

RESUMO

Trás-os-Montes (nordeste de Portugal) é reconhecido como uma das regiões da Europa mais rica em cogumelos selvagens com importância gastronómica e nutricional. Diversas espécies aí existentes constituem um meio de subsistência para a população local, para além de exercerem um papel importante no comércio regional e nacional. Contudo, apesar do seu elevado consumo, os cogumelos selvagens comestíveis constituem uma matriz pouco explorada, nomeadamente no que respeita ao seu perfil metabólico e potenciais actividades biológicas. Assim, o trabalho que consta da presente dissertação compreende a determinação de metabolitos primários e secundários em diversas espécies recolhidas nessa região, o estudo da influência das fontes de azoto na sua biossíntese pelo micélio, o efeito do processamento na sua composição química e a avaliação do seu potencial antioxidante.

As espécies seleccionadas para esta dissertação foram *Agaricus bisporus*, *Amanita caesarea*, *Amanita rubescens*, *Boletus edulis*, *Cantharellus cibarius*, *Fistulina hepatica*, *Hydnum rufescens*, *Hygrophorus agathosmus*, *Leucopaxillus giganteus*, *Pholiota nameko*, *Pleurotus ostreatus*, *Russula cyanoxantha*, *Suillus bellini*, *Suillus bovinus*, *Suillus granulatus*, *Suillus luteus*, *Tricholoma equestre*, *Tricholoma portentosum* e *Tricholomopsis rutilans*.

A composição em ácidos orgânicos foi determinada por HPLC-UV. As espécies analisadas revelaram-se uma boa fonte destes metabolitos, sendo *A. rubescens* e *S. granulatus* as mais ricas nestes constituintes. Os ácidos málico, quínico e cítrico são os principais componentes. Os ácidos que fazem parte do ciclo de Krebs, essenciais ao funcionamento do organismo, estão presentes nas espécies analisadas. Cada espécie apresentou um perfil distinto, sugerindo que estes metabolitos possam ser usados no seu controlo de qualidade. De modo geral, o conteúdo total de ácidos orgânicos é superior no chapéu; no entanto, os ácidos individuais fixam-se preferencialmente no chapéu ou no pé.

O perfil de compostos fenólicos, determinado por HPLC-DAD revelou-se menos constante do que o dos ácidos orgânicos e, por isso, mais útil no controlo de qualidade das espécies. A diversidade e proporção de ácidos fenólicos mostraram-se superiores às dos flavonóides. *C. cibarius* e *F. hepatica* apresentaram a maior variedade destes metabolitos. As espécies estudadas apresentaram quantidades muito baixas destes compostos, o que está de acordo com o descrito para este tipo de matriz. Para *S.*

granulatus e *A. rubescens* foi possível verificar que o ácido *p*-hidroxibenzóico, o único composto fenólico identificado, se fixa preferencialmente no chapéu.

Verificou-se que a origem geográfica, o povoamento e a data de colheita interferem na composição em ácidos orgânicos e compostos fenólicos. Também foi observada a existência de variabilidade intra-específica, que poderá ser explicada quer pela diferente fase de desenvolvimento do carpóforo, quer pelo facto de cada indivíduo resultar do cruzamento de hifas diferentes, apresentando, por isso, um genótipo distinto.

O conteúdo total de alcalóides foi aferido através de um método espectrofotométrico, sendo *B. edulis* a espécie que apresentou o teor mais elevado. De modo geral estes metabolitos fixam-se preferencialmente no chapéu.

Os componentes do aroma (voláteis e semi-voláteis) das espécies foram analisados por GC-MS após extracção quer por HS-SPME, quer sólido-líquido. As espécies estudadas apresentaram uma grande diversidade de classes de compostos, provenientes de vias metabólicas distintas, e que podem distinguir as espécies: ácidos voláteis, ácidos não voláteis, ésteres, alcoóis, aldeídos, cetonas, terpenos, fenóis voláteis, entre outros. De modo geral, os alcoóis e terpenos constituem as classes principais, sendo as espécies do género *Suillus* (*S. bellini*, *S. luteus* e *S. granulatus*) aquelas que apresentaram o número mais elevado de compostos.

Procedeu-se também à análise sensorial das espécies, tendo-se encontrado os descritores “aroma a cogumelo”, “ensilagem”, “floral”, “mel”, “erva” e “noz”. Atendendo às características aromáticas dos cogumelos e aos componentes do aroma identificados foi possível distinguir três grupos de espécies: um no qual abundam derivados com oito átomos de carbono, outro rico em compostos terpénicos voláteis e um terceiro com elevado teor de metional. Além do conhecimento das características sensoriais das espécies, esta informação revela-se de grande interesse para a classificação taxonómica das mesmas.

O perfil de aminoácidos livres das espécies foi caracterizado por HPLC-UV/Vis, usando extractos derivatizados com cloreto de dabsilo. Na maioria das espécies foi possível determinar vinte aminoácidos, sendo *B. edulis* e *T. equestre* as mais ricas nestes metabolitos. Cada espécie apresentou um perfil distinto, mas geralmente a alanina é o principal composto.

Verificou-se que os cogumelos constituem fontes de um grande número de aminoácidos, existentes em proporções variadas e geralmente presentes em níveis que cobrem as necessidades do organismo. Assim, a combinação das diferentes espécies

poderá oferecer bons conteúdos de aminoácidos e uma grande diversidade de sensações gustativas.

Os ácidos gordos livres presentes nas espécies foram determinados em extractos hidrolisados, e após derivatização aos seus metilésteres, por GC-MS. Foram identificados trinta ácidos gordos, tendo sido os ácidos oleico e linoleico e, em menor extensão, os ácidos palmítico e esteárico, os mais abundantes. A espécie *R. cyanoxantha* mostrou ser a espécie mais rica em ácidos gordos.

As espécies analisadas apresentam uma maior proporção de ácidos gordos insaturados, estando ausentes ácidos gordos *trans*. Adicionalmente, fornecem os ácidos essenciais linoleico e α -linolénico e possuem ácidos gordos polinsaturados ómega-3 e -6 preciosos, sendo, por isso, interessantes a nível da saúde.

Os perfis de ácidos gordos permitiram distinguir cinco grupos de espécies. Juntamente com a informação recolhida da determinação dos compostos do aroma, os dados relativos a estes metabolitos revelaram-se particularmente úteis na distinção de *S. bellini* das outras espécies do género *Suillus* analisadas (*S. granulatus* e *S. luteus*), fazendo entender que estas últimas se encontram mais próximas a nível filogenético.

Algumas amostras de espécies selvagens e outras de origem comercial foram estudadas quanto à presença de carotenóides, por HPLC-DAD. Aplicando esta metodologia a material fresco e liofilizado, observou-se somente a existência de β -caroteno e exclusivamente em *C. cibarius*.

Os conteúdos de metabolitos primários (ácidos orgânicos, aminoácidos e ácidos gordos) nas espécies são maiores do que os de metabolitos secundários (compostos fenólicos e alcalóides) sugerindo que os exemplares analisados estejam mais direccionados para o metabolismo primário associado à formação da estrutura das hifas, ao metabolismo energético e a várias funções essenciais ao organismo.

Para encontrar a fonte de azoto inorgânico mais adequada à promoção nutritiva dos cogumelos avaliou-se a influência de NH_4NO_3 , NaNO_2 , KNO_3 e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ na composição química de *L. giganteus*. Os conteúdos de ácidos orgânicos e alcalóides foram afectados pela fonte de azoto e dependeram da fase de desenvolvimento do micélio. De modo geral, NaNO_2 foi aquela que promoveu a maior produção de ácidos orgânicos totais. No entanto, o aumento da biossíntese dos ácidos orgânicos individuais mostrou-se dependente de uma fonte específica: KNO_3 e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ promoveram os níveis dos ácidos fumárico e *cis*-aconítico, respectivamente. NaNO_2 e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ poderão ser usadas para estimular a biossíntese de alcalóides.

A influência dos métodos de preservação a que os cogumelos são habitualmente sujeitos (congelamento, desidratação e conservação em vinagre e em azeite) na sua composição química foi avaliada recorrendo a amostras de *C. cibarius*. Verificou-se que o congelamento permite preservar os ácidos orgânicos e compostos fenólicos com maior eficácia, apesar da desidratação ser mais adequada para manter os níveis de ácido ascórbico. A conservação em azeite mostrou-se particularmente importante por fornecer mais compostos fenólicos, com potencial antioxidante, o que permite aumentar a estabilidade dos cogumelos e, conseqüentemente, manter a sua qualidade nutritiva e alargar o seu prazo de validade.

O potencial antioxidante das espécies foi testado contra o radical DPPH, tendo-se observado actividade anti-radicalar para todas elas, de modo dependente da concentração. *T. rutilans* e *S. bellini* foram as espécies que revelaram maior actividade. O chapéu é a parte que mais contribui para a intercepção do radical DPPH nos cogumelos analisados. Não se encontrou correlação entre os conteúdos totais de ácidos orgânicos e de compostos fenólicos e o potencial dos carpóforos inteiros para interceptar o radical DPPH. Para além dos alcalóides, para os quais se encontrou uma relação positiva com esta actividade, existirão também outros compostos não determinados neste trabalho que poderão contribuir para essa capacidade.

O potencial antioxidante de *F. hepatica* foi também testado relativamente a espécies reactivas de oxigénio: radical anião superóxido, radical hidroxilo e ácido hipocloroso. Esta espécie demonstrou uma boa actividade contra o radical anião superóxido, tendo capacidade para o sequestrar e para evitar a sua formação por inibir a xantina oxidase. Esta espécie confere adicionalmente uma ligeira protecção contra o ácido hipocloroso. Contudo, verificou-se um efeito pró-oxidante relativamente ao radical hidroxilo, que pode ser devido à sua capacidade para reduzir iões ferro.

Este trabalho estendeu o conhecimento do perfil metabólico de espécies de cogumelos selvagens de grande consumo. Verificou-se que os perfis dos compostos analisados se mostram de tal modo distintos que poderão constituir uma ferramenta importante a nível de taxonomia das espécies. Os compostos descritos e o potencial antioxidante revelado sugere que as espécies estudadas poderão dar um contributo benéfico para a saúde.

ABSTRACT

ABSTRACT

Trás-os-Montes region (northeast of Portugal) is recognized as one of the richest regions of Europe in wild edible mushroom species, of considerable gastronomic and nutritional relevance. The harvest of these species constitutes a way of subsistence for the local residents, playing an important role in the regional and national commerce. Nevertheless, despite their high consumption, studies involving those matrices are scarce, especially in what concerns to their metabolic profile and biological activities. Thus, the work herein concerns the determination of primary and secondary metabolites in mushrooms collected in that region and the evaluation of the influence of nitrogen sources on the mycelium metabolites production, the assessment of the effect of the conservation procedure on their chemical composition and of their antioxidant potential.

The species included in this work were *Agaricus bisporus*, *Amanita caesarea*, *Amanita rubescens*, *Boletus edulis*, *Cantharellus cibarius*, *Fistulina hepatica*, *Hydnum rufescens*, *Hygrophorus agathosmus*, *Leucopaxillus giganteus*, *Pholiota nameko*, *Pleurotus ostreatus*, *Russula cyanoxantha*, *Suillus bellini*, *Suillus bovinus*, *Suillus granulatus*, *Suillus luteus*, *Tricholoma equestre*, *Tricholoma portentosum* and *Tricholomopsis rutilans*.

Organic acids profiles were determined by HPLC-UV. The analyzed species revealed to be good sources of this kind of metabolites, being *A. rubescens* and *S. granulatus* the richest ones. Malic, quinic and citric acids were the main components. The organic acids intermediates from the Krebs cycle, essential to organism functioning, were present in all species. Each species presented a distinct profile, suggesting that these metabolites may be useful for their quality control. In a general way, cap contains the highest total organic acid amounts; nevertheless, the individual organic acids are preferably fixed in the cap or in the stipe.

The phenolic profiles, which were determined by HPLC-DAD, revealed to be less constant than the organic acids ones, so becoming more useful in the quality control of the species. Comparing with flavonoids it was noticed that phenolic acids were present in higher variety and proportions. *C. cibarius* and *F. hepatica* showed the greatest diversity of phenolic compounds. All the mushroom species contained very small amounts of phenolics, which is in accordance with previous works referred in the literature for this kind of matrix. For *S. granulatus* and *A. rubescens* it was possible to observe that *p*-

hydroxybenzoic acid, the only phenolic compound identified, is preferably accumulated in the cap.

It was shown that organic acids and phenolics composition of mushrooms can depend on their geographic origin, orchard of collection and date of collection. The occurrence of intra-specific variability was also observed, which could be due to the existence of carpophores at different development stages or to the fact that each individual results from the cross-breeding of different hyphas, thus presenting a distinct genotype.

The total alkaloids amounts were assessed by a spectrophotometric method, being *B. edulis* the richest species. In a general way, these molecules are especially fixed in the cap.

The aroma constituents of the species (volatiles and semi-volatiles) were analyzed by GC-MS after HS-SPME or solid-liquid extraction. The studied species expressed a great diversity of chemical classes, coming from distinct metabolic pathways that could be important for species differentiation: volatile acids, non-volatile acids, esters, alcohols, aldehydes, ketones, terpenes, volatile phenols, lactones and other compounds. In a general way, alcohols and terpenes were the principal groups. *Suillus* species (*S. bellini*, *S. luteus* and *S. granulatus*) contained the highest number of identified aroma compounds.

Using sensorial analysis, the descriptors “mushroomlike”, “farm-feed”, “floral”, “honeylike”, “hay-herb” and “nutty” were obtained. Taking odor properties and aroma chemical compounds into account it was possible to distinguish three groups of wild edible mushroom species: one of them being rich in C8 derivatives; another one being numerous in terpenic volatile compounds and a last one containing high levels of methional. This work gives a considerable contribution to the knowledge of the sensory characteristics of the analyzed species and could be useful for their taxonomic classification.

To define the qualitative and quantitative amino acids profiles, a derivatization procedure with dabsyl chloride was performed, followed by HPLC-UV/Vis analysis. In the majority of the species it was possible to found twenty amino acids, being *B. edulis* and *T. equestre* the richest ones. The different species exhibited distinct free amino acids profiles; however, alanine was generally the main compound.

The mushrooms studied proved to be good sources of a high number of amino acids, existing in assorted proportions. As a rule, the mushrooms contain the indispensable amino acid amounts to allow the normal organism functioning. A

combination of different mushroom species in the diet would offer good amounts of amino acids and a great variety of palatable sensations.

In order to define fatty acids profiles, combined fatty acids were hydrolyzed and all free compounds were derivatized to their methyl ester forms, followed by analysis by GC-MS. Thirty fatty acids were identified. In general, oleic and linoleic acids corresponded to the main components; palmitic and stearic acids were also abundant in the species. *R. cyanoxantha* was the species presenting the highest fatty acids contents.

The examined species provide superior levels of unsaturated fatty acids and *trans* components are absent. In addition, they offer the essential linoleic and α -linolenic acids and omega-3 and -6 polyunsaturated fatty acids, thus being interesting regarding human health.

The fatty acids profiles allowed separating the mushrooms species into five groups. Taking the aroma and the fatty acids profiles into account it was possible to distinguish *S. bellini* from the other *Suillus* species (*S. granulatus* and *S. luteus*), which suggests that *S. granulatus* and *S. luteus* may be phylogenetically closer.

Wild and commercial mushroom species were screened by HPLC-DAD for the presence of carotenoids. By applying this methodology to lyophilized and fresh materials, only β -carotene was found and just in *C. cibarius* species.

In a general way, it was observed that the primary metabolites contents of the species (organic acids, amino acids and fatty acids) are usually higher than the secondary metabolites ones (phenolics and alkaloids). This suggests that the analyzed mushrooms are especially exerting primary metabolic functions that comprise essential activities for the organism, formation of hyphas structure and energetic metabolism.

In order to find the most suitable inorganic nitrogen source to promote the nutritional value of the mushrooms we studied the influence of NH_4NO_3 , NaNO_2 , KNO_3 and $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ on *L. giganteus* mycelium chemical composition. The organic acids and total alkaloids contents were affected by the nitrogen source and depended on the developmental stage of the mycelium. In a general way, NaNO_2 provided the highest total organic acids levels. However, the promotion of individual organic acids biosynthesis depended on a specific nitrogen source: KNO_3 and $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ increased the fumaric and *cis*-aconitic acids levels, respectively. NaNO_2 and $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ could be used to stimulate alkaloids production.

The influence of the conservation procedure (freezing, drying, conservation in olive oil and in vinegar) on the chemical composition of mushrooms was evaluated using *C. cibarius* species. The results showed that freezing is the best process to preserve organic

acids and phenolics levels; however, drying will be the appropriate procedure to maintain ascorbic acid contents. The conservation in olive oil offers additional phenolic compounds with antioxidant capacity, that affords stability to the mushrooms and, consequently, contribute to maintain their nutritional quality and to extend their shelf life.

The antioxidant potential of the species was assessed by using the DPPH radical scavenging assay. All of the species exhibited antiradical ability in a concentration-dependent way, being *T. rutilans* and *S. bellini* the strongest ones. In general, cap is the material with higher antioxidant capacity. No correlation was found between DPPH scavenging activity and the organic acids and phenolics contents. In addition to alkaloids, for which a positive correlation was noticed, other compounds not determined in this work could contribute for that capacity.

F. hepatica was also investigated for its capacity to act as a scavenger of reactive oxygen species: superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. This species displayed good activity against superoxide radical, achieved by its capacity to act as both scavenger and xanthine oxidase inhibitor, thus precluding its formation. In addition, *F. hepatica* demonstrated a weak protective effect against hypochlorous acid. However, a prooxidant effect was noticed for hydroxyl radical, which may be due to its capacity for iron ions reduction.

This study extended the knowledge of metabolic profiles of several wild mushroom species widely used for human consumption. These profiles revealed to be so distinct that could be useful in the taxonomic classification of the species. The determined metabolites and the antioxidant potential expressed by the analyzed species point to their beneficial contribution for human health.