações obtidas nos chapéus e nos pés. Mesmo sem diferenças realça-se que alguns cogumelos micorrízicos, como *Lactarius delicious* e *Tricholoma acerbum* e a espécie saprófita *Lycoperdon perlatum* continham as concentrações mais elevadas (Tabela 30). No

entanto, verificou-se que a espécie saprófita *Volvariella gloiacephala*, é a que tinha a maior capacidade de bioacumular o crómio hexavalente em relação às restantes espécies, tendo estes resultados diferenças significativas. Como não foram encontrados outros trabalhos de contaminação por crómio hexavalente em cogumelos, estes resultados não podem ser comparados.

Tabela 30 – Concentrações de crómio hexavalente nos chapéus e pés em diferentes espécies, bem como a sua relação e os BCF.

	Concentração chapéu (µg/g)	Concentração pé (µg/g)	Relação Chapéu/pé	BCF chapéu	BCF pé
<i>Amanita ponderosa</i> n= 4	0,034±0,0 25 med =0,0 21 (0,020-0,072)	0,064±0,0 36 med =0,061 (0,028-0,106)	0,51± 0,28 med = 0,61 (0,21- 0,88)	0,306±0,050 med=0, 305 (0,262-0,352)	0,27 ±0,26 med = 0,27 (0,13-0,69)
<i>Boletus regius</i> n= 3	0,053 ± 0,009 med= 0,049 (0,048- 0,062)	0,050± 0,025 med= 0,048 (0,029-0,073)	1,22 ± 0,60 med= 1,28 (0,66-1,72)	0,20 ± 0,03 med= 0,19 (0,19 – 0,24)	0,18 ± 0,10 med= 0,19 (0,11 – 0,28)
<i>Lactarius delicious</i> n= 4	0,187±0,221 med= 0,116 (0,019-0,497)	0,204±0,230 med= 0,180 (0,000-0,459)	2,78 ±3,04 med= 1,58 (0,61-7,35)	0,21 ±0,12 med= 0,25 (0,09-0,39)	0,12 ±0,27 med= 0,18 (0,01-0,64)
<i>Lactarius perlatum</i> n= 4	0,105± 0,040* med= 0,102 (0,061-0,156)			0,22±0,21* med= 0,31 (0,05-0,55)	
<i>Macrolepiota procera</i> n= 4	0,032±0,042 med= 0,017 (0,000-0,094)	0,050±0,062 med= 0,029 (0,000-0,143)	0,73±0,29 med= 0,78 (0,35-1,00)	0,01±0,07 med= 0,09 (0,00-0,15)	0,02 ±0,17 med= 0,14 (0,00-0,38)
<i>Tricholoma acerbum</i> n= 4	0,169±0,099 med= 0,171 (0,048-0,286)	0,268±0,137 med= 0,220 (0,160-0,472)	0,81±0,52 med= 0,86 (0,10-1,40)	0,20±0,43 med= 0,30 (0,03-1,00)	0,34±0,26 med= 0,41 (0,13-0,71)
<i>Volvariella gloiacephala</i> n=2	0,056±0,024 med= 0,056 (0,044-0,068)	0,095±0,001 med= 0,095 (0,094-0,096)	0,59±0,24 med= 0,59 (0,46-0,71)	0,79±0,34 ^a med= 0,81 (0,63-0,99)	1,38±0,02 ^a med= 1,38 (1,37-1,39)

(a, valor com diferenças estatísticas) *- os cogumelos foram analisados inteiros

4.2.4. NÍQUEL

4.2.4.1. Teores de níquel em cogumelos e solos

Nas 37 amostras de cogumelos estudadas, obtiveram-se $1,12 \pm 0,51$ e $1,88 \pm 0,36$ $\mu\text{g/g}$ de níquel no chapéu e no pé, respectivamente (Tabela 31), sendo a concentração superior nos pés. Foi encontrado uma concentração média de níquel nos chapéus e nos pés dos cogumelos colhidos na Beira Interior, de $1,28 \pm 0,85$ e $1,96 \pm 0,53$ $\mu\text{g/g}$, respectivamente, não existindo diferença entre os dois valores. Nas amostras de cogumelos colhidas em Trás-os-Montes, os valores obtidos foram ligeiramente inferiores aos da Beira Interior, sendo nos chapéus $0,98 \pm 0,61$ $\mu\text{g/g}$ e nos pés $1,82 \pm 0,51$ $\mu\text{g/g}$, mas não existem diferenças significativas entre as duas regiões. O inverso acontece com as amostras de solo de ambas as regiões. O teor de níquel na Beira Interior é inferior ao de Trás-os-Montes, sendo $13,46 \pm 5,85$ e $125,43 \pm 65,61$ $\mu\text{g/g}$, respectivamente, sendo a diferença significativa. Tal deve-se ao facto de o solo de Trás-os-Montes ser serpentínico, que para além de ser rico em crómio, é também rico em níquel. Embora os valores de níquel no solo sejam mais elevados na região de Trás-os-Montes do que na Beira Interior, as concentrações do metal em estudo nos cogumelos da primeira região não foram superiores às da segunda.

Ao comparar-se amostras de espécies saprófitas com micorrízicas, não se encontraram diferenças significativas, embora os cogumelos micorrízicos contenham um valor superior (Tabela 31). Em ambos os tipos de amostras existe uma maior concentração de níquel nos pés que nos chapéus. O mesmo é demonstrado pelos valores de BCF, em que este valor é superior nos pés, e pelo valor da relação entre a concentração do chapéu e do pé, sendo esta inferior a 1. Esta relação é muito menor nos cogumelos saprófitas que nos micorrízicos (Tabela 31).

Tabela 31 – Concentrações de níquel em cogumelos e solos, factores de bioacumulação e relação entre as concentrações encontradas nos chapéus e pés.

	Concentração Chapéu (µg/ g)	Concentração pé (µg/ g)	Relação Chapéu/pé	Concentração Solo (µg/ g)	BCF chapéu	BCF pé
Amostras n=34	1,12±0,51 ^a med= 0,65 (0,00-7,34)	1,88±0,36 ^a med= 1,38 (0,73-5,13)	0,55±0,18 med= 0,38 (0,00-2,83)	73,98±39,59 med= 31,69 (1,84-347,53)	0,02±0,06 med= 0,02 (0,00-0,84)	0,07±0,08 med= 0,06 (0,00-1,29)
Beira Interior n=15	1,28±0,85 med= 0,627 (0,13-7,34)	1,96±0,53 med= 1,38 (0,96-5,13)	0,64±0,35 med= 0,35 (0,11-2,83)	13,46±5,85 ^e med= 10,05 (1,84-40,35)	0,08±0,12 ^{fi} med= 0,09 (0,00-0,84)	0,19±0,15 ^{fi} med= 0,22 (0,03-1,29)
Trás-os-Montes n=19	0,98±0,61 ^b med= 0,72 (0,00-6,41)	1,82±0,51 ^b med= 1,42 (0,73-4,92)	0,47±0,16 med= 0,40 (0,00-1,30)	125,43±65,61 ^e med= 41,43 (2,84-347,53)	0,00±0,02 ^{gi} med= 0,01 (0,00-0,19)	0,03±0,05 ^{gi} med= 0,04 (0,00-0,35)
Saprófitas n=9	0,45±0,66 ^c med= 0,19 (0,00-1,61)	1,59±0,41 ^c med= 1,36 (0,89-2,73)	0,25±0,12 ^m med= 0,21 (0,00-0,71)	49,27±65,568 med= 10,053 (2,844-347,533)	0,01±0,02 ^h med= 0,03 (0,00-0,10)	0,10±0,10 ^h med= 0,21 (0,01-0,52)
Micorrízicos n=25	1,37±0,66 ^d med= 0,79 (0,00-7,34)	1,99±0,47 ^d med= 1,48 (0,73-5,13)	0,66±0,23 ^m med= 0,51 (0,00-2,83)	83,14±48,76 med= 32,45 (1,84-347,53)	0,02±0,08 ⁱ med= 0,02 (0,00-0,84)	0,06±0,11 ⁱ med= 0,05 (0,00-1,29)

(a,b,c,d,e, f, g, h, i, j, l m – valores com diferenças significativas pelo paired t test)

4.2.4.2. Influência da poluição na bioacumulação de níquel pelos cogumelos

Como já descrito anteriormente, neste trabalho estudou-se a influência de algumas fontes de possível poluição na acumulação de metais pesados pelos cogumelos. Nas amostras colhidas numa zona distante de possíveis fontes de contaminação, verificou-se novamente que os pés bioacumulam mais níquel que os chapéus (Tabela 32), sendo este valor para os chapéus e pés, $1,13 \pm 0,5$ e $1,92 \pm 0,41$ µg/g, respectivamente. Estas amostras apresentavam concentrações nos chapéus ligeiramente superiores de níquel comparativamente com as amostras colhidas em zonas supostamente contaminadas mas esta diferença não é estatisticamente significativa, o que fica a dever-se ao número reduzido de amostras recolhidas nas zonas com possível contaminação e com isto, não se verificou nenhuma influência da poluição na bioacumulação de níquel. Mas num

estudo realizado por Barcan et al., em 1998 [45], é descrito que a concentração de níquel encontrado na superfície superior orgânica do solo diminui hiperbolicamente com o aumento da distância à fundição de cobre e níquel, situada em Monchegorsk, Rússia. Neste mesmo trabalho, as concentrações encontradas nos cogumelos das espécies *Leccinum aurantiacum*, *Leccinum scabrum*, *Xerocomus subtomentosus*, *Suillus luteus* e *Russula vesca* demonstraram uma dependência da distância e direcção da fundição, existindo uma diminuição da concentração de níquel nos cogumelos com o aumento da distância à fundição níquel e cobre [45]; por exemplo, a amostra de *Suillus luteus* colhida a 22 km da fundição continha 10 a 11 µg/g de níquel, enquanto que uma amostra da mesma espécie colhida a 60 km da mesma fundição, continha 2 µg/g de níquel. Deste resultado conclui-se que pode existir uma influência na acumulação de níquel pela contaminação ambiental.

Tabela 32 – Resultados de níquel em cogumelos colhidos em locais possivelmente contaminados e não contaminados, valores encontrados para o factor de bioacumulação e a relação entre as concentrações.

	Concentração Chapéu (µg/ g)	Concentração pé (µg/ g)	Relação Chapéu/pé	Concentração Solo (µg/ g)	BCF chapéu	BCF pé
Amostras de áreas não contaminadas n=31	1,13 ± 0,56 ^a med= 0,69 (0,00-7,34)	1,92 ± 0,41 ^a med= 1,43 (0,73-5,13)	0,51 ± 0,15 med= 0,38 (0,01-1,75)	84,81 ± 46,34 med= 35,93 (2,03-347,53)	0,01 ± 0,07 ^b med= 0,02 (0,00-0,84)	0,05 ± 0,07 ^b med= 0,06 (0,00-0,84)
Amostras de áreas possivelmente contaminadas n=6	1,07 ± 1,26 med= 0,50 (0,13-3,61)	1,63 ± 0,55 med= 1,29 (1,24-2,73)	0,77 ± 0,83 med= 0,39 (0,10-2,83)	18,06 ± 12,25 med= 18,48 (1,84-32,57)	0,06 ± 0,13 med= 0,06 (0,01-0,43)	0,13 ± 0,20 med= 0,14 (0,04-0,59)

(a, b- valores com diferenças significativas pelo paired t test)

Nas amostras colhidas em áreas com possíveis fontes de contaminação, o níquel distribui-se quase uniformemente por todo o cogumelo, e as concentrações doseadas nos chapéus são muito semelhantes às encontradas no pé, 1,07 ± 1,26 e

1,63±0,55, respectivamente. Também é demonstrado pelos valores do factor de bioacumulação, que apesar de o valor de BCF do pé das amostras colhidas em locais supostamente contaminados ser ligeiramente superior ao do chapéu, não existe diferença significativa.

Tabela 33 – Valores encontrados de níquel nas amostras de *Amanita ponderosa* de solos colhidas em zonas não contaminadas e locais supostamente contaminados, valores do factor de bioacumulação e a relação entre as concentrações no chapéu e no pé.

	Concentração Chapéu (µg/ g)	Concentração pé (µg/ g)	Relação Chapéu/pé	Concentração Solo (µg/ g)	BCF chapéu	BCF pé
Amostras de áreas não contaminadas n=4	0,66±0,71 ^a med= 0,40 (0,13-1,70)	1,47±0,75 ^a med= 1,16 (0,96-2,61)	0,39±0,29 med= 0,40 (0,12-0,65)	12,50±18,27 med= 3,82 (2,03-40,35)	0,07±0,38 med= 0,10 (0,00-0,84)	0,24±0,56 med= 0,40 (0,03-1,29)
Amostras de áreas possivelmente contaminadas n=4	1,37 ±1,47 med= 0,73 (0,44-3,61)	1,32±0,21 med= 1,29 (1,08-1,61)	1,08±1,15 med= 0,62 (0,27-2,83)	24,45±14,77 med= 31,69 (1,84-32,57)	0,06±0,19 med= 0,07 (0,01-0,43)	0,08±0,27 med= 0,05 (0,04-0,59)

(a – valores com diferenças significativas pelo paired t test).

Estes mesmos resultados ocorrem quando se estuda a *Amanita ponderosa*. Nas amostras colhidas em locais próximos de possíveis fontes de contaminação, o níquel distribui-se de um modo uniforme por todo o cogumelo, enquanto que nas amostras colhidas em áreas não poluídas, o níquel está presente em maior quantidade nos pés (Tabela 33). Com os resultados obtidos, não é possível estabelecer nenhuma relação entre a acumulação de níquel pelo cogumelo e hipotética contaminação ambiental. Os cogumelos não são bons indicadores de poluição de níquel porque o BCF é menor que 1.

4.2.4.3. Diferenças entre algumas espécies de cogumelos na bioacumulação de níquel

Ao estudar-se a acumulação de níquel pelas diferentes espécies, não se encontraram diferenças significativas. No entanto, as espécies micorrízicas, *Boletus regius* e *Tricholoma acerbum*, são as que apresentaram concentrações superiores de níquel tanto no chapéu como no pé (Tabela 34).

A espécie *Boletus regius* é a que apresenta maiores valores de BCF, logo, uma maior capacidade de acumulação, mas não existem diferenças significativas entre os valores das diferentes espécies.

Em algumas espécies como a *Amanita muscaria*, *Amanita ponderosa* e *Macrolepiota procera*, existe uma maior concentração nos pés que nos chapéus, com diferenças significativas.

Numa revisão de Kalac e Svoboda de 2000 [27], são consideradas as espécies *Laccaria amethystina* e *Leccinum spp.* como acumuladoras de níquel, cuja concentrações encontradas são compreendidas entre 0,4 a 2 mg/kg de matéria seca. As concentrações encontradas nas espécies micorrízicas *Boletus regius* e *Tricholoma acerbum*, no presente estudo, ultrapassavam os valores máximos da revisão citada.

Tabela 34 – Concentrações obtidas de níquel nos chapéus e pés em diferentes espécies, bem como a sua relação e os factores de bioacumulação.

	Concentração chapéu (µg/g)	Concentração pé (µg/g)	Relação Chapéu/pé	BCF chapéu	BCF pé
<i>Agaricus sylvicola</i> n=2	0,62±0,18 med= 0,62 (0,53-0,72)	2,11±0,16 med= 2,11 (2,03-2,20)	0,30±0,11 med= 0,30 (0,24-0,35)	0,06±0,02 ^a med= 0,06 (0,05-0,07)	0,21±0,02 ^a med= 0,21 (0,20-0,22)
<i>Amanita muscaria</i> n=2	0,90±0,20 ^b med= 0,90 (0,80-1,00)	1,38±0,19 ^b med=1,38 (1,28-1,47)	0,66±0,24 med= 0,66 (0,54-0,78)	0,01±0,02 med= 0,01 (0,00-0,02)	0,01±0,03 med=0,01 (0,00-0,03)
<i>Amanita ponderosa</i> n=4	0,66±0,71 ^c med= 0,40 (0,13-1,70)	1,47±0,75 ^c med= 1,16 (0,96-2,61)	0,39±0,29 med= 0,40 (0,12-0,65)	0,07±0,38 med= 0,10 (0,00-0,84)	0,24±0,56 med= 0,40 (0,03-1,29)
<i>Boletus regius</i> n=3	2,79±4,47 med=0,63 (0,39-7,34)	3,09±2,15 med= 2,76 (1,38-5,13)	0,65±0,77 med= 0,29 (0,23-1,43)	0,12±0,44 med= 0,06 (0,04-0,73)	0,27±0,21 med= 0,27 (0,14-0,51)
<i>Lactarius deliciosus</i> n= 4	0,60±0,44 med= 0,45 (0,24-1,25)	1,00±0,20 med= 1,02 (0,73-1,23)	0,56±0,31 med= 0,45 (0,32-1,02)	0,02±0,09 med= 0,01 (0,00-0,19)	0,03±0,16 med= 0,03 (0,00-0,35)
<i>Lactarius perlatus</i> n=4	1,03 ± 0,43* med= 0,92 (0,62-1,65)			0,01± 0,02* med= 0,02 (0,00-0,04)	
<i>Macrolepiota procera</i> n=4	0,19±0,23 ^d med= 0,11 (0,00-0,52)	1,02±0,22 ^d med= 0,92 (0,89-1,36)	0,16±0,15 med= 0,12 (0,02-0,39)	0,01±0,02 med= 0,02 (0,00-0,04)	0,10±0,16 med= 0,18 (0,03-0,32)
<i>Tricholoma acerbum</i> n=4	2,30±2,68 med= 1,00 (0,79-6,41)	3,55±1,51 med= 3,88 (1,53-4,92)	0,59±0,48 med= 0,41 (0,22-1,30)	0,01±0,01 med= 0,02 (0,00-0,02)	0,03±0,05 med= 0,05 (0,00-0,11)
<i>Volvariella gloiocephala</i> n=2	0,32 ±0,37 med=0,32 (0,13-0,50)	1,99±1,46 med= 1,99 (1,24-2,73)	0,14±0,08 med= 0,14 (0,10-0,18)	0,05±0,07 med= 0,06 (0,02-0,10)	0,35±0,28 med= 0,38 (0,24-0,52)

(a,b,c,d- valores com diferenças significativas por paired t test) *- os cogumelos foram analisados inteiros

5. CONCLUSÕES

1. Foi devidamente validado um método de doseamento de cádmio, chumbo, crómio hexavalente e total e níquel para quantificação em cogumelos e solo.

2. Os valores médios de cádmio encontrados nos cogumelos foram de $0,693 \pm 0,343$ $\mu\text{g/g}$ nos chapéus, $0,391 \pm 0,255$ $\mu\text{g/g}$ nos pés e nos solos $0,012 \pm 0,004$ $\mu\text{g/g}$. Os cogumelos continham teores de chumbo de $0,167 \pm 0,163$ $\mu\text{g/g}$ nos chapéus, $0,230 \pm 0,172$ $\mu\text{g/g}$ nos pés e nos solos $0,447 \pm 0,079$ $\mu\text{g/g}$. Os valores de crómio total e hexavalente contidos nos cogumelos foram respectivamente de $1,14 \pm 1,03$ e $0,103 \pm 0,045$ $\mu\text{g/g}$ nos chapéus, $1,11 \pm 0,55$ e $0,143 \pm 0,061$ $\mu\text{g/g}$ nos pés e nos solos $84,0 \pm 34,5$ e $0,483 \pm 0,170$ $\mu\text{g/g}$. Os valores médios de níquel presentes nos cogumelos foram de $1,12 \pm 0,51$ $\mu\text{g/g}$ nos chapéus e de $1,88 \pm 0,36$ $\mu\text{g/g}$ nos pés e nos solos $73,98 \pm 39,59$ $\mu\text{g/g}$.

3. A percentagem média de crómio hexavalente nos cogumelos relativamente ao crómio total foi de 9,0 e 12,9% nos chapéus e nos pés, respectivamente. Nos solos esta percentagem era de 0,57%. O elevado conteúdo de crómio total presente nos solos (84,0 $\mu\text{g/g}$) relativo à pequena percentagem de crómio hexavalente presente (0,57%) nestes e à elevada percentagem desta última espécie nos cogumelos, permite concluir que os cogumelos acumulam crómio hexavalente em maior extensão, o que está em concordância com a sua grande biodisponibilidade no solo.

4. Ao comparar-se a distribuição dos metais pelas partes do cogumelo, chapéu e pé, o cádmio foi o único metal em que se encontrou em maior quantidade no chapéu. O chumbo encontrava-se em concentrações mais elevadas no pé, excepto nos cogumelos saprófitas em que este metal tinha uma distribuição uniforme. O crómio hexavalente estava presente em maior quantidade no pé, excepto nas amostras da Beira Interior e nas espécies micorízicas. O níquel encontrou-se em maior concentração no pé excepto nas amostras da Beira Interior. O crómio total distribui-se de uma forma uniforme por todo o cogumelo.

5. Na comparação da ecologia dos cogumelos, não se encontraram diferenças entre saprófitas e micorrízicas para os vários metais estudados, excepto para o crómio, em que as espécies micorrízicas continham no chapéu um valor significativamente superior às saprófitas, sendo estes de 1,49 e 0,20 $\mu\text{g/g}$ de matéria seca, respectivamente.

6. Não se encontraram também diferenças entre os valores de concentração nos cogumelos colhidos nas regiões da Beira Interior e Trás-os-Montes para o cádmio, chumbo, crómio total e níquel. Os pés dos cogumelos de Trás-os-Montes continham um valor significativamente superior de crómio hexavalente que os da região da Beira Interior, sendo estas concentrações 0,197 e 0,075 $\mu\text{g/g}$ de matéria seca, respectivamente. Os solos de Trás-os-Montes eram significativamente mais ricos em crómio total e níquel que os da Beira Interior.

7. Não se conseguiu relacionar a influência da poluição na bioacumulação dos vários metais estudados pelos cogumelos.

8. Com os resultados deste trabalho, conclui-se que os cogumelos, entre os metais analisados, têm uma maior capacidade de acumular cádmio. Para este metal, foram encontrados valores de BCF para chapéu e pé de 47,54 e 19,56, respectivamente. Como o BCF foi superior a 1, pode-se considerar que os cogumelos são bons bioindicadores da contaminação ambiental por cádmio. Para os outros metais os valores de BCF foram inferiores a 1.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Alexopoulos, C.J., Mims, C.W. & Blackwell, M. 1996. *Introductory mycology*. John Wiley & Sons Inc.: 1 - 80; 508 – 541. 4^a ed.
2. Fonseca, A.F. 1998. *Taxonomia microbiana* in Microbiologia, Ferreira, W.F., Sousa, J.C. Lidel: 271–283. 1^a ed. Lisboa.
3. Margulis, L. & Schwarte, K. 1982. *Five Kingdoms. An illustrated guide to the Phyla of Life on Earth*. Freeman and Company. 1^a ed. New York.
4. Kirk, P., Cannon, P., David, J. & Stalpers, J. 2001. *Dictionary of the Fungi*. CABI publishing. 9^a ed. New York.
5. Freitas, G. 2000. *Micologia geral* in Microbiologia, Ferreira WF, S.J. Lidel: 291-307. 1^a ed. Lisboa.
6. Martins, F.X. 2004. *Cogumelos* in Património natural Transmontano, João Azevedo Editor: 1^a ed. Mirandela.
7. Alonso, X. 2002. *Bioacumulación de metales pesados en macromicetos*. Anais Asoc Micol Pantorra. **2**: 53–70.
8. Keizer, G.J. 1998. *The complete encyclopedia of mushrooms*. Rebo publishers. 1^a ed. Lisse.
9. Halpern, J.H. 2004. *Hallucinogens and dissociative agents naturally growing in the United States*. Pharmacol Ther. **102**: 131– 138.
10. Berger, K.J. & Guss, D.A. 2005. *Mycotoxins revisited: Part II*. J Emerg Med. **28** (2): 175–183.
11. Passie, T., Seifert, J., Schneider, U. & Emerich, H.M. 2002. *The pharmacology of psilocybin*. Addict Biol. **7**: 357-364.

12. Espiard, M.-L., Lecardeur, L., Abadie, P., Halbecq, I.& Dollfus, S. 2005. *Hallucinogen persisting perception disorder after psilocybin consumption: a case study*. Eur Psychiatry **20**: 458–460.
13. Goldfrank, L. 2006. *Mushrooms* in Goldfrank's Toxicologic Emergencies, Goldfrank, L., Flomenbaum, N., Lewin, N., Howland, M., Hoffman, R. McGraw Hill: 1564-1576. 8^a ed.
14. Klevay, L.M. 1998. *Lack of a recommended dietary allowance for copper may be hazardous to your health*. J Am Coll Nutr. **17** (4): 322-326.
15. Monro, J.A. 2003. *Treatment of Cancer with Mushroom Products*. Arch Environ Health. **58** (8): 533-537.
16. Borchers, A.T., Keen, C.L.& Gershwin, M.E. 2004. *Mushrooms, tumors and immunity: An update*. Exp Biol Med. **229**: 393–406.
17. Gadd, G.M. 1993. *Interaction of fungi with toxic metals*. New Phytol. **124**: 25-60.
18. Bresnky, A.& Besl, H. 1990. *A colour atlas of poisonous fungi*. Wolfe Publishing Ltd.: 1-10. 1^a ed. London.
19. Giovani, C., Garavaglia, M.& Scruzzi, E. 2004. *Radiocaesium in mushrooms from Northeast Italy, 1986-2002*. Radiat Prot Dosimetry **111** (4): 377–383.
20. Svadlenkova, M., Konecny, J.& Smutny, V. 1996. *Model calculation of radiocaesium transfer into in the czech republic after a nuclear reactor accident and an estimate of the population dose burden*. Environ Pollut. **92** (2): 173-184.
21. Howard, B.J., Wright, S.M., Salbu, B., Skuterud, K.L., Hove, K.& Loe, R. 2004. *Long-term consequences for Northern Norway of a hypothetical release from the Kola nuclear power plant*. Sci Total Environ **327**: 53–68.

22. Baeza, A., Guillén, J.& Bernedo, J. 2005. *Soil-fungi transfer coefficients: importance of the location of mycelium in soil and of the differential availability of radionuclides in soil fractions*. J Environ Radioac. **81**: 89-106.
23. Grogan, H.M.& Jukes, A.A. 2003. *Persistence of the fungicides thiabendazole, carbendazim and prochloraz-Mn in mushroom casing soil*. Pest Manag Sci **59**: 1225–1231.
24. Mitchelly, S.H.& Kilpatricky, M. 2003. *Occurrence of pesticide residues in mushrooms in Northern Ireland, July 1997–January 1999*. Food Addit Contam. **20** (8): 716–719.
25. Bernardo, D., Pérez Cabo, A.P., Novaes-Ledieu, M., Pardo, J.& Mendoza, C.G. 2004. *Comparative effect of the fungicide Prochloraz-Mn on Agaricus bisporus vegetative-mycelium and fruit-body cell walls*. Int Microbiol. **7**: 277-281.
26. Alonso, J., Salgado, M.J., Garcia, M.A.& Melgar, M.J. 2000. *Accumulation of Mercury in Edible Macrofungi: Influence of Some Factors*. Arch Environ Contam Toxicol **38**: 158–162.
27. Kalac, P.& Svoboda, L. 2000. *A review of trace element concentrations in edible mushroom*. Food Chem **69**: 273-281.
28. Tuzen, M.& Soylak, M. 2005. *Mercury Contamination in Mushroom Samples from Tokat, Turkey*. Bull Environ Contam Toxicol. **74**: 968–972.
29. Garcia, M.A., Alonso, J., Fernandez, M.I.& Melgar, M.J. 1998. *Lead Content in Edible Wild Mushrooms in Northwest Spain as Indicator of Environmental Contamination*. Arch Environ Contam Toxicol **34**: 330–335.
30. Svoboda, L.& Kalac, P. 2003. *Contamination of Two Edible Agaricus spp. Mushrooms Growing in a Town with Cadmium, Lead, and Mercury*. Bull Environ Contam Toxicol. **71**: 123–130.

31. Kalac, P., Niznanská, M., Bevilaqua, D. & Stasková, I. 1996. *Concentrations of mercury, copper, cadmium and lead in fruiting bodies of edible mushrooms in the vicinity of a mercury smelter and a copper smelter.* Sci Total Environ. **177**: 251-258.
32. Falandysz, J., Szymczyk, K., Ichihashi, H., Bielawski, L., Gucia, M., Frankowska, A. & Yamasaki, S.-I. 2001. *ICP/MS and ICP/AES elemental analysis (38 elements) of edible wild mushrooms growing in Poland.* Food Addit Contam **18** (6): 503- 513.
33. Falandysz, J., Lipka, K., Kawano, M., Brzostowski, A., Dadej, M., Drusiak, A.J. & Puzyn, T. 2003. *Mercury Content and Its Bioconcentration Factors in Wild Mushrooms at Łukta and Moraüg, Northeastern Poland.* J Agric Food Chem **51**: 2832-2836.
34. Falandysz, J., Jezdrusiak, A., Lipka, K., Kannan, K., Kawano, M., Gucia, M., Brzostowski, A. & Dadej, M. 2004. *Mercury in wild mushrooms and underlying soil substrate from Koszalin, North-central Poland.* Chemosphere **54**: 461–466.
35. Falandysz, J., Gucia, M., Frankowska, A., Kawano, M. & Skwarzec, B. 2001. *Total Mercury in Wild Mushrooms and Underlying Soil Substrate from the City of Umeå and Its Surroundings, Sweden.* Bull Environ Contam Toxicol **67**: 763–770.
36. Falandysz, J., Bielawski, L., Kawano, M., Brzostowski, A. & Chudzynski, K. 2002. *Mercury in mushrooms and soil from the wielunska upland in south-central poland* J Environ Sci Health A. **A37** (8): 1409–1420.
37. Carvalho, M.L., Pimentel, A.C. & Fernandes, B. 2005. *Study of heavy metals in wild edible mushrooms under different pollution conditions by X-ray fluorescence spectrometry.* Anal Sci. **21**: 747-750.

38. Alonso, J., Garcia, M.A., Perez-Lopez, M.& Melgar, M.J. 2003. *The Concentrations and Bioconcentration Factors of Copper and Zinc in Edible Mushrooms*. Arch Environ Contam Toxicol. **44**: 180–188.
39. Michelot, D., Poirier, F.& Melendez-Howell, L.M. 1999. *Metal Content Profiles in Mushrooms Collected in Primary Forests of Latin America*. Arch Environ Contam Toxicol. **36**: 256–263.
40. Michelot, D., Siobud, E., Dore, J.-C., Viel, C.& Poirier, F. 1998. *Update on metal content profiles in mushrooms—toxicological implications and tentative approach to the mechanisms of bioaccumulation*. Toxicon **36** (12): 1997-2012.
41. Valentão, P., Lopes, G., Valente, M., Barbosa, P., Andrade, P.B., Silva, B.M., Baptista, P.& Seabra, R.M. 2005. *Quantitation of Nine Organic Acids in Wild Mushrooms*. J Agric Food Chem **53**: 3626-3630.
42. Leyval, C., Turnau, K.& Haselwandter, K. 1997. *Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects*. Mycorrhiza. **7**: 139–153.
43. Schützendübel, A.& Polle, A. 2002. *Plant response to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protective mycorrhization*. J Exp Bot. **53** (372): 1351-1365.
44. Alonso, J., *Bioacumulación de metales pesados en macromicetos comestibles. Repercusiones toxicológicas y estudios de biorrecuperación - Tese de doutoramento*. 2001, Universidade de Santiago de Compostela: Lugo.
45. Barcan, V.S., Kovnatsky, E.F.& Smetannikova, M.S. 1998. *Absorption of heavy metals in wild berries and edible mushrooms in an area affected by smelter emissions*. Water Air Soil Pollut **103**: 173–195.

46. Fan-Xiang, K. 1995. *Influence of copper, manganese and pH on the growth and several enzyme activities in mycorrhizal fungus amanita muscaria*. Chemosphere. **30** (1): 199-207.
47. Bolan, N.S., Adriano, D.C., Natesan, R. & Koo, B.-J. 2003. *Effects of Organic Amendments on the Reduction and Phytoavailability of Chromate in Mineral Soil*. J Environ Qual. **32**: 120–128.
48. Slekovec, M. & Irgolic, K.J. 1996. *Uptake of arsenic by mushrooms from soil*. Chem Speciation Bioavailability. **8**: 67-73.
49. Baldrian, P. & Gabriel, J. 2002. *Copper and cadmium increase laccase activity in Pleurotus ostreatus*. FEMS Microbiol Lett **206**: 69-74.
50. Fisher, R.G., Rapsomanikis, S. & Andreae, M.O. 1995. *Bioaccumulation of methylmercury and transformation of inorganic mercury by macrofungi*. Environ Sci Technol. **29**: 993-995.
51. Cope, W.G., Leidy, R.B. & Hodgson, E. 2004. *Classes of toxicants: Use classes in A textbook of modern toxicology*, E, H. John Wiley & Sons, Inc.: 49-54. 3^a ed. New Jersey.
52. Midio, A.F. & Martins, D.I. 2000. *Toxicologia dos alimentos*. Varela. 1^a ed. São Paulo.
53. Goyer, R.A. & Clarkson, T.W. 2001. *Toxic effects of metals* in Casarett & Doull's Toxicology – The basic science of poisons, Klaassen, C.D. McGraw-Hill – Medical publishing division: 811-867. 6^a ed.
54. Calouro, F. 2005. *Actividades agrícolas e ambiente*. Princípiã, publicações universitárias e científicas: 43-47. 1^a ed. Porto.
55. Clemens, S. 2006. *Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants*. Biochimie. **88**: 1707-1719.

56. de Matos, A.T., Fontes, M.P.F., da Costa, L.M.& Martinez, M.A. 2001. *Mobility of heavy metals as related to soil chemical and mineralogical characteristics of Brazilian soils*. Environ Pollut **111**: 429-435.
57. Holm, P.E., Rootze´n, H., Borggaard, O.K., Møberg, J.P.& Christensen, T.H. 2003. *Correlation of Cadmium Distribution Coefficients to Soil Characteristics*. J Environ Qual. **32**: 138–145.
58. Baldrian, P., In der Wiesche, C., Gabriel, J., Nerud, F.& Zadrazil, F. 2000. *Influence of Cadmium and Mercury on Activities of Ligninolytic Enzymes and Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Pleurotus ostreatus in Soil*. Appl Environ Microbiol. **66** (6): 2471–2478.
59. Piscator, M. 1985. *Dietary Exposure to Cadmium and Health Effects: Impact of Environmental Changes*. Environ Health Perspect. **63**: 127-132.
60. Järup, L. 2003. *Hazards of heavy metal contamination*. Br Med Bull. **68**: 167–182.
61. Comissão das comunidades europeias. 2006. *Regulamento (CE) Nº 1881/2006 da comissão de 19 de Dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios*. Reg nº 1881/2006. Jornal oficial da União Europeia.
62. Godt, J., Scheidig, F., Grosse-Siestrup, C., Esche, V., Brandenburg, P., Reich, A.& Groneberg, D. 2006. *The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health*. J Occup Med Toxicol. **1** (22): 1-6.
63. Sabolic, I. 2006. *Common mechanisms in nephropathy induced by toxic metals*. Nephron Physiol. **104**: 107-104.
64. Nordberg, G.F., Goyer, R.A.& Clarkson, T.W. 1985. *Impact of Effects of Acid Precipitation on Toxicity of Metals*. Environ Health Perspect. **63**: 169-180.

65. Lyn Patrick, N.D. 2006. *Lead Toxicity, A Review of the Literature. Part I: Exposure, Evaluation, and Treatment*. *Alter Med Rev.* **11** (1): 1-22
66. Roos, F.J. 1997. *Smelter and metal reclaimers*. Greenberg, M.I., Hamilton, R.J., Phillips, S.D., McCluskey, G.J. Mosby: 388-396. 2^a ed. Philadelphia.
67. Timbrell, J. 2000. *Principles of biochemical toxicology*. Taylor and Francis Ltd. 3^a ed. UK.
68. Lurie, P.& Sidney, M. 2002. *Continuing exposure to hexavalent chromium, a known lung carcinogen: an analysis of OSHA compliance inspection, 1990-2000*. *Am J Ind Med.* **42**: 378-383.
69. Park, R.M., Bena, J.F., Stayner, L.T., Smith, R.J., Gibb, H.J.& Lees, P.S.j. 2004. *Hexavalent chromium and lung cancer in the chromate industry: a quantitative risk assessment*. *Risk Anal.* **24** (5): 1099-1108.
70. Banks, M.K., Schwab, A.P.& Henderson, C. 2006. *Leaching and reduction of chromium in soil as affected by soil organic content and plants*. *Chemosphere* **62**: 255–264.
71. Tokunaga, T.K., Wan, J., Firestone, M.K., Hazen, T.C., Olson, K.R., Herman, D.J., Sutton, S.R.& Lanzirrotti, A. 2003. *Bioremediation and Biodegradation In Situ Reduction of Chromium(VI) in Heavily Contaminated Soils through Organic Carbon Amendment*. *J Environ Qual.* **32**: 1641–1649.
72. Tokunaga, T.K., Wan, J., Hazen, T.C., Schwartz, E., Firestone, M.K., Sutton, S.R., Newville, M., Olson, K.R., Lanzirrotti, A.& Rao, W. 2003. *Distribution of Chromium Contamination and Microbial Activity in Soil Aggregates*. *J Environ Qual* **32**: 541–549.

73. Apte, A.D., Tare, V.& Bose, P. 2006. *Extent of oxidation of Cr(III) to Cr(VI) under various conditions pertaining to natural environment*. J Hazard Mater B. **128** 164–174.
74. EPA. 1998. *Chromium (VI) (CASRN 18540-29-9)* Disponível em: www.epa.gov/iris/subst/0144.htm.
75. Crump, C., Crump, K., Hack, E., Luippold, R., Mundt, K., Liebeg, E., Paustenbach, D.& Proctor, D. 2003. *Dose-response and risk assessment of airborne hexavalent chromium and lung cancer mortality*. Risk Anal. **23** (6): 1147-1163.
76. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M.& Telser, J. 2007. *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. Int J Biochem Cell Biol. **39**: 44-84.
77. Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M.& Mazur, M. 2006. *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*. Chem Biol Interact. **160**: 1-40.
78. Haber, L.T., Diamond, G.L., Zhao, Q., Erdreich, L.& Dourson, M.L. 2000. *Hazard Identification and Dose Response of Ingested Nickel-Soluble Salts*. Regul Toxicol Pharmacol **31**: 231–241.
79. Haber, L.T., Erdreich, L., Diamond, G.L., Maier, A.M., Ratney, R., Zhao, Q.& Dourson, M.L. 2000. *Hazard Identification and Dose Response of Inhaled Nickel-Soluble Salts*. Regul Toxicol Pharmacol. **31**: 210–230.
80. Oller, A., Costa, M.& Oberdorster, G. 1997. *Carcinogenicity Assessment of Selected Nickel Compounds*. Toxicol Appl Pharmacol. **143**: 152–166.
81. Carrington, P.E., Al-Mjeni, F., Zoroddu, M.A., Max Costa, M.& Maroney, M.J. 2002. *Use of XAS for the Elucidation of Metal Structure and Function: Applications to Nickel Biochemistry, Molecular Toxicology, and Carcinogenesis*. Environ Health Perspec. **110** (5): 705–708.

82. Bal, W., Kozłowski, H. & Kasprzak, K.S. 2000. *Molecular models in nickel carcinogenesis*. J Inorg Biochem **79**: 213–218.
83. Willard, H.H., Merritt, L.L., Dean, J.A. & Settle, F.A. 1998. *Instrumental methods of analysis*. Wadsworth Publishing Company. 7^a ed. Belmont, California.
84. Howard, A.G. & Statham, P.J. 1995. *Inorganic trace Analysis – Philosophy and practice*. John Wiley and Sons Ltd. 1^a ed. Chichester.
85. Haswell, S.J. 1991. *Atomic absorption spectrometry – Theory, design and applications*. Elsevier Science Publishers B V. 1^a ed. Amsterdam.
86. Vandecastle, C. & Block, C.B. 1993. *Modern methods for trace element determination*. John Wiley and Sons Ltd. 1^a ed. Chichester.
87. Furtmann, K. & Seifert, D. 1990. *On the routine determination of chromium (VI) in soils*. Fresenius J Anal Chem. **338**: 73-74.
88. Soares, M.E., Carneiro, C. & Bastos, M.L. 2002. *Implementation of AAS methods for the quantification of Hg and hexavalent Cr in recycled paper used for paper packing*. Atomic Spectroscopy. **23** (5): 148-153.
89. Jonnalagadda, S.B., Pienaar, D.H. & Haripersad, K. 2006. *Elemental Distribution in Selected Agaricus and Rhizina Mushrooms in South Africa*. J Environ Sci Health A. **41**: 507–514.
90. Tuzen, M. 2003. *Determination of heavy metals in soil, mushroom and plant samples by atomic absorption spectrometry*. Microchem J. **74**: 289-297.
91. Brummitt, R. & Powell, C. 1992. *Authors of Plant names*. Royal Botanic Gardens Kew. 1^a ed.
92. Castro, M., Justo, A., Lorenzo, P. & Soliño, A. 2005. *Guía micológica dos ecosistemas galegos*. Baía Edicións: A Coruña. 1^a ed.

93. Courtecuisse, R.& Duhem, B. 2000. *Guide des champignons de France et d'Europe*. Delachaux et Niestlé. 1^a ed. Paris.
94. Helmut& Grunert, R. 2005. *Setas, cómo reconocerlas e identificarlas* Steinbach, G. Blume. 1^a ed. Barcelona.
95. Comissão das comunidades europeias. 2002. *Decisão da comissão que dá execução ao disposta na Directiva 96/23/CE do conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados*. 2002/657/CE. Jornal oficial das Comunidades europeias.
96. Van der Linden, W.E. 1989. *Definition and classification of interferences in analytical procedures*. Pure Appl Chem. **61** (1): 91-95.
97. Holland, B., Welch, A.A., Unwin, I.D., Buss, D.H., Paul, A.A.& Southgate, D.A.T. 1998. *The Composition of Foods. Fifth revised and extended edition*. McCance and Widdowson's. 5^a ed.
98. Trapp, S., Matthies, M., Scheunert, I.& Topp, E.M. 1990. *Modeling the Bioconcentration of Organic Chemicals in Plants*. Environ Sci Technol. **24** (8): 1246-1252.
99. Lodenius, M., Soltanpour-Gargari, A.& Tulisalo, E. 2002. *Cadmium in Forest Mushrooms After Application of Wood Ash*. Bull Environ Contam Toxicol **68**: 211–216.
100. Markiewicz-Patkowska, J., Hursthouse, A.& Przybyla-Kij, H. 2005. *The interaction of heavy metals with urban soils: sorption behaviour of Cd, Cu, Cr, Pb and Zn with a typical mixed brownfield deposit*. Environ Int **31**: 513–521.
101. Appel, C.& Ma, L. 2002. *Concentration, pH, and Surface Charge Effects on Cadmium and Lead Sorption in Three Tropical Soils*. J Environ Qual. **31**: 581–589.

102. Shanker, A.K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H.& Avudainayagam, S. 2005. *Chromium toxicity in plants*. Environ Int **31**: 739– 753.

