



INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos

FERNANDA MORALES LEME GOMES

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM COGUMELOS
COMESTÍVEIS UTILIZANDO QUECHERS E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA
EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL**

CAMPINAS

2018

FERNANDA MORALEZ LEME GOMES

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM COGUMELOS
COMESTÍVEIS UTILIZANDO QUECHERS E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA
EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Tecnologia de Alimentos para obtenção do
título de Mestre em Ciência e Tecnologia de
Alimentos.*

Aluno: Fernanda Moralez Leme Gomes

Orientador: Regina Prado Zanes Furlani

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna
Fernanda Moralez Leme Gomes e orientada pelo Profa. Dra. Regina Prado Zanes
Furlani

CAMPINAS

2018

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Bibliotecária Lucilene Paulina da Silva CRB/8 - 8507
Biblioteca Central do ITAL- Instituto de Tecnologia de Alimentos

G633a Gomes, Fernanda Moralez Leme.

Avaliação da presença de resíduos de agrotóxicos em cogumelos comestíveis utilizando QuEChERS e cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial. Fernanda Moralez Leme Gomes / Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, SP: ITAL - Instituto de Tecnologia de Alimentos, 2018.

67 f.

Profa. Dra. Regina Prado Zanes Furlani.

1. Fungos Comestíveis. 2. Agrotóxicos. 3. QuEChERS. 4. UPLC-MS/MS. I. ITAL / CCQA - Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos. II. Gomes, Fernanda Moralez Leme. III. Título.

Título em inglês: Evaluation of the presence of pesticides residues in edible mushrooms using QuEChERS and ultra-efficiency liquid chromatography coupled to sequential mass spectrometry (UPLC-MS/MS)

Key-words: edible fungi; QuEChERS; champignon; UPLC-MS/MS

Titulação: Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Banca Examinadora: Regina Prado Zanes Furlani; Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz; Mateus Henrique Petrarca; Vera Sonia Nunes da Silva.

Data da Defesa: 26/11/2018

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida por Fernanda Moralez Leme Gomes, aprovada pela Comissão Julgadora em 26/11/2018.

Profa. Dra. Regina Prado Zanes Furlani
CCQA - ITAL (Presidente)

Dra. Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz
Embrapa Meio Ambiente

Dr. Mateus Henrique Petrarca

Dra. Vera Sonia Nunes Da Silva
CCQA - ITAL

A ata de defesa de dissertação de mestrado com as respectivas assinaturas dos membros da banca encontra-se arquivada junto à documentação do aluno.

À minha família, por sempre acreditar no meu potencial e oferecer apoio constante. À minha filha Ana Beatriz e meu esposo Rodrigo, pela paciência e palavras de incentivos que foram tão importantes durante o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter colocado pessoas tão especiais no meu caminho que me incentivaram e me apoiaram durante todo esse período do desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a minha orientadora Dra. Regina Prado Zanes Furlani, por toda a paciência, dedicação e compreensão com que sempre me orientou neste trabalho e tantos outros que já desenvolvemos. Desejo também agradecer a equipe do laboratório de Resíduos e Contaminantes do ITAL, Dra. Silvia Amélia Verdiani Tfouni, a nossa querida auxiliar Vera dos Santos que sempre nos dá suporte com a organização do laboratório, e as estagiárias Michele Priscila e Yasmin Abraão.

Agradeço aos membros da Banca Examinadora, a Dra. Sônia Claudia do Nascimento de Queiroz e ao Dr. Mateus Henrique Petrarca pelas correções e sugestões que acrescentaram muito para a finalização do trabalho.

Por último, quero agradecer à minha família pelo apoio incondicional que me deram e especialmente aos meus pais Solange e Gilberto Leme, meu esposo Rodrigo José Gomes pelas revisões incansáveis ao longo da elaboração deste trabalho e minha querida filha Ana Beatriz por assistir meus treinos para a apresentação final.

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi adequar as condições cromatográficas e validar uma metodologia para determinação de resíduos de 9 agrotóxicos (ciromazina, carbendazim, deltametrina, malationa, diflubenzurom, tiofanato metílico, tiabendazol, procloraz e diclorvós) em amostras de três espécies de cogumelos *in natura*, *Agaricus bispourus* (champignon de paris), *Lentinus edodes* (shitake) e *Pleurotus ssp* (shimeji). Para preparo das amostras foi utilizada a metodologia QuEChERS (*quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*), que é uma técnica de extração e limpeza rápida e de baixo consumo de reagentes. Para detecção e quantificação foi utilizada a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (UPLC-MS/MS). Os parâmetros utilizados na validação foram linearidade, efeito matriz, seletividade, exatidão, precisão, limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ). Os resultados mostraram que o método é linear na faixa de 0,01 à 0,125 mg/L, os coeficientes de correlação (r) variaram entre 0,975 e 0,990. A exatidão e precisão foram adequadas, os valores de recuperação obtidos variaram de 68 - 114%, e os desvios padrão relativos não ultrapassaram que 20% estando de acordo com os valores estabelecido pelo guia SANTE que são 70 – 120% para recuperação e os desvios padrão menor que 20%. O LOQ para a deltametrina foi de 0,025 mg/kg e para os demais agrotóxicos foi de 0,01 mg/kg. Os LOD ficaram entre 0,001 e 0,015 mg/kg. O método foi aplicado na análise de resíduos de agrotóxicos em cogumelos comercializados em mercados da região de Campinas, SP e dentre 42 amostras, 14 amostras não apresentaram resíduos dos agrotóxicos estudados e ciromazina não foi detectada em nenhuma amostra (>LOD). Em 28 amostras foram detectados resíduos de agrotóxicos que variaram de >LOD e 1,35 mg/Kg (carbendazim em champignon).

Palavras-chave: Fungos comestíveis; agrotóxicos; QuEChERS; validação de metodologia; carbendazim

ABSTRACT

The objective of the present work was to adequate chromatographic conditions and validate a methodology for the determination of residues of 9 pesticides (cyromazine, carbendazim, deltamethrin, malathion, diflubenzuron, thiophanate methyl, thiabendazole, prochloraz e dichlorvos) in *in natura* mushrooms samples. QuEChERS (*quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*) method, which is a fast extraction and cleaning technique with low reagents consumption was used for sample preparation, and ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detector (UPLC-MS/MS) was used for detection and quantification. Parameters used for validation were linearity, matrix effect, selectivity, trueness, precision and limits of detection (LOD) and quantification (LOQ). Results show that the method is linear and correlation coefficients (r) varied from 0.975 to 0.990. Trueness and precision were adequate with recovery values within acceptable range (68-114%) and relative standard deviation below 20%. LOQ for all pesticides was 0.01 mg/kg, except for deltamethrin which was 0.025 mg/kg. LOD were between 0.001 and 0.015 mg/kg. The method was applied for mushrooms commercialized in Campinas, SP, and region. Among 42 samples, 14 did not present residues of the pesticides studied and cyromazine was not detected in any sample ($>LOD$). Pesticides residues were detected in 28 samples, with levels ranging from $>LOD$ to 1.35 mg/Kg (carbendazim in champignon).

Keywords: edible fungi; pesticides; QuEChERS; method validation; carbendazim

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT	vii
SUMÁRIO.....	viii
INTRODUÇÃO	1
Referências	2
OBJETIVOS	5
Objetivo principal.....	5
Objetivos específicos	5
CAPÍTULO 1 - AGROTÓXICOS E COGUMELOS: UMA REVISÃO	6
Resumo.....	6
Abstract.....	6
1. Introdução.....	7
1.1. Cogumelos	9
1.2. Agrotóxicos.....	12
1.3. Resíduos de agrotóxicos em cogumelos.....	13
1.4. Metodologia Analítica para análise de agrotóxicos.....	16
2. Conclusão.....	18
3. Agradecimento.....	19
4. Referências Bibliográficas	19
CAPÍTULO 2 – OCORRÊNCIA DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM COGUMELOS COMESTÍVEIS UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL	30
Abstract.....	30
Resumo.....	31
1. Introdução.....	32

2.	Material e métodos	34
2.1.	Amostras	34
2.2.	Padrões e Reagentes	35
2.3.	Metodologia para determinação dos agrotóxicos	36
2.3.1.	Condições cromatográficas	36
2.3.2.	Aquisição dos íons e condições do espectrômetro de massas ..	36
2.3.3.	Preparo da amostra utilizando QuEChERS.....	37
2.3.4.	Validação da Metodologia	39
3.	Resultados e discussões	40
3.1.	Validação da metodologia	40
3.2.	Aplicação da metodologia em amostras comerciais	44
4.	Conclusões	46
5.	Agradecimento.....	47
6.	Referências bibliográficas	47
	ANEXOS	52

INTRODUÇÃO

Os cogumelos são alimentos consumidos nos países orientais desde a antiguidade, e seu consumo no mundo ocidental aumenta a cada ano. Atualmente, cerca de 100 países cultivam cogumelos e a produção mundial cresce em média 6 a 7% ao ano (SOBHANARDAKANI, 2015). Os brasileiros estão empregando cada vez mais os cogumelos em suas refeições, pois a busca por uma alimentação saudável está motivando esse consumo. Os cogumelos podem ser considerados alimentos saudáveis, pois são ricos em proteína, fibras, carboidratos e micronutrientes essenciais para o organismo humano. (FURLANI; GODOY, 2007).

O cogumelo em conserva é o mais consumido nacionalmente e os produtos chineses são os mais comercializados no Brasil. Isso ocorre porque os cogumelos em conserva importados chegam às gôndolas dos mercados com preços menores em relação aos mesmos nacionais. Porém quando se trata de cogumelos *in natura*, os chineses perdem o mercado, pois esses cogumelos são produtos altamente perecíveis e isso dificulta sua importação. Diante desse cenário, os produtores nacionais estão investindo na produção e comercialização de cogumelos *in natura* (SILVA et al, 2018).

A produção de cogumelos no Brasil é pequena, a Associação Nacional dos Produtores de Cogumelos (ANPC) estimou, em 2013, cerca de 300 produtores, sendo sua maioria concentrada nos estados de São Paulo e Paraná (ANPC, 2017). Três anos depois, o censo paulista de produção de cogumelos mostrou que a fungicultura tem se ampliado foi identificado mais de 500 produtores localizados em 93 municípios (GOMES et al., 2016). Com o crescimento desse mercado o setor da fungicultura vem ganhando visibilidade no território nacional e a concorrência entre os produtores cresce a cada ano.

O cultivo de cogumelo é suscetível às doenças causadas por pragas como moscas e fungos patogênicos que prejudicam sua produção (INAGRO, 2015). Em alguns países, o controle dessas pragas é feito com aplicação de agrotóxicos durante a produção (CAO et al, 2016), porém no Brasil a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) não regulamenta o seu uso em cogumelos (ANVISA, 2017), em contrapartida agências internacionais como o CODEX e a União Europeia

contemplam limites máximos de resíduos (LMR) para diversos princípios ativos em culturas de cogumelos, são eles: ciromazina, deltametrina, diflubenzurom, permetrina e para os fungicidas procloraz e tiabendazol (FAO/WHO 2012).

Embora existam vários trabalhos realizados em diversos países demonstrando a presença de agrotóxicos em cogumelos (WIELAND et al, 2010; CAO et al., 2016; Du et al., 2013; NOGAIM et al, 2011; POULSEN et al 2017; GALGOWSKA & PIETRZAK-FIECKO,2017) no Brasil não existe estudo sobre ocorrência desses resíduos. Os poucos trabalhos publicados se restringem a avaliar alguns princípios ativos, inclusive moléculas banidas nacional e internacionalmente, para estimar a eficácia no cultivo (CARVALHO et al, 2014; NAVICKIENE et al, 2007; ANDRADE; GRACIOLLI, 2005; ZIED et al, 2017).

Tendo em vista que os dados disponíveis na literatura sobre a presença de resíduos de agrotóxicos em cogumelos cultivados no Brasil não estão disponíveis e a importância dessas informações para a segurança da população, o objetivo desse estudo foi determinar resíduos de 9 agrotóxicos em cogumelos comestíveis cultivados no Brasil. Uma metodologia para análise simultânea de agrotóxicos foi otimizada e validada. Os dados obtidos contribuirão para o conhecimento dos níveis de agrotóxicos presentes e poderão ser utilizados para averiguar se os produtores estão atendendo a recomendação da não utilização no cultivo de cogumelos.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, M. C. N.; GRACIOLLI, L. A. Control of saprophytic fungi in the shiitake edible mushroom cultivated in eucalyptus logs. **Acta Scientiarum-Agronomy**, v. 27, n. 2, p. 293-299, 2005.

ANPC (2017) Associação Nacional dos Produtores de Cogumelos. Disponível em: <https://www.anpccogumelos.org/cogumelos>. Acesso em 24 de janeiro de 2017.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2017). Agrotóxicos e Toxicologia: Monografias de Agrotóxicos. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/registros-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos> > Acesso em 05/05/2017

CAO, X.; LIU, S.; YANG, X.; LIU, Z.; LIU, L. A Modified QuEChERS Sample Preparation Method for Simultaneous Determination of 62 Pesticide Residues in Edible Fungi Using Gas Chromatography–Triple Quadrupole Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 9, n. 1, p. 263-274, 2016.

CARVALHO, M. A.; MARQUES, S. C.; MARTOS, E. T.; RIGITANO, R. L.; DIAS, E. S. Bioaccumulation of insecticide in *Agaricus subrufescens*. **Horticultura Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 159-162, 2014.

DU, P.; LIU, X.; GU, X.; DONG, F.; XU, J.; KONG, Z.; ZHENG, Y. Rapid residue analysis of pyriproxyfen, avermectins and diflubenzuron in mushrooms by ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 5, n. 23, p. 6741-6747, 2013.

FAO/WHO (2012) Codex Alimentarius Commission. Pesticide residues in food and feed. Codex pesticide residues in food online database. <http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/index.html>

FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 154-157, 2007.

GALGOWSKA, M.; PIETRZAK-FIEĆKO, R. Pesticide contaminants in selected species of edible wild mushrooms from the north-eastern part of Poland. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 52, n. 3, p. 214-217, 2017.

GOMES, D.; AKAMATSU, I.; SOUZA, E.; FIGUEIREDO, G. J. B. Censo paulista de produção de cogumelos comestíveis e medicinais. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 13, n. 1, 2016.

INAGRO, N.P. "MushTV." Fungal diseases of mushroom and their control Factsheet 04/15 (2015).

NAVICKIENE, S.; JUNIOR, O. P. A.; BRITO, N. M.; GRACIOLLI, L. A.; RIBEIRO, M. L. Determination of benomyl residues in shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*) by liquid chromatography with UV detection. **Journal of chromatographic science**, v. 45, n. 6, p. 340-344, 2007.

NOGAIM, Q.; AMRA, H.; ABOU-DONIA, M.; ABOU-ARAB, A. Occurrence of chemical contaminants in Egyptian edible mushroom. **Pakistan Journal of Life and Social Sciences**, v. 9, n. 2, p. 134-139, 2011.

POULSEN, M. E.; ANDERSEN, J. H.; PETERSEN, A.; JENSEN, B. H.. Results from the Danish monitoring programme for pesticide residues from the period 2004–2011. **Food Control**, v. 74, p. 25-33, 2017.

SILVA, T. T.; DE SOUZA, O. S.; KAWAMOTO JR, L. T.; DA SILVA M. T. T. Mapeamento da cadeia produtiva do cogumelo no Alto Tietê. **South American Development Society Journal**, v. 4, n. 11, p. 121, 2018.

SOBHANARDAKANI, S. Residual Levels of Diazinon and Benomyl on Greenhouse Mushrooms. **Iranian Journal of Toxicology** Volume, v. 9, n. 29, 2015.

WIELAND, M.; HACKER, K.; BAUER, N.; SCHÜLE, E.; WAUSCHKUHN, C.; ROUX, D.; ANASTASSIADES, M. 2010. Pesticide residues in fresh and dried mushrooms on the German market. Chemisches und Veterinaruntersuchungsamt, Stuttgart, Baden-Württemberg, Germany. (<http://cvusa.xn-untersuchungsamt-bw-nzb.de/pdf/MushroomPM036.pdf>). Acesso em 20/09/2014

ZIED, D. C.; DOURADO, F. A.; DIAS, E. S.; PARDO-GIMÉNEZ, A. First study of hormesis effect on mushroom cultivation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 11, p. 195, 2017.

OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

- Adaptar e validar um método analítico para identificar e quantificar resíduos de 9 agrotóxicos em cogumelos utilizando cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial (UPLC-MS/MS)

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adequar as condições cromatográficas e MS/MS para identificação e quantificação dos agrotóxicos ciromazina, carbendazim, tiabendazol, diflubenzurom, diclorvós, malationa, tiofanato-metílico, deltametrina e procloraz;
- Estabelecer as condições de extração e *clean up* para amostras de cogumelos Paris, Shitake e Shimeji;
- Validar a metodologia segundo os requisitos do SANTE/11813/2017;
- Verificar a ocorrência de resíduos de agrotóxicos em amostras de cogumelos comercializados no Brasil.

CAPÍTULO 1 - AGROTÓXICOS E COGUMELOS: UMA REVISÃO

Fernanda Moralez Leme Gomes, Regina Prado Zanes Furlani

Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos, Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas SP, Brasil

Revisão submetida ao periódico “Brazilian Journal of Food Technology”

RESUMO

Os cogumelos podem ser considerados alimentos saudáveis, pois são ricos em proteína, fibras, carboidratos e micronutrientes essenciais para o organismo humano, por essa razão os cogumelos estão cada vez mais presentes nos pratos dos brasileiros. A popularização da culinária oriental também tem influenciado no aumento do consumo no Brasil, uma vez que cogumelos são ingredientes largamente utilizados nessa cozinha e por consequência houve um aumento da produção. O cultivo de cogumelos está susceptível a ataques de pragas causadoras de doenças que podem prejudicar o desenvolvimento desses fungos diminuindo assim sua produtividade e a aplicação de agrotóxicos pode ser uma alternativa para sanar esse problema. No Brasil não existe registro de agrotóxico para ser utilizado no cultivo de cogumelos e essa lacuna na regulamentação pode levar ao uso indiscriminado de agrotóxicos pelos produtores. Essa revisão discorre sobre resíduos de agrotóxicos em cogumelos e as metodologias utilizadas para sua determinação.

Palavras-chaves: fungos comestíveis; pesticidas; QuEChERS.

ABSTRACT

Mushrooms may be considered a healthy food, since they are rich in proteins, fibers, carbohydrates and micronutrient essential to the human organism. For this reason, mushrooms presence in Brazilians diet has been increasing. Popularization of Eastern culinary has also been influencing the growth of consumption in Brazil, and

as mushrooms are ingredients widely used in this culinary, there has been an increase in mushroom production. Cultivation of mushrooms is susceptible to the attack of pests that causes diseases and may damage these fungi development, consequently decreasing its productivity. The use of pesticides may be an alternative to solve this problem. In Brazil there is no pesticide registered to be used in mushrooms cultivation and this breach in regulation may lead to indiscriminate use of pesticides by the producers. This revision comprises pesticides residues in mushrooms as well as methodologies used for their determination.

Keywords: edible fungi; pesticides; QuEChERS.

1. INTRODUÇÃO

Os cogumelos são alimentos consumidos nos países orientais desde a antiguidade, e seu consumo no mundo ocidental aumenta a cada ano. Atualmente, cerca de 100 países cultivam cogumelos e a produção mundial cresce em média 6 a 7% ao ano (SOBHANARDAKANI, 2015).

Suas funções medicinais e seu alto valor nutricional são os principais fatores que despertaram o interesse do consumidor (FURLANI; GODOY, 2007). Apesar de serem conhecidas aproximadamente 12.000 espécies de cogumelos, apenas 2.000 são comestíveis e dentre estas somente 35 são cultivadas comercialmente no mundo. Na Figura 1, estão ilustradas algumas das espécies mais cultivadas e consumidas, *Agaricus bisporus* (champignon de Paris), *Lentinus edodes* (shiitake), *Pleurotus spp* (shimeji), *Auricularia auricula* (cogumelo orelha de pau) e *Volvariella volvacea* (cogumelo palha) (SILVA; JORGE, 2011).

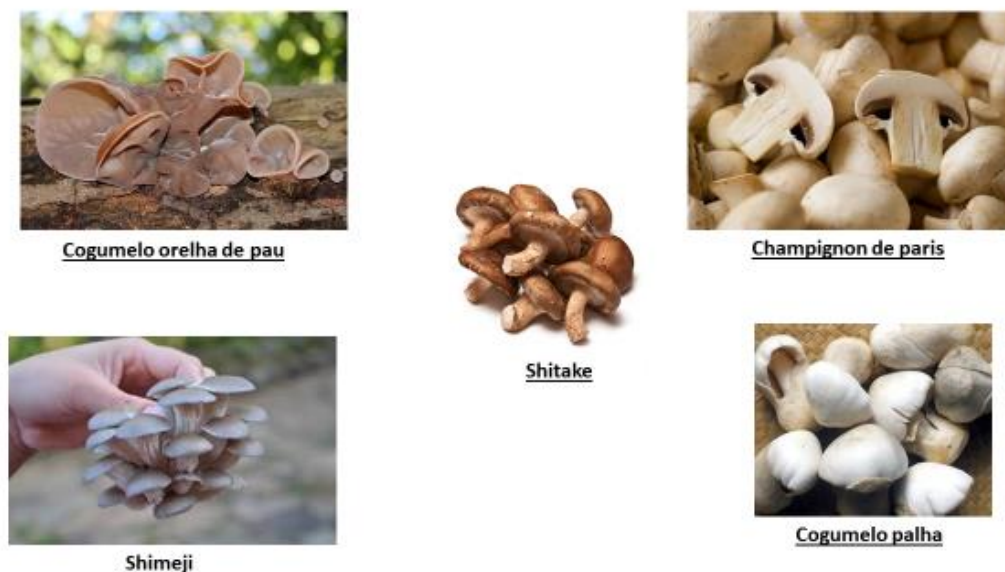


Figura 1: Imagens dos cogumelos mais consumidos

A China, um dos principais exportadores de cogumelos para o Brasil, comercializa produtos em conserva com preços menores em relação aos nacionais, inserindo-se competitivamente no mercado nacional. Entretanto, os produtores nacionais estão investindo na comercialização do fungo *in natura*, uma vez que a China não exporta esse produto (SILVA et al, 2018).

O cultivo de cogumelo é suscetível às doenças causadas por pragas como moscas e fungos patogênicos que prejudicam sua produção (INAGRO, 2015). Em alguns países, o controle dessas pragas é feito com aplicação de agrotóxicos durante a produção (CAO et al, 2016), porém no Brasil a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) não regulamenta o seu uso em cogumelos (ANVISA, 2016), em contrapartida agências internacionais como o CODEX e a União Europeia contemplam limites máximos de resíduos (LMR) para diversos princípios ativos em culturas de cogumelos.

A busca por alimentos saudáveis vem se tornando cada vez mais frequente, entretanto os consumidores não têm a percepção da presença de resíduos de agrotóxicos quando adquirem alimentos nas gôndolas dos mercados. Desta maneira, o controle do uso de agrotóxicos e os possíveis resíduos devem ser monitorados por órgãos competentes. No Brasil, o programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA), coordenado pelo Ministério da Saúde

(ANVISA), vem relatando desde seu início, em 2001, a utilização de agrotóxicos não autorizados em diversas culturas. E desde sua criação a cultura cogumelo nunca foi inserida no monitoramento.

1.1. Cogumelos

Cogumelos são macro fungos pertencentes ao reino Fungi, são facilmente visualizados a olho nu e contém corpos frutíferos distintos que podem se desenvolver acima ou abaixo do solo (CHANG; MILES, 1989). O desenvolvimento dos cogumelos depende da disponibilidade de substrato (matéria orgânica e nitrogênio) presente no solo e a composição química do substrato pode influenciar na qualidade nutricional do cogumelo (MANZI et al., 1999). Algumas espécies de cogumelos vivem em simbiose (interação entre duas espécies sem danos) com raízes de plantas. São formadas teias espessas sobre as raízes, e desta maneira existe uma melhor absorção de nutrientes provenientes das plantas pelos cogumelos, diminuindo a concorrência entre eles pelo nutriente contido no solo (COSTA, 2016).

Os cogumelos são ricos em proteínas, fibras e micronutrientes essenciais para o organismo humano e dessa maneira é considerado um alimento saudável. O consumo desse alimento existe desde a antiguidade onde as civilizações gregas, egípcias, romanas, chinesas já os consumiam, tanto com a finalidade medicinal, quanto nutricional ou terapêutica. São milhares as espécies de cogumelos conhecidas, no entanto existem as espécies comestíveis, não comestíveis e as venenosas (MILES; CHANG, 2004).

Dentre as espécies comestíveis mais consumidas estão o champignon de Paris (*Agaricus bisporus*), Shitake (*Lentinus edodes*), Shimeji (*Pleurotus ssp*) (FURLANI; GODOY, 2007; SILVA; JORGE, 2011; TIAN et al., 2016) que são ingredientes largamente utilizados nas culinárias oriental e italiana e que são muito apreciadas pelos brasileiros.

No Brasil, o hábito de se consumir cogumelos *in natura* ainda é baixo, pois este está relacionado ao aspecto cultural aliado ao alto custo desses produtos (FIGUEIREDO, 2015). A média per capita de consumo no Brasil é de 30g por ano, em contrapartida, franceses e italianos consomem 2,0 e 1,3 kg/ano/pessoa, respectivamente (MENDONÇA et. al., 2005). Mas esse cenário está mudando, pois

a popularização da culinária oriental tem incentivado o aumento do consumo de cogumelos. A ABRESI (Associação Brasileira de Gastronomia Hospedagem e Turismo) registrou um crescimento de estabelecimentos que oferecem pratos típicos orientais e dados de 2014 indicam que, na cidade de São Paulo, existem mais restaurantes orientais do que churrascarias (ABRESI, 2017).

O crescimento da produção mundial de cogumelos tem aumentado significativamente e segundo a FAO, em 2017 estimou-se uma produção de aproximadamente 18 milhões de toneladas, mais de 150% da produção de 2010 que foi cerca de 7 milhões de toneladas. Os maiores produtores são a China, Itália, Estados Unidos, Holanda e Polônia (FAOSTAT data, 2019).

Apesar de o Brasil possuir clima, solo e diversidade de resíduos agrícolas favoráveis para o cultivo de cogumelos, no país não existem muitos produtores. Em 2013, a Associação Nacional dos Produtores de Cogumelos (ANPC) estimou cerca de 300 produtores, sendo sua maioria concentrada nos estados de São Paulo e Paraná (ANPC, 2017). Já em 2016, o censo paulista de produção de cogumelos mostra que a fungicultura no estado está em franca expansão, com mais de 500 produtores localizados em 93 municípios no estado (GOMES et al. 2016).

O cultivo do cogumelo começa com a obtenção do inóculo, esse procedimento consiste na reprodução sexuada ou assexuada do cogumelo, resultando na formação de micélios. Essa etapa deve ser realizada em laboratórios com ambientes controlados. Na reprodução sexuada, os basídios (microestrutura presente no cogumelo adulto) produzem hifas (filamentos) que se multiplicam formando os micélios primários. No momento em que as hifas com cargas genéticas diferentes presente no micélio se encontram, ocorre a formação de micélios secundários. Essa estrutura composta de dois esporos com núcleos diferentes formarão um cogumelo novo através da multiplicação e ramificação dos esporos presentes. A reprodução assexuada, conhecida como vegetativa, se dá com a retirada de um fragmento do cogumelo adulto seguido da sua incubação em meio de cultura, desta maneira ocorre a multiplicação das células formando um micélio. A partir dos micélios ocorre a multiplicação e ramificação conforme a reprodução sexuada. (URBEN, 2004).

A Figura 2 representa os processos que ocorrem durante o desenvolvimento do cogumelo.

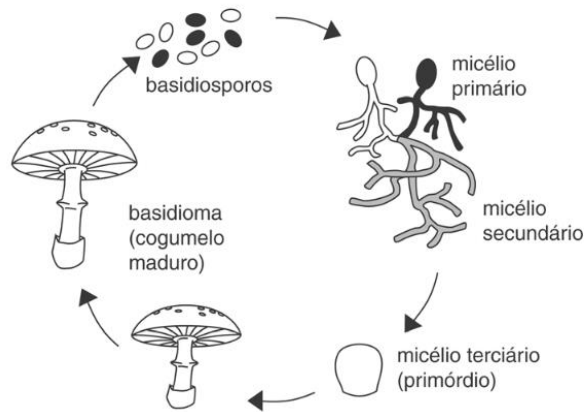


Figura 2: Ciclo de vida dos cogumelos (ROSA, 2007).

Durante a produção de cogumelos são realizados diferentes procedimentos nas etapas do seu ciclo de vida. Após a produção do inóculo (micélio primário), ocorre a inoculação e incubação, etapa que consiste na inserção do inóculo em um substrato previamente preparado. Nessa etapa os micélios terão acesso a carbono, nitrogênio, fósforo, água e outros nutrientes presentes no substrato os quais são essenciais para o seu crescimento. Os substratos podem ser obtidos em condições natural ou estéril onde a primeira não sofre nenhum tratamento asséptico. Em contrapartida, o substrato estéril é tratado para não haver contaminações com organismos vivos que podem concorrer com o inóculo na absorção dos nutrientes, aumentando assim a produtividade do cultivo (EIRA, 2000). Grãos de cereais como trigo, sorgo, arroz, milho são os substratos mais utilizados sendo que a escolha do substrato e os processos aplicados estão relacionados à espécie de cogumelo que será cultivada. (URBEN, 2004).

A incubação dos inóculos é realizada manualmente e o período para o desenvolvimento dos micélios varia com a composição do substrato e a espécie do cogumelo. O micélio desenvolvido é notado com o aparecimento de uma teia branca, nessa etapa é feita a cobertura do substrato com o solo. A finalidade dessa etapa é controlar a hidratação do substrato, prevenindo a perda de água por evaporação e controlando-a durante a irrigação, oferecer suporte para a sustentação dos basidiocarpos (estrutura presente no cogumelo adulto) e contribuir

com o aporte de nutrientes. Nestas condições ocorre a frutificação do cogumelo, ou seja, a formação do cogumelo adulto. (EIRA, 2000).

1.2. Agrotóxicos

Agrotóxicos, pesticidas, defensivos agrícolas, remédio de plantas, veneno são denominações para se referir a substâncias químicas utilizadas para prevenir, combater ou controlar uma praga (PERES et al, 2003). No Brasil o termo agrotóxico é definido no Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamentou a Lei nº 7.802/1989.

“Agrotóxicos são os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento dos produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos”

(Lei Federal 7.802 de 11.07.89).

Desde a metade do século XX os agrotóxicos têm sido amplamente utilizados, sendo que atualmente é empregado na agricultura um número cada vez maior de agrotóxicos, pertencentes a mais de 100 classes. A sua utilização é uma prática importante na proteção das culturas e dos produtos agrícolas e, também, para a melhoria de algumas técnicas que visam a produção. No entanto, o uso desses produtos, especialmente se utilizados de forma inadequada ou incorreta, pode trazer danos ou riscos para as próprias culturas, para o homem e animais e para o ambiente em geral.

A produção de agrotóxicos no Brasil iniciou-se na década de 1940 com os princípios ativos BHC, parationa e DDT que foram fabricados respectivamente pelas empresas Eletroquímica Fluminense, Rhodia e pelo exército do Rio de Janeiro. Entretanto esse comércio ganhou força nos anos 1970 com a criação do Programa Nacional de Defensivos Agrícolas, pois a economia agrícola no Brasil estava em ascensão e o consumo dos agrotóxicos era maior do que o produzido

nacionalmente, desta forma o programa atuou na organização das indústrias produtoras (TERRA, 2008).

Desde então, o consumo de agrotóxicos nas lavouras brasileiras vem crescendo e atualmente está entre os maiores do mundo. O SINDAG (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola) estimou que em 2011 8,5 bilhões de dólares em agrotóxicos foram consumidos pelas lavouras brasileiras. Segundo o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), as culturas de soja, milho, cana-de-açúcar, feijão, arroz, trigo e café estão entre as maiores consumidoras de defensivos agrícolas, totalizando 83% do consumo nacional (CONSEA, 2014).

Devido à toxicidade dos agrotóxicos e com o propósito de manter a segurança dos alimentos, muitos países estabelecem limites máximos de resíduos (LMR) para essas substâncias (LESUEUR et al, 2008). No Brasil os ingredientes ativos registrados têm seus limites para as diversas culturas estabelecidos e monitorados pelos ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) com o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) e da Saúde, através da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), por meio do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Internacionalmente, o Codex Alimentarius, com o objetivo de proteger o consumidor e garantir práticas justas no comércio, também estabelece limites máximos para resíduos de agrotóxicos em determinados alimentos ou grupos de alimentos. Particularmente para cogumelos, o Codex estabelece Limite Máximo de Resíduos (LMR) para os seguintes compostos: ciromazina, deltametrina, diflubenzurom, permetrina, procloraz e tiabendazole (FAO/WHO, 2012). Embora no Brasil existam mais de 500 princípios ativos regulamentados para uso em diversas culturas para o cultivo de cogumelos não existe agrotóxico registrado (ANVISA, 2017).

1.3. Resíduos de agrotóxicos em cogumelos

Durante a produção do cogumelo a contaminação por fungos competidores e o ataque de insetos são grandes desafios para os produtores, pois a cultura é suscetível a uma série de pragas e doenças que podem causar sérias perdas na produção, e o manejo dessas pragas nem sempre é realizado dentro de boas práticas de produção (SHAMSHAD, 2010; TIAN et al., 2016). As moscas *Lycoriella*

mali e *Megaselia halterata* e os fungos *Trichoderma mycelium* e *Verticillium* são pragas frequentemente presentes no cultivo de cogumelos, e assim como os fungos presentes nas toras de eucaliptos para o cultivo do shitake, afetam a produção e devem ser controlados evitando perdas nos cultivos (ANDRADE, 2005; COLES et al, 2002; DHOORIA, 2016). A Figura 3 ilustra as pragas citadas.

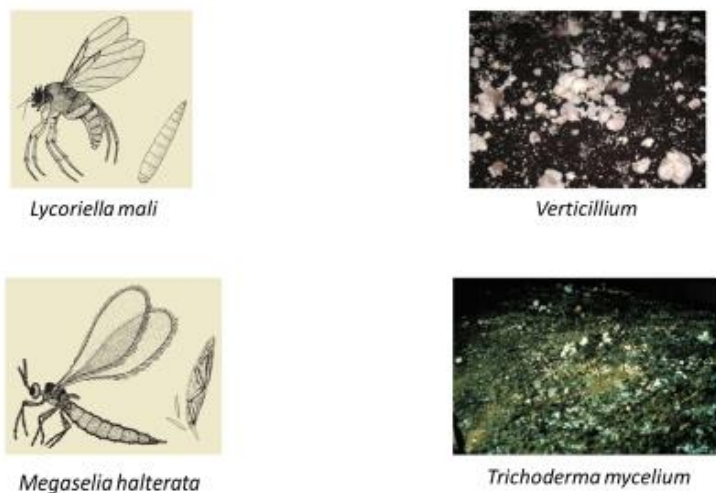


Figura 3: Imagens das pragas que atacam o cultivo de cogumelos

Existem relatos na literatura em que os autores mencionam que produtores lançam mão de agrotóxicos para o controle de insetos e fungos competitivos na cultura de cogumelos (TIAN et al, 2016; DU et al, 2014; MENDONÇA et al, 2005; KASUYA et al, 2004; ZORZENON, 2000) e em vários países a utilização dessas substâncias nesse cultivo tem sido avaliada desde a década de 1950 (SHAMSHAD, 2010).

Além da utilização de agrotóxicos durante o cultivo das plantas, a contaminação ambiental também pode influenciar nos níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos. Culturas que são expostas a água e solo que contenham agrotóxicos ou metais pesados, podem absorver esses compostos, levando à contaminação dos produtos (NOGAIM et al., 2011).

A maioria dos resíduos agrícolas gerados no Brasil é derivada das produções de cana-de-açúcar, laranja, milho, soja entre outras culturas que são exportadas pelo país. Esses resíduos são ricos em água, carbono e nitrogênio, podendo ser utilizados como substrato no cultivo de cogumelos (SILVA, 2016). O bagaço de cana-de-açúcar tem sido largamente utilizado como substrato ou

camada de cobertura no cultivo de cogumelos, e a aplicação de defensivos na lavoura de cana pode gerar bagaço contaminado com resíduos de agrotóxicos.

A preocupação mundial com a segurança alimentar em relação aos resíduos de agrotóxicos em alimentos sempre despertou o interesse para investigações da qualidade dos produtos comercialmente disponíveis. No Brasil, a presença desses resíduos em diferentes culturas agrícolas tem sido amplamente estudada (FERREIRA et al. 2015; ANDRADE et al, 2011; FURLANI et al, 2011; CISCATO et al, 2009; JARDIM; CALDAS, 2012) e a adoção de regulamentações cada vez mais rígidas em relação aos limites máximos de resíduos tem sido uma constante.

Embora existam relatos na literatura em que os autores mencionam que produtores lançam mão de agrotóxicos para o controle de insetos e fungos competitivos no cultivo de cogumelos (TIAN et al, 2016; DU et al, 2014; MENDONÇA et al, 2005; KASUYA et al, 2004; ZORZENON, 2000), nenhum estudo sobre possíveis resíduos em cogumelos foi encontrado na literatura nacional. Os estudos realizados no Brasil se limitam a estimar a eficácia no cultivo quando se utiliza agrotóxicos, inclusive avaliando moléculas banidas nacional e internacionalmente (CARVALHO et al, 2014; NAVICKIENE et al, 2007; ANDRADE; GRACIOLLI, 2005; ZIED et al, 2017) e essa literatura pode induzir o produtor a utilizar erroneamente produtos não autorizados.

Estudos realizados em outros países também relacionam o uso de agrotóxicos com a produtividade e o decaimento dos níveis após a aplicação no cultivo de cogumelos (NAVARRO, 2017; LIU et al, 2016; DU et al, 2017; DU et al, 2018).

Enquanto no Brasil não existem dados de monitoramento de agrotóxicos em cogumelos, vários trabalhos realizados em outros países reportam a presença desses resíduos nesse alimento.

Na Alemanha, o *Chemical and Veterinary Investigatory Office* (CVUA), faz um controle rígido dos resíduos de agrotóxicos e outros contaminantes em alimentos e após encontrarem quantidades significativas do repelente de insetos DEET (N, N-dimetil-meta-toluamida) nas espécies de cogumelos *chanterelle* e *boletus*, houve uma intensificação no monitoramento desses compostos em cogumelos. Em 2009, 55 cogumelos coletados em supermercados foram

analisados para 550 princípios ativos e foram detectados resíduos de agrotóxicos em 46 delas, 25 continham mais de um princípio ativo e 23 amostras excederam ao limite máximo permitido pelo país (WIELAND et al., 2010). Anualmente na China é realizado o monitoramento de risco dos resíduos de agrotóxicos em amostras comerciais de cogumelos e os resíduos de maior incidência são os das classes dos piretróides e dos organofosforados (CAO et al., 2016). Em outro trabalho, também realizado na China, o inseticida piriproxifem foi encontrado em amostras de shiitake em concentrações que variaram de 0,001 a 0,15 mg/kg (DU et al., 2013). No Egito, em um estudo sobre contaminantes químicos em cogumelos, foram pesquisados agrotóxicos organofosforados e organoclorados e em 40 amostras analisadas foram detectados malationa, lindano, tiometona e *p,p'*- DDT em níveis que, segundo os autores, estavam em acordo com os limites máximos permitidos (NOGAIM et al, 2011).

No programa de monitoramento realizado na Dinamarca entre 2004 e 2011, 8% das amostras de cogumelos analisadas apresentaram presença de mais de um agrotóxico (POULSEN et al 2017).

Na Polônia, um estudo evidenciou a presença dos organoclorados DDT, DDE, DDD e γ -HCH em 45 amostras de 3 diferentes espécies de cogumelos selvagens, demonstrando que os cogumelos podem ser potenciais biomarcadores de contaminação ambiental. Os níveis encontrados não foram altos e os autores concluíram que o consumo desses cogumelos provavelmente não representa uma ameaça ao consumidor. (GALGOWSKA; PIETRZAK-FIECKO, 2017).

1.4. Metodologia Analítica para análise de agrotóxicos

Os métodos utilizados para se analisar agrotóxicos podem ser classificados em dois grupos: os chamados métodos específicos, onde se determina um único resíduo ou seu principal metabólito e os métodos multirresíduos, que são capazes de analisar simultaneamente mais de um agrotóxico. Devido ao grande número de moléculas existentes, os métodos que apresentam o melhor custo/benefício são os multirresíduos. Como os resíduos de agrotóxicos, mesmo que em pequenas concentrações, podem ser tóxicos e causar danos à saúde humana, as metodologias analíticas para sua determinação e quantificação em alimentos

devem ter alta sensibilidade para detectá-los em baixos níveis. Desta maneira, a presença de resíduos de agrotóxicos em alimentos tem sido uma preocupação mundial e seu monitoramento em diversas matrizes tem sido realizado desde a década de 1960 (ANASTASSIADES et al, 2003).

O método de Mills, desenvolvido em 1960 para extração de organoclorados, foi o pioneiro para análises de multirresíduos (MILLS et al, 1963). Na década seguinte, a utilização de organofosforados e organonitrogenados nas lavouras motivou o desenvolvimento de métodos para determinação desses compostos (LUKE et al, 1975; BECKER, 1971). Na década de 1980, devido ao crescimento da conscientização pela preservação do meio ambiente, a comunidade científica priorizou o desenvolvimento de novos métodos com finalidade de eliminar o uso de solventes clorados devido à sua alta toxicidade. Nos anos 90 houve a busca pela redução do uso de outros solventes e culminou com o desenvolvimento das técnicas de extração em fluido supercrítico (SFE), dispersão em matriz de fase-sólida (MSPD), microextração em fase-sólida (SPME) entre outras. Apesar dos avanços dos métodos multirresíduos, características como a facilidade de extração de várias classes de agrotóxicos, recuperações aceitáveis de vários compostos ainda eram um grande desafio (ANASTASSIADES et al, 2003).

Em 2003, uma técnica de extração e limpeza muito simples e eficaz foi introduzida para análise multirresíduos de agrotóxicos (ANASTASSIADES et al, 2003). Essa técnica é conhecida como QuEChERS (do inglês Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) e oferece diversas vantagens sobre os métodos tradicionais de análise, pois apresenta recuperações elevadas para um grande número de compostos de diversas polaridades, não emprega grandes volumes de solventes, não utiliza solventes clorados e praticamente não utiliza vidrarias (LEHOTAY et al, 2005a). Os extratos obtidos podem ser analisados por cromatografia líquida ou por cromatografia gasosa, com a utilização de detectores diversos. Esse método envolve a extração com acetonitrila, seguida de uma partição líquido-líquido, após a adição de sulfato de magnésio e cloreto de sódio, que removem significativamente interferentes polares da matriz. Uma etapa de “clean-up” com adição de sorvente PSA (*primary-secondary amine*) é realizada. Essa técnica, com ou sem variações, tem sido utilizada para determinação de resíduos em diversas matrizes, tais como frutas e vegetais, óleos e gorduras e

alimentos com alto teor de açúcar (FURLANI et al, 2011; LOOSER et al, 2006; NGUYEN et al, 2007; NGUYEN et al, 2008; LESUEUR et al, 2008; LEHOTAY et al 2005a, LEHOTAY et al, 2005b; HÚŠKOVÁ et al, 2008; ANASTASSIADES et al, 2003; MEZCUA et al, 2009; CAO et al, 2016).

O método QuEChERS original foi modificado em 2005, com a introdução de tampão de acetato, e houve uma melhor recuperação dos analitos que dependem do pH e assim o escopo dos princípios ativos e matrizes foram ampliados. (LEHOTAY et al, 2005a). Este método foi adotado em 2007 como método oficial da *Association of Official Analytical Chemists* AOAC 2007.01 para a determinação de resíduos de pesticidas em alimentos.

Em 2007 a metodologia QuEChERS foi modificada com adição de tampão citrato (ANASTASSIADES et al, 2007) e em 2008 foi implantada como norma europeia (PN-EN 15662:2008).

Embora o método QuEChERS seja mais utilizado em análises de resíduos de agrotóxicos, sua versatilidade permite o seu emprego em extração de outras classes de compostos tais como HPAs (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos), micotoxinas e drogas veterinárias (SADOWSKA-RODZIK et al., 2014; STUBBINGS; BIGWOOD,2009; SOSPEDRA et al, 2010; TFOUNI et al, 2018; FURLANI et al, 2015).

Para análise de resíduos de agrotóxicos em cogumelos vários métodos multirresíduos têm sido propostos. A cromatografia a gás ou a líquido acopladas a espectrometria de massas tem sido as técnicas mais empregadas (NAN et al, 2015; CHANG et al, 2014; DU et al, 2013; CAO et al, 2016;). A metodologia QuEChERS de preparo de amostra, com ou sem modificações, tem sido a mais utilizada (DU et al, 2014; CAO et al, 2016; CENGIZ et al, 2014; TIAN et al 2016).

2. CONCLUSÃO

A utilização de agrotóxicos na fungicultura é uma prática em diversos países. No Brasil, a grande variedade de princípios ativos, a falta de legislação e de fiscalização pode favorecer a utilização desses produtos no cultivo dos cogumelos. Desta maneira, métodos analíticos para determinação de agrotóxicos em cogumelos devem ser eficientes para que os compostos sejam detectados em baixas concentrações e também devem atender aos requisitos da química verde,

com a utilização de pequenos volumes de reagentes químicos. O método QuEChERS é, sem dúvida, a técnica mais utilizada de extração e limpeza para análise de agrotóxicos em alimentos, representando assim o estado da arte na determinação multirresíduo.

3. AGRADECIMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRESI (2017) Associação Brasileira das Entidades e Empresa de Gastronomia, Hospedagem e Turismo. Disponível em: <http://abresi.com.br/2015/04/sao-paulo-ganha-evento-de-negocios-e-gastronomico-de-restaurantes-e-culinaria-asiatica>. Acesso em 01/02/2017.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJHBAHER, S. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC international**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

ANASTASSIADES, M.; SCHERBAUM, E.; TASDELEN, B.; STAJNBAHER, D. Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis. **Pesticide chemistry: Crop protection, public health, environmental safety. Weinheim: Wiley-VCH**, p. 439-458, 2007.

ANDRADE, G. C.; FREGUGLIA, R. M.; FURLANI, R. P.; TORRES, N. H.; TORNISIELO, V. L. Determination of pesticide residues in tomato using dispersive solid-phase extraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 9, p. 1701-1708, 2011.

ANDRADE, M. C. N.; GRACIOLLI, L. A. Control of saprophytic fungi in the shiitake edible mushroom cultivated in eucalyptus logs. **Acta Scientiarum-Agronomy**, v. 27, n. 2, p. 293-299, 2005.

ANPC (2016) Associação Nacional dos Produtores de Cogumelos. Disponível em: <http://www.anpc.org.br/site/index.php/14-anpc?start=30>. Acesso em 18/05/2016.

ANPC (2017) Associação Nacional dos Produtores de Cogumelos. Disponível em: <https://www.anpccogumelos.org/cogumelos>. Acesso em 24/01/2017.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2017). Agrotóxicos e Toxicologia: Monografias de Agrotóxicos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos> Acesso em 05/05/2017

BECKER, G. Simultaneous gas chromatographic determination of chlorinated hydrocarbons and phosphates in plant material. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**, v. 67, p. 125-126, 1971.

BORSOI, A.; DOS SANTOS, P. R. R.; TAFFAREL; L. E.; JÚNIOR; A. C. G. Agrotóxicos: histórico, atualidades e meio ambiente. **Acta Iguazu**, v. 3, n. 1, p. 86-100, 2014.

CAO, X.; LIU, S.; YANG, X.; LIU; Z.; LIU, L. A Modified QuEChERS Sample Preparation Method for Simultaneous Determination of 62 Pesticide Residues in Edible Fungi Using Gas Chromatography–Triple Quadrupole Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 9, n. 1, p. 263-274, 2016.

CARVALHO, M. A.; MARQUES, S. C.; MARTOS, E. T.; RIGITANO, R. L.; DIAS, E. S. Bioaccumulation of insecticide in *Agaricus subrufescens*. **Horticultura Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 159-162, 2014.

CENGIZ, M. F.; CATAL, M.; ERLER, F.; BILGIN, A. K. Rapid and sensitive determination of the prochloraz residues in the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. **Analytical Methods**, v. 6, n. 6, p. 1970-1976, 2014.

CHANG, Q.; FAN, C.; CHEN, H.; KANG, J.; WANG, M.; PANG, G. Determination of 187 pesticide residues in edible fungi by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 6, n. 12, p. 4288-4304, 2014.

CHANG, S. T.; MILES, P. G. Edible mushrooms and their cultivation. **Edible mushrooms and their cultivation**. 1989.

CISCATO, C. H. P.; BERTONI, G. A.; MONTEIRO, S. H. Pesticide residue monitoring of Brazilian fruit for export 2006–2007. **Food Additives and Contaminants**, v. 2, n. 2, p. 140-145, 2009.

COLES, P. Pennsylvania mushroom integrated pest management handbook. **The Pennsylvania State University**, 2002.

CONSEA – Conselho Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional. Mesa de Controvérsias sobre os Impactos dos Agrotóxicos na Soberania e Segurança Alimentar e Nutricional e o Direito Humano à Alimentação Adequada – Relatório final. 2014. ISBN 978-85-85142-45-2. Disponível em: <http://www4.planalto.gov.br/consea/eventos/mesa_de_controversias/mesa-de-controversias-sobre-agrotoxicos-2013/mesa_controversias_web.pdf> Acesso em 22/08/2016.

COSTA, R. The Chemistry of Mushrooms: A Survey of Novel Extraction Techniques Targeted to Chromatographic and Spectroscopic Screening. **Studies in Natural Products Chemistry**, p. 279-306, 2016.

DHOORIA, M. S Mite Pests of Mushrooms. In: **Fundamentals of Applied Acarology**. Springer Singapore, 2016. p. 341-347.

DU, P., WU, X., HE, H.; ZHANG, Y.; XU, J.; DONG, F.; LIU, X. Evaluation of the safe use and dietary risk of beta-cypermethrin, pyriproxyfen, avermectin,

diflubenzuron and chlorothalonil in button mushroom. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 8694, 2017.

DU, P.; LIU, X.; GU, X.; DONG, F.; XU, J.; KONG, Z.; ZHENG, Y. Residue behaviour of six pesticides in button crimini during home canning. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 31, n. 6, p. 1081-1088, 2014.

DU, P.; LIU, X.; GU, X.; DONG, F.; XU, J.; KONG, Z.; ZHENG, Y. Rapid residue analysis of pyriproxyfen, avermectins and diflubenzuron in mushrooms by ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 5, n. 23, p. 6741-6747, 2013.

DU, P.; WU, X.; XU, J.; DONG, F.; SHI, Y.; LI, Y.; ZHENG, Y. Different residue behaviors of four pesticides in mushroom using two different application methods. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 9, p. 8377-8387, 2018.

EIRA, A. F. Cultivo de cogumelos (compostagem, condução e ambiente). **Anais da III Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico**, p. 83-95, 2000.

FAO/WHO (2012) Codex Alimentarius Commission. Pesticide residues in food and feed. Codex pesticide residues in food online database. <http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/index.html>, Acesso em 22/08/2016.

FAO/WHO (2012) Codex Alimentarius Commission. Pesticide residues in food and feed. codex pesticide residues in food online database. <http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/index.html>, Acesso em 22/08/2016.

FAOSTAT data, 2019. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Agricultural Production – Crops Primary – Disponível em: < <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> > Acesso em 10/01/2019

FARIAS, L. A.; FÁVARO, D. I.T. Vinte anos de química verde: conquistas e desafios. **Química Nova**, 2011.

FERREIRA, J. A.; TALAMINE, V.; FACCO, J. F.; RIZZETTI, T. M.; FERREIRA, J. M. S.; OLIVEIRA, F. A.; NAVICKIENE, S. Determination of pesticide residues in coconut tree trunks by modified QuEChERS method and ultra-high-performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 7, n. 10, p. 4237-4245, 2015.

FIGUEIREDO, G. J.B. **Comercialização de Cogumelos Comestíveis**. In. VII Simpósio Internacional de Cogumelos no Brasil, 2015. Universidade de Sorocaba, Sorocaba-SP. Artigos e sinopses das palestras proferidas, pág. 154-155.

FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 64, n. 2, p. 149-154, 2005.

FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 154-157, 2007.

FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. Vitamins B 1 and B 2 contents in cultivated mushrooms. **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 816-819, 2008.

FURLANI, R. P. Z.; MARCILIO, K. M.; LEME, F. M.; TFOUNI, S. A. V. Analysis of pesticide residues in sugarcane juice using QuEChERS sample preparation and gas chromatography with electron capture detection. **Food chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1283-1287, 2011.

FURLANI, R. P.; DIAS, F. F.; NOGUEIRA, P. M.; GOMES, F. M.; TFOUNI, S. A.; CAMARGO, M. C. Occurrence of macrocyclic lactones in milk and yogurt from Brazilian market. **Food Control**, v. 48, p. 43-47, 2015.

GALGOWSKA, M.; PIETRZAK-FIEĆKO, R. Pesticide contaminants in selected species of edible wild mushrooms from the north-eastern part of Poland. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 52, n. 3, p. 214-217, 2017.

GOMES, D.; AKAMATSU, I.; SOUZA, E.; FIGUEIREDO, G. J. B. Censo paulista de produção de cogumelos comestíveis e medicinais. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 13, n. 1, 2016.

HÚŠKOVÁ, R.; MATISOVÁ, E.; KIRCHNER, M. Fast GC–MS pesticide multiresidue analysis of apples. **Chromatographia**, v. 68, n. 1, p. 49-55, 2008.

INAGRO, N.P. "MushTV." **Fungal diseases of mushroom and their control Factsheet 04/15** (2015).

INMETRO - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. DOQ-CGCRE-008: **Orientação sobre validação de métodos analíticos** - Documento de caráter orientativo. Rio de Janeiro, 2016. 31 p.

JARDIM, A. N.O.; CALDAS, E. D. Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food—Results from 2001 to 2010. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 607-616, 2012.

KASUYA, M. C. M., VANETTI, M. C. D., MANABE, A., SANTANA, C. C., MENDONÇA, M., Shiitake log cultivation in Brazil. **Shiitake Cultivation**, 74-80. 2004

LEHOTAY, S. J.; KOK, A. D.; HIEMSTRA, M.; BODEGRAVEN, P. V. Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 2, p. 595-614, 2005a.

LEHOTAY, S. J.; MASTOVSKÁ, K.; YUN, S. J. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 2, p. 630-638, 2005b.

LESUEUR, C.; KNITTL, P.; GARTNER, M.; MENTLER, A.; FUERHACKER, M. Analysis of 140 pesticides from conventional farming foodstuff samples after extraction with the modified QuEChERS method. **Food Control**, v. 19, n. 9, p. 906-914, 2008.

LIU, T.; ZHANG, C.; PENG, J.; ZHANG, Z.; SUN, X.; XIAO, H.; TU, K. Residual behaviors of six pesticides in shiitake from cultivation to postharvest drying process and risk assessment. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 47, p. 8977-8985, 2016.

LOOSER, N.; KOSTELAC, D.; SCHERBAUM, E.; ANASTASSIADES, M.; ZIPPER, H. Pesticide residues in strawberries sampled from the market of the Federal State of Baden-Württemberg in the period between 2002 and 2005. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v. 1, n. 2, p. 135-141, 2006.

LUKE, M. A.; FROBERG, J. E.; MASUMOTO, H. T. Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen, and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. **Journal-Association of Official Analytical Chemists**, v. 58, n. 5, p. 1020-1026, 1975.

MANZI, P.; GAMBELLI, L.; MARCONI, S.; VIVANTI, V.; PIZZOFERRATO, L. Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. **Food chemistry**, v. 65, n. 4, p. 477-482, 1999.

MENDONÇA, M. D.; KASUYA, M. C.; CADORIN, A.; VIEIRA, A. J Agaricus blazei cultivation for a living in Brazil. **SHIITAKE cultivation. Seoul: MushWorld**, p. 208-218, 2005.

MEZCUA, M.; FERRER, C.; GARCIA-REYES, J. F.; MARTINEZ-BUENO, M. J.; SIGRIST, M.; FERNANDEZ-ALBA, A. R. Analyses of selected non-authorized insecticides in peppers by gas chromatography/mass spectrometry and gas chromatography/tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 112, n. 1, p. 221-225, 2009.

MILES, P. G.; CHANG, S. T. **Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact**. CRC press, 2004.

MILLS, P. A.; ONLEY, J. H.; GAITHER, R. Rapid method for chlorinated pesticide residues in nonfatty foods. **Journal of the Association of Official Agricultural Chemists**, v. 46, n. 2, p. 186-&, 1963.

NAN, J.; WANG, J.; PIAO, X.; YANG, C.; WU, X.; QUINTO, M.; LI, D. Novel and rapid method for determination of organophosphorus pesticide residues in edible fungus using direct gas purge microsyringe extraction coupled on-line with gas chromatography–mass spectrometry. **Talanta**, v. 142, p. 64-71, 2015.

NAVARRO, M. J.; MERINO, L.; GEA, F. J. Evaluation of residue risk and toxicity of different treatments with diazinon insecticide applied to mushroom crops. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 52, n. 3, p. 218-221, 2017.

NAVICKIENE, S.; JUNIOR, O. P. A.; BRITO, N. M.; GRACIOLLI, L. A.; RIBEIRO, M. L. Determination of benomyl residues in shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*) by liquid chromatography with UV detection. **Journal of chromatographic science**, v. 45, n. 6, p. 340-344, 2007.

NGUYEN, T. D.; LEE, B. S.; LEE, B. R.; LEE, D. M.; LEE, G. H. A multiresidue method for the determination of 109 pesticides in rice using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) sample preparation method and gas chromatography/mass spectrometry with temperature control and vacuum concentration. **Rapid communications in mass spectrometry**, v. 21, n. 18, p. 3115-3122, 2007.

NGUYEN, T. D.; YU, J. E.; LEE, D. M.; LEE, G. H. A multiresidue method for the determination of 107 pesticides in cabbage and radish using QuEChERS sample preparation method and gas chromatography mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 110, n. 1, p. 207-213, 2008.

NOGAIM, Q.; AMRA, H.; ABOU-DONIA, M.; ABOU-ARAB, A. Occurrence of chemical contaminants in Egyptian edible mushroom. **Pakistan Journal of Life and Social Sciences**, v. 9, n. 2, p. 134-139, 2011.

PERES, F.; MOREIRA, J. C.; DUBOIS, G. S. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. **É veneno ou é remédio**, p. 21-41, 2003.

PN-EN 15662:2008 Foods of plant origin–Determination of pesticide residues using GC–MS and/or LC–MS(/MS) following acetonitrile extraction/partitioning and cleanup by dispersive SPE–QuEChERS-method.

Portal Instituto de economia agrícola, Banco de Dados. Disponível em: <http://ciagri.iea.sp.gov.br/nia1/subjetiva.aspx?cod_sis=1&idioma=1> Acesso em 10/01/2017.

POULSEN, M. E.; ANDERSEN, J. H.; PETERSEN, A.; JENSEN, B. H.. Results from the Danish monitoring programme for pesticide residues from the period 2004–2011. **Food Control**, v. 74, p. 25-33, 2017.

PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 1, p. 51-64, 2011.

QUEIROZ, S. C.; FERRACINI, V. L.; ROSA, M. A. Multiresidue method validation for determination of pesticides in food using QuEChERS and UPLC-MS/MS. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 185-192, 2012.

ROSA, L. H. Produção de semente de cogumelos comestíveis e medicinais. Dossiê Técnico - Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais CETEC. Disponível em <http://www.respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/downloadsDT/ODE=>. 2007.

SADOWSKA-ROCIK, A.; SURMA, M.; CIEŚLIK, E. Comparison of different modifications on QuEChERS sample preparation method for PAHs determination in black, green, red and white tea. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 2, p. 1326-1338, 2014.

SHAMSHAD, A. The development of integrated pest management for the control of mushroom sciarid flies, *Lycoriella ingenua* (Dufour) and *Bradysia ocellaris* (Comstock), in cultivated mushrooms. **Pest management science**, v. 66, n. 10, p. 1063-1074, 2010.

SILVA, A. C. D.; JORGE, N. Cogumelos: compostos biativos e propriedades antioxidantes. **UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde**, p. 375-384, 2011.

SILVA, A.C.& JORGE, N. Cogumelos: compostos biativos e propriedades antioxidantes. **UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde**, p. 375-384, 2011.

SILVA, A.C.S., Parâmetros industriais para a produção de *Pleurotus ostreatus*. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências – Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 136p. 2016.

SILVA, T. T.; DE SOUZA, O. S.; KAWAMOTO JR, L. T.; DA SILVA M. T. T. Mapeamento da cadeia produtiva do cogumelo no Alto Tietê. **South American Development Society Journal**, v. 4, n. 11, p. 121, 2018.

SOBHANARDAKANI, S. Residual Levels of Diazinon and Benomyl on Greenhouse Mushrooms. **Iranian Journal of Toxicology Volume**, v. 9, n. 29, 2015.

SOSPEDRA, I.; BLESA, J.; SORIANO, J. M.; MAÑES, J. Use of the modified quick easy cheap effective rugged and safe sample preparation approach for the simultaneous analysis of type A-and B-trichothecenes in wheat flour. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 9, p. 1437-1440, 2010.

STUBBINGS, G.& BIGWOOD, T. The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (QUick, Easy, CHEap, Effective, Rugged and Safe) approach. **Analytica Chimica Acta**, v. 637, n. 1-2, p. 68-78, 2009.

TERRA, F. H. B. A Indústria de Agrotóxicos no Brasil. **Dissertação** (Mestrado em Desenvolvimento Econômico). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 156f 2008.

TFOUNI, S. A.; REIS, R. M.; KAMIKATA, K., GOMES, F. M.; MORGANO, M. A.; FURLANI, R. P. Z. Polycyclic aromatic hydrocarbons in teas using QuEChERS and HPLC-FLD. **Food Additives & Contaminants: Part B**, v. 11, n. 2, p. 146-152, 2018.

TIAN, F.; LIU, X.; XU, J.; DONG, F.; ZHENG, Y.; HU, M.; WU, Y. Simultaneous Determination of Phoxim, Chlorpyrifos, and Pyridaben Residues in Edible Mushrooms by High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 9, n. 10, p. 2917-2924, 2016.

URBEN A F. Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Desenvolvimento**; 2004.

WIELAND, M.; HACKER, K.; BAUER, N.; SCHÜLE, E.; WAUSCHKUHN, C.; ROUX, D.; ANASTASSIADES, M. , Pesticide residues in fresh and dried mushrooms on the German market. **Chemisches und Veterinaruntersuchungsamt, Stuttgart, Baden-Württemberg, Germany**, 2010.

ZIED, D. C.; DOURADO, F. A.; DIAS, E. S.; PARDO-GIMÉNEZ, A. First study of hormesis effect on mushroom cultivation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 11, p. 195, 2017.

ZORZENON, F. J. Praga dos cogumelos comestíveis. **Instituto Biológico, Centro de Sanidade Vegetal**, p. 88-93, 2000.

CAPÍTULO 2 – OCORRÊNCIA DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM COGUMELOS COMESTÍVEIS UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL

Fernanda Moralez Leme Gomes, Silvia Amélia Verdiani Tfouni, Regina Prado Zanes Furlani

Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos, Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas SP, Brasil

O artigo será submetido à revista Food Control

ABSTRACT

Cultivation of mushrooms is susceptible to pests and diseases, causing losses to the producer, and the use of pesticides may be an option to solve these problems. In Brazil, the use of pesticides in mushroom cultivation is not regulated by the authorities and there is no MRL established for this culture. Although pesticides may control pests and diseases, their indiscriminate use may lead to the presence of residues in levels above the ones considered safe worldwide. In this manner, the objective of the present study was to validate an analytical method to analyze 9 pesticides residues (cyromazine, carbendazim, deltamethrin, malathion, diflubenzuron, thiophanate methyl, thiabendazole, prochloraz e dichlorvos) in mushrooms and evaluate the presence of these compounds in samples commercially available. Method involving QuEChERS (*quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*) sample preparation followed by separation by ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detector (UPLC-QqQ-MS/MS) was used and validated for the following parameters: linearity, precision, trueness, repetibility, matrix effect and limits of detection (LOD) and quantification (LOQ). Method presented good linearity and recoveries obtained for 3 spiking levels were between 68 and 114% with relative standard deviations < 20%. LOQ was established by the lowest spiking level and was 0.025 mg/kg for deltamethrin and 0.01mg/kg for the remaining pesticides. In order to monitor the levels of these pesticides in mushrooms commercialized in the city of Campinas,

SP, 42 samples were collected in supermarkets and analyzed for their presence. Although levels detected were low, samples analyzed are in disagreement with Brazilian regulation, which does not authorize the use of pesticides in mushrooms.

Keywords: edible fungi; pesticides; QuEChERS; method validation; carbendazim

RESUMO

O cultivo de cogumelos é suscetível a pragas e doenças o que pode ocasionar prejuízos ao produtor. A utilização de agrotóxicos pode ser uma opção para sanar esses problemas. Entretanto, no Brasil a utilização de agrotóxicos no cultivo de cogumelos não é regulamentada pelas autoridades e não existe limites máximos de resíduos (LMR) para essa cultura. Embora os agrotóxicos possam controlar pragas e doenças, a sua utilização indiscriminada pode resultar na presença de resíduos em níveis maiores que os limites seguros preconizados mundialmente. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi validar uma metodologia analítica para determinar resíduos de 9 agrotóxicos (carbendazim, diclorvós, diflubenzurom, tiofanato metílico, malationa, procloraz, deltametrina, ciromazina e tiabendazol) em cogumelos e verificar a ocorrência desses princípios ativos em amostras comercialmente disponíveis em Campinas, SP. O método de preparo de amostra QuEChERS combinado com UPLC acoplado a espectrometria de massas sequencial (UPLC- QqQ- MS/MS) foi validado incluindo os seguintes parâmetros: linearidade, precisão, exatidão, repetitividade, efeito de matriz e limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ). O método apresentou-se linear e os coeficientes de correlação (r) variaram entre 0,975 e 0,990 para a faixa de trabalho 0,010 a 0,125ug/mL. As recuperações obtidas para 3 níveis de fortificação foram entre 68 e 114% com desvios padrão relativos < 20%. Os LOQ foram de 0,025 mg/kg para deltametrina e 0,010 mg/kg para os demais agrotóxicos. O método validado foi aplicado para 42 amostras cogumelos comercializados na cidade de Campinas, São Paulo, cujos níveis detectados foram entre >LOD e 1,35 mg/kg. Embora os níveis encontrados sejam baixos, as amostras analisadas estão em desacordo com a regulamentação brasileira que não autoriza aplicação de agrotóxicos em cogumelos.

Palavras chave: cogumelos; pesticidas; QuEChERS; validação de metodologia; carbendazim

1. INTRODUÇÃO

A agricultura é muito importante para a economia no Brasil e a alta produtividade das lavouras é essencial para o crescimento econômico. A utilização de agrotóxicos é uma prática comum no país e a sua ação eficiente contra pragas que atacam as lavouras e a facilidade para a aquisição no comércio brasileiro favorece o consumo desses produtos. Dados da bibliografia nacional indicam que a utilização de agrotóxico no país tem um crescimento considerável a cada ano, mantendo o Brasil em primeiro lugar no ranking de consumo desde 2008. (Rigotto; Rocha, 2014; Gurgel et. al, 2017).

No entanto, o uso desses produtos, especialmente se utilizados de forma inadequada ou incorreta, pode trazer danos ou riscos para as próprias culturas, para os homens e animais e também para o meio ambiente. Devido à toxicidade dos agrotóxicos e com o propósito de manter a segurança dos alimentos, muitos países estabelecem limites máximos de resíduos (LMR) para essas substâncias (Lesueur et al, 2008). No Brasil os ingredientes ativos registrados têm seus limites para as diversas culturas estabelecidos e monitorados pelos ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) com o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) e da Saúde (MS), através da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), por meio do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Internacionalmente, o Codex Alimentarius, com o objetivo de proteger o consumidor e garantir práticas justas no comércio, também estabelece limites máximos para resíduos de agrotóxicos em determinados alimentos ou grupos de alimentos.

Os cogumelos são alimentos consumidos nos países orientais desde a antiguidade, e seu consumo no mundo ocidental aumenta a cada ano. Suas funções medicinais e seu alto valor nutricional são os fatores principais que despertaram o interesse do consumidor (Furlani: Godoy, 2007). Atualmente os cogumelos têm sido utilizados tanto por sua importância gastronômica, conferindo sabor e aroma, quanto pelo seu valor medicinal (Furlani: Godoy, 2008). Aproximadamente 100 países cultivam cogumelos comercialmente e a produção mundial cresce em média 6 a 7% ao ano. A FAO (Food and Agriculture

Organization) estimou que no ano de 2015 a produção mundial foi de 3,5 milhões de toneladas (Sobhanardakani, 2015).

A produção de cogumelos no Brasil é pequena e, apesar de o país possuir uma diversidade de resíduos agrícolas favoráveis para o cultivo e o setor esteja em expansão, o número de produtores é pequeno. A Associação Nacional dos Produtores de Cogumelos (ANPC) estimou, em 2013, cerca de 300 produtores, sendo sua maioria concentrada nos estados de São Paulo e Paraná (ANPC,2017). Três anos depois, o censo paulista de produção de cogumelos mostrou que a fungicultura tem se ampliado e mais de 500 produtores foram identificados em 93 municípios no estado (Gomes et al. 2016).

Limites máximos de resíduos (LMR) de agrotóxicos em cogumelos tem sido estabelecido em países da Comunidade Europeia, EUA, Japão e China (Chang et al, 2014). O Codex Alimentarius recomenda LMR em cogumelo para os inseticidas ciromazina, deltametrina, diflubenzurom, permetrina e para os fungicidas procloraz e tiabendazol (FAO/WHO, 2012).

Embora existam vários trabalhos realizados em diversos países demonstrando a presença de agrotóxicos em cogumelos (Wieland et al, 2010; CAO et al., 2016; Du et al., 2018; Nogaim et al, 2011; Poulsen et al 2017; Galgowska & Pietrzak-Fiecko,2017) no Brasil não existe estudo sobre ocorrência desses resíduos. Os poucos trabalhos publicados se restringem a avaliar alguns princípios ativos, inclusive moléculas banidas nacional e internacionalmente, para estimar a eficácia no cultivo (Carvalho et al, 2014; Navickiene et al, 2007; Andrade; Graciolli, 2005; Zied et al, 2017) e essa literatura pode induzir o produtor a utilizar erroneamente produtos não autorizados.

Em contato com profissionais da área de fungicultura do Estado de São Paulo obtivemos informações de quais agrotóxicos estão sendo utilizados durante a produção de cogumelos. Além disso, em testes preliminares realizados no Laboratório de Resíduos e Contaminantes do ITAL, foi verificada a ocorrência de resíduo de diflubenzurom em uma amostra de champignon de Paris adquirida no comércio local (dados não publicados), sendo que a utilização desse composto não é permitida para a produção de cogumelos conforme legislação nacional (ANVISA, 2017).

Tendo em vista a escassez de dados na literatura sobre a ocorrência de resíduos de agrotóxicos em cogumelos cultivados no Brasil e a importância dessas informações para a segurança da população, o objetivo deste estudo foi validar um método analítico baseado em Quechers-UPLC-QqQ-MS/MS para determinar resíduos de 9 agrotóxicos em cogumelos comestíveis cultivados no Brasil. Os dados obtidos permitirão averiguar se os produtores nacionais estão atendendo a recomendação da não utilização de agrotóxicos no cultivo de cogumelos e o conhecimento dos níveis presentes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras

Cogumelos *in natura*, de diferentes datas de colheita e produtores distintos, foram adquiridos em supermercados de Campinas, estado de São Paulo na região sudeste do Brasil, entre fevereiro e agosto de 2018. Um total de 42 amostras das espécies *Agaricus bisporus* (champignon de paris) (18), *Lentinula edodes* (shitake) (11) e *Pleurotus ostreatus* (shimeji) (13) foram coletadas e mantidas a -20°C até o momento das análises.

O método foi validado utilizando-se cogumelos das 3 espécies estudadas, recém-colhidos e cultivados sem o uso de agrotóxicos. Os cogumelos livres de agrotóxicos, (amostras branco) foram liofilizados por 53 horas a -55°C com pressão de 10^{-1} a 10^{-2} mbar, triturados e armazenados em freezer à -20°C até o momento das análises, o processo de liofilização foi aplicado apenas nas amostras branco que foram utilizadas para a validação. O cogumelo contém alto teor de enzimas e água o que o torna um alimento altamente perecível. A utilização de amostras liofilizadas permitiu a não deterioração das mesmas durante o processo de validação, evitando assim possíveis interferências de compostos que poderiam ser formados pela degradação do cogumelo durante as análises de validação. As amostras comerciais não foram liofilizadas, pois a homogeneização e a extração ocorreram no mesmo momento, de maneira que não houve tempo hábil para a degradação do cogumelo. Na Figura 4 estão apresentadas as amostras branco.

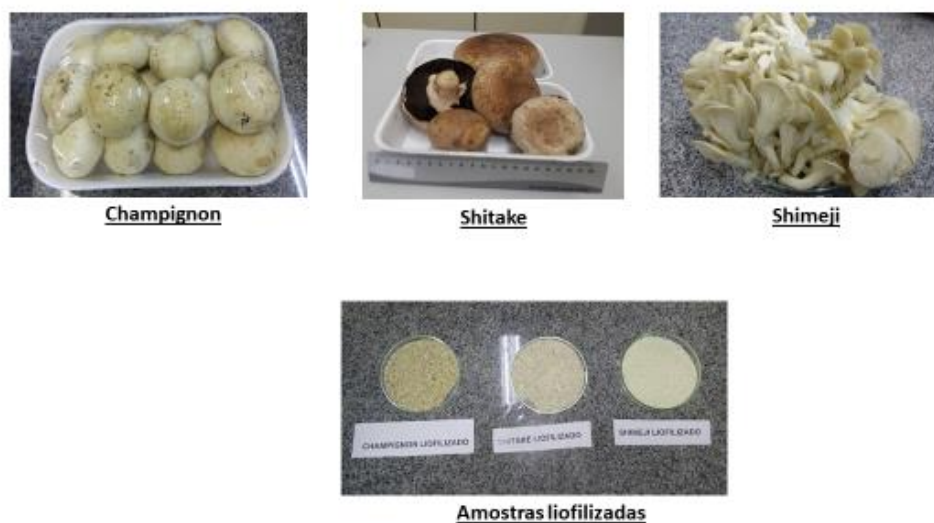


Figura 4: Imagens das amostras branco utilizadas para validação.

2.2. Padrões e Reagentes

Os padrões de diflubenzurom, diclorvós, tiabendazol, malationa, tiofanato-metílico, deltametrina e procloraz, ciromazina e carbendazim foram adquiridos de Sigma-Aldrich e Dr. Ehrenstorfer GmbH e Chem Service, todos com pureza superior a 95%. A escolha dos princípios ativos estudados nesse trabalho foi baseada na lista do Codex Alimentarius que estabelece Limite Máximo de Resíduo (LMR) para cinco dos agrotóxicos selecionados (diflubenzurom, deltametrina, ciromazina, procloraz e tiabendazol) (FAO/WHO, 2012) e também em informações obtidas de profissionais da fungicultura.

As soluções estoque dos padrões foram preparadas em metanol na concentração de 1000 ug.mL^{-1} levando-se em consideração a pureza. A partir das soluções estoque foram preparadas soluções de trabalho, em metanol nas concentrações de 0,01; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1 e $0,125 \text{ ug.mL}^{-1}$ para os nove compostos.

Os solventes orgânicos utilizados nesse trabalho foram grau HPLC e adquiridos de J.T. Baker, EUA. Foram utilizados NaCl grau analítico (Merck, Alemanha) e o MgSO_4 anidro, pureza $> 98\%$ (Synth, Brasil). O MgSO_4 foi aquecido em um forno de mufla por 5h a 500°C para remoção de ftalatos e umidade. O sorvente PSA (amina primária secundária) ($40 \mu\text{m}$ de granulometria) foi obtido de Varian®.

2.3. Metodologia para determinação dos agrotóxicos

2.3.1. Condições cromatográficas

Foi utilizado um cromatógrafo a líquido de alta eficiência, Waters® USA, modelo ACQUITY equipado com sistema de bombeamento quaternário, injetor automático e acoplado a um espectrômetro de massas tipo triplo quadrupolo com fonte de ionização por eletrospray (UPLC-ESI-MS/MS) modelo Xevo® TQD. O sistema de separação e detecção foi controlado pelo software MassLynx 4.1 para a aquisição e tratamento de dados. A coluna analítica utilizada para a separação dos agrotóxicos foi de fase estacionária reversa Acquity UPLC®BEH (ethylenebridgedhybrid) C-18 (100 mm x 2,1 mm, 1,7 µm) da marca Waters®. A coluna foi mantida em temperatura de 30°C e o volume de injeção foi de 10 µL.

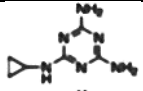
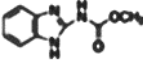
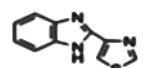
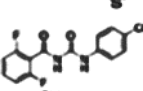
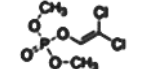
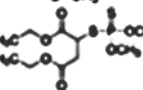
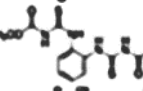
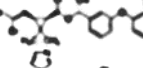
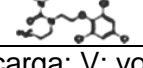
A fase móvel utilizada foi água deionizada (MiliQ) (fase A) e metanol (fase B) ambas contendo 0,1% ácido fórmico com fluxo de 0,3ml/min. O gradiente iniciou-se com 90% da Fase A e decresceu para 10% em 5 minutos, permanecendo por 2 min. O sistema retornou a condição inicial reestabelecendo-se por 2,5 minutos, sendo o tempo de corrida total de 10 minutos (OSHITA; JARDIM, 2014).

2.3.2. Aquisição dos íons e condições do espectrômetro de massas

Foram selecionados dois íons produto para cada composto: um para identificação e outro para quantificação (SANTE, 2017). A escolha foi realizada com base na literatura (CHANG et al, 2014; CAO et al,2016) e nos dados disponíveis na base de dados Quanpedia Database™. O analisador de massa/carga (m/z) foi operado em SRM (monitoramento de reações selecionadas) com ionização por electrospray em modo positivo para todos os compostos. A energia no capilar do electrospray foi de 2,06 kV. O gás utilizado para dessolvatação foi nitrogênio à 200 °C com fluxo de 500 Lh⁻¹ e foi empregado argônio como gás de colisão com fluxo de 5 Lh⁻¹.

Os íons precursores e fragmentos selecionados bem como os parâmetros de operação do espectrômetro de massas estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Tempos de retenção (t_R), transições do monitoramento de reações selecionadas (SRM), energias de colisão (ECol) e do cone (EC) para cada transição, e estruturas moleculares dos agrotóxicos estudados.

Composto	Estrutura molecular	t_R	Íon precursor (m/z)	Íon produto 1 (quantificação) (m/z)	EC / ECol (V)	Íon produto 2 (confirmação) (m/z)	EC / ECol (V)
Ciromazina		0,41	166,2	60,2	38 19	108,1	38 19
Carbendazim		0,46	191,2	132,1	33 18	160,1	33 28
Tiabendazol		0,45	201,3	175,0	51 30	131,0	51 25
Diflubenzurom		3,23	310,7	158,0	32 8	141,0	32 8
Diclorvós		1,18	221	109,0	34 34	79,0	34 22
Malationa		2,56	330,4	127,0	20 24	99,0	20 12
Tiofanato-Metílico		1,2	342,4	151,0	28 46	93,0	28 22
Deltametrina		5,29	505,2	93,2	23 46	280,9	23 12
Procloraz		3,2	376,7	70,1	22 34	307,1	22 16

m/z: massa/carga; V: voltagem.

2.3.3. Preparo da amostra utilizando QuEChERS

O método QuEChERS para extração e limpeza dos compostos foi a descrita por Anastassiades et al (2003). Para a extração 10 g de amostra *in natura* (amostra comercial) ou 1 g de amostra liofilizada (amostra branco) foram adicionadas em tubos de polietileno. Nas amostras liofilizadas 10 mL de água deionizada foram adicionados para garantir o efeito “salting out”. Foi realizada análise de umidade das amostras de cogumelos branco *in natura* e obteve-se um valor maior que 95% para as três espécies, portanto a adição de 10mL de água após a liofilização garantiu que as amostras liofilizadas apresentassem o mesmo conteúdo de água da amostra *in natura*. Ao tubo adicionou-se então 10 mL de acetonitrila e agitou-se manualmente por 30 segundos em seguida acrescentou-se 4 g de MgSO₄ anidro e 1 g de NaCl, agitou-se em vórtex por 1 minuto e centrifugou-se por 3 minutos a 4500 rpm. Uma alíquota de 4 mL do sobrenadante foi transferida para um tubo de centrifuga de 15 mL contendo 100mg de PSA e 300mg de MgSO₄

anidro. O tubo foi então agitado em vórtex por 1 minuto e centrifugado por 3 minutos a 4500 rpm. Do sobrenadante obtido, 1 mL foi retirado, transferido para tubo de vidro e evaporados até *secura* sob fluxo de nitrogênio. O extrato foi ressuscitado em 1 mL de metanol 1% Ácido Fórmico, filtrado em membrana Millex® com poros de 0,22 µm para injeção em cromatógrafo. O fluxograma da etapa de extração e limpeza está apresentado na Figura 5.

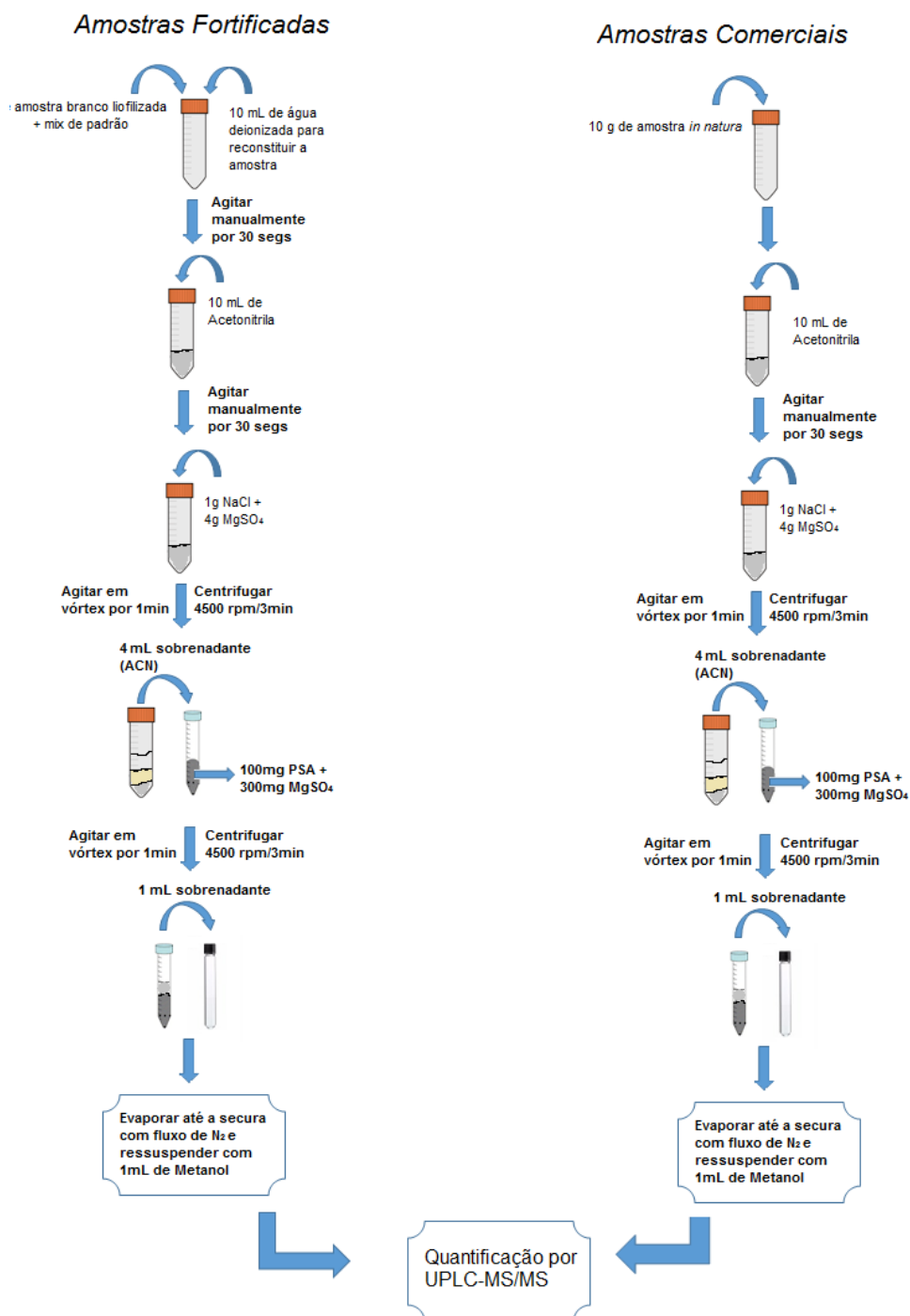


Figura 5. Esquema das etapas de extração e limpeza.

2.3.4. Validação da Metodologia

Os parâmetros considerados para a validação foram linearidade, efeito matriz, seletividade, exatidão e precisão que são recomendados pelo guia da Comunidade Europeia para análise de resíduos de agrotóxicos SANTE/11813/2017. O método foi validado para as 3 diferentes espécies de cogumelos mais comercializadas no Brasil: *A. bisporus*, *L. edodes* e *P. ostreatus*. Todas as análises para a validação foram conduzidas com amostras liofilizadas.

A linearidade foi avaliada com a construção de curvas analíticas em metanol com 5 níveis de concentração na faixa de 0,01 a 0,125 mg/Kg. Para a avaliação do efeito de matriz foram construídas curvas analíticas no extrato de “amostras branco” que teve como finalidade avaliar a presença de um aumento ou supressão da ionização dos agrotóxicos que pode ser causada pela presença de co-extrativos. O efeito matriz (EM) foi calculado segundo a **Equação 1** (Sapozhnikova; Lehotay, 2013). Ambas as curvas foram injetadas em 5 replicatas.

$$EM = \left[\frac{(\text{inclinação matriz} - \text{inclinação solvente})}{\text{inclinação solvente}} \right] \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

A seletividade foi avaliada qualitativamente pela comparação dos cromatogramas dos extratos das “amostras branco”, dos padrões em solvente e dos extratos das amostras adicionadas de padrão. (Ribani et. al, 2004)

Para a avaliação da exatidão e precisão (repetitividade e reprodutibilidade) da metodologia foram realizados ensaios de recuperação em replicatas independentes onde as “amostras branco” foram fortificadas em 3 níveis de concentração que variaram de 0,01 a 0,10 mg/Kg. A repetitividade e reprodutibilidade foram avaliadas pelos desvios padrão relativos (RSD %) associados aos testes de recuperação realizados no mesmo dia e em dias diferentes, respectivamente. Os LOQ foram estabelecidos como o menor nível de fortificação onde se obteve exatidão e precisão adequadas. As transições de quantificação e de confirmação dos compostos também foram observadas nesse nível de concentração, conforme demonstrado da Figura 6.

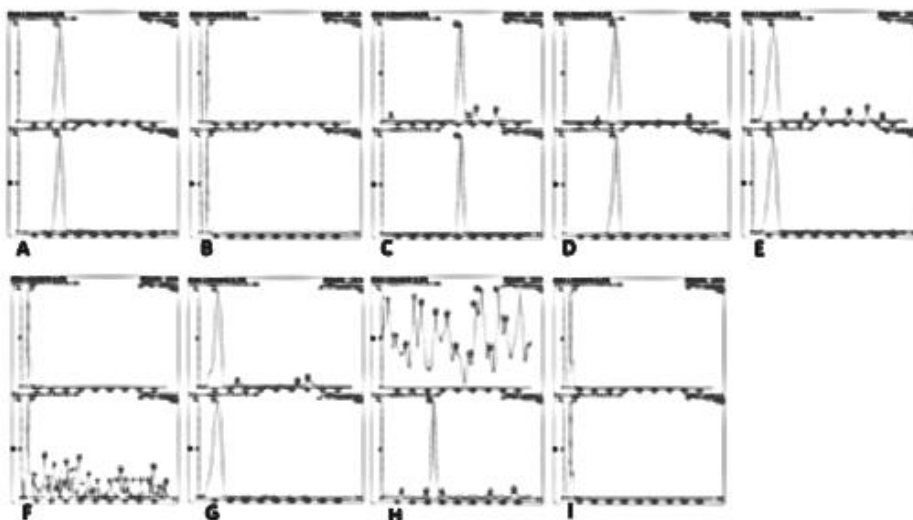


Figura 6. Picos das duas transições para cada composto Malationa (A); Ciromazina (B); Deltametrina (C); Procloraz (D); Diclorvós (E); Carbendazim (F); Tiofanato metílico (G); Diflubenzurom (H); Tiabendazol (I)

As estimativas do LOD foram calculadas segundo a Equação 2, onde DPa é a estimativa do desvio padrão (n=5) da interceptação (coeficiente linear) das curvas construídas nas matrizes e IC é inclinação da curva de calibração (coeficiente angular).

$$LOD = \frac{DPa \times 3}{IC} \quad \text{Equação 2}$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Validação da metodologia

Os parâmetros de linearidade e efeito de matriz foram determinados a partir dos resultados da média de 5 injeções das curvas de calibração com 5 pontos de concentrações, foram construídas curvas para solvente (metanol) e para extratos de cada matriz. Os coeficientes de correlação linear (r) ficaram entre 0,990 e 0,999 para a curva no solvente e entre 0,975 e 0,999 para as curvas construídas nas matrizes. Os resíduos decorrentes do ajuste das curvas analíticas não foram superiores a $\pm 20\%$, valor indicado pelo guia SANTE/11813/2017 e, portanto não foi necessário realizar ajustes para os modelos. Em relação ao efeito de matriz, como se pode observar na Figura 7, para a maioria dos compostos estudados houve

efeito de matriz negativo, indicando supressão da ionização dos compostos. Apenas o composto diclorvós na matriz shimeji apresentou efeito de matriz positivo. Para os agrotóxicos malationa e procloraz o efeito de matriz para as três espécies de cogumelos estudadas não diferiu significativamente dos resíduos nas amostras. Devido à presença de efeito de matriz para a maioria dos compostos estudados a quantificação em extratos foi realizada com a curva de calibração construída em extrato de matriz.

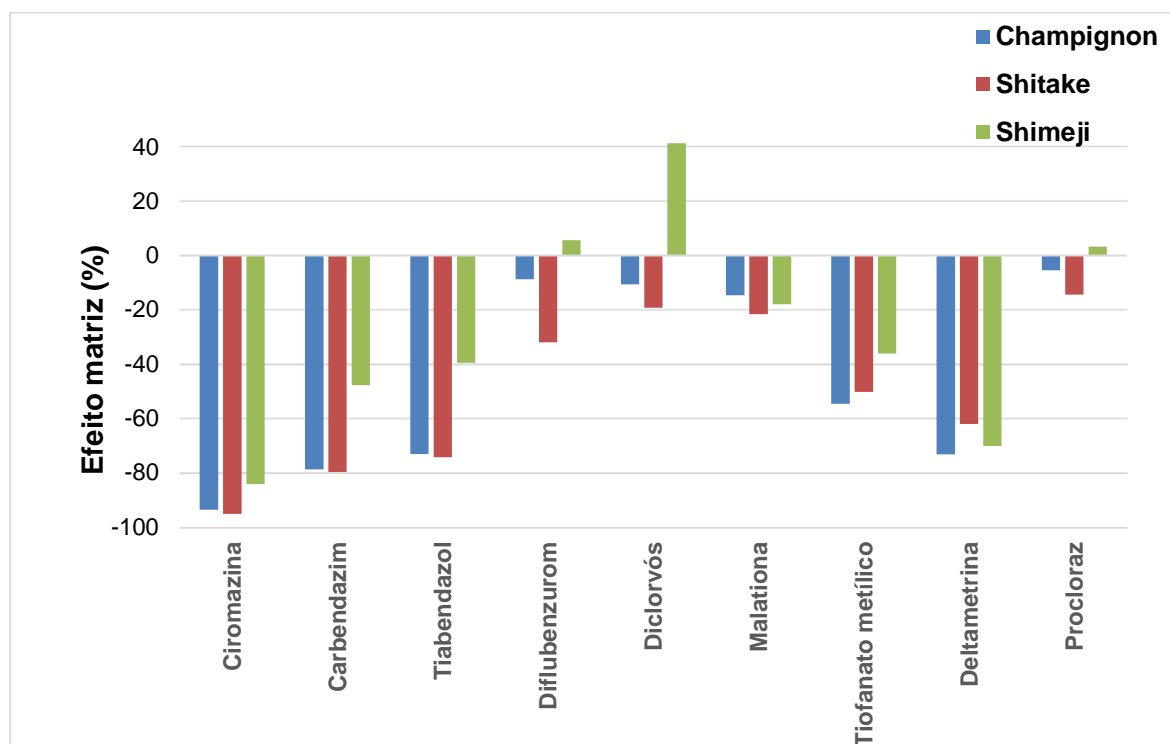


Figura 7. Efeito de Matriz (%) dos agrotóxicos estudados em cogumelos

A Tabela 2 mostra os valores obtidos nos estudos de exatidão e precisão. Podemos observar que as recuperações para os compostos estudados em 3 níveis de concentração ficaram entre 68 e 114 %. Os valores de recuperação demonstram uma exatidão adequada do método, com valores de acordo com o recomendado pelo guia SANTE/11813/2017 que sugere valores entre 70 e 120%. As estimativas do desvio padrão relativo (RSD) para repetitividade (mesmo dia) e para reprodutibilidade (dias diferentes) ficaram abaixo de 20%, indicando uma precisão apropriada segundo o guia SANTE/11813/2017.

Os limites de detecção (LOD) variaram entre 0,001mg/Kg para tiofanato metílico em shitake e 0,015 mg/kg para deltametrina, em champignon de paris. Os

limites de quantificação (LOQ) foram estabelecidos como menor nível de fortificação no qual se obteve exatidão e precisão e os resultados estão apresentados na Tabela 2. Os resultados da validação foram considerados satisfatórios e a método foi considerado adequado para o monitoramento de resíduos dos agrotóxicos estudados em níveis inferiores aos preconizados pelo CODEX para cogumelos (FAO/WHO, 2012).

Tabela 2. Parâmetros de validação do método

Composto	LMR ^a mg/kg	LOQ	Fortificação mg/kg	Champignon				Shitake				Shimeji				
				R % (n=10)	RSD _r (n=5)	RSD _R (n=5)	LOD	R % (n=10)	RSD _r (n=5)	RSD _R (n=5)	LOD	R % (n=10)	RSD _r (n=5)	RSD _R (n=5)	LOD mg/kg	
Ciromazina	7	0,01	0,01	98	11	14	0,004	82	9	16	0,00	97	18	3	0,005	
			0,05	95	9	16		75	3	11		4	75	17		3
			0,1	93	7	15		91	9	10			88	6		12
Carbendazim	-	0,01	0,01	92	11	17	0,005	87	7	18	0,00	99	12	10	0,003	
			0,05	108	10	4		105	13	6		5	98	4		4
			0,1	96	14	11		102	5	7			101	7		9
Tiabendazol	60	0,01	0,01	97	5	8	0,004	85	5	7	0,00	100	9	8	0,003	
			0,05	81	6	5		97	7	10		6	79	8		5
			0,1	95	6	10		87	3	10			98	4		8
Diflubenzurom	0,3	0,01	0,01	103	9	8	0,009	95	10	9	0,00	94	20	14	0,004	
			0,05	107	4	4		101	5	7		6	85	7		4
			0,1	107	10	12		103	9	20			83	4		3
Diclorvós	-	0,01	0,01	68	5	5	0,002	110	2	12	0,00	107	18	4	0,003	
			0,05	82	9	10		69	7	9		4	82	10		8
			0,1	77	2	7		81	3	11			72	12		2
Malationa	-	0,01	0,01	101	6	9	0,003	97	9	7	0,00	71	7	5	0,004	
			0,05	92	7	7		104	8	5		3	70	10		8
			0,1	87	5	5		104	8	15			87	16		6
Tiofanato Metílico	-	0,01	0,01	108	5	9	0,005	82	3	3	0,00	94	19	16	0,002	
			0,05	105	10	9		74	5	10		1	85	12		8
			0,1	89	4	2		75	6	9			73	2		6
Deltametrina	0,05	0,02 5	0,025	72	6	10	0,015	77	6	7	0,01	114	9	11	0,012	
			0,05	78	7	5		93	2	4		3	97	14		6
			0,1	76	3	10		73	4	7			90	15		5
Procloraz	3	0,01	0,01	108	5	10	0,003	112	2	5	0,00	88	8	8	0,002	
			0,05	113	6	4		106	1	17		3	92	4		10
			0,1	108	5	9		112	3	9			90	10		6

R (%): Recuperação foi calculada utilizando a média de todas as amostras do estudo de recuperação; RSD_r: Desvio padrão relativo em condições de repetitividade (mesmo dia); RSD_R - Desvio padrão relativo em condições de reprodutibilidade (dias diferentes); LOD: Limite de detecção; LOQ: Limite de Quantificação; LMR: limite máximo de resíduo; ^a fonte: CODEX(FAO/WHO, 2012).

3.2. Aplicação da metodologia em amostras comerciais

O método validado foi aplicado para 42 amostras comercializadas em supermercados da cidade de Campinas-SP, Brasil. As amostras foram procedentes de diversas localidades da região Sudeste e Sul do país (São Paulo, Minas Gerais e Paraná) e as espécies coletadas foram champignon de paris, shitake e shimeji, consideradas as mais comercializadas popularmente (ISHIKAWA et al, 2017).

Como podemos observar na Tabela 3, resíduo de Ciromazina não foi detectado (<LOD) em nenhuma das amostras analisadas. Resíduos de deltametrina e diclorvós foram encontrados em níveis entre o LOQ e o LOD. Quatorze (14) amostras não apresentaram resíduos de nenhum dos compostos estudados (<LOD). Entretanto, em 12 amostras foram quantificados resíduos de pelo menos um dos compostos analisados e em 6 delas foram encontrados 2 resíduos. Em 16 amostras foram encontrados traços de resíduos (>LOD e <LOQ) para ao menos um dos nove agrotóxicos analisados. Resíduos de tiofanato metílico e malationa foram detectados em 12 amostras distintas, com valores entre >LOD e 0,33 mg/Kg e >LOD e 0,04 mg/Kg, respectivamente. Resíduo de carbendazim foi encontrado em 9 amostras e os níveis foram de >LOD até 1,35 mg/Kg.

Comparando-se com dados da literatura, observamos que os níveis de resíduos de malationa encontrados nesse trabalho estão muito próximos ao reportados por Cao e colaboradores (2016) e segundo os autores, esse agrotóxico é comumente utilizado em cultivos de cogumelos na China para controle de pragas (CAO et al, 2016). Em relação aos resíduos de carbendazim, um monitoramento, realizado na Irlanda do Norte, apontou a presença desse composto em 38 amostras de um total de 145 analisadas, em níveis de 0,1 a 7,9 mg/kg, valor esse bem acima do encontrado nesse estudo (Mitchell & Kilpatrick, 2003).

Embora não exista regulamentação no Brasil para a utilização de agrotóxicos em cogumelos, os níveis de resíduos encontrados nas amostras analisadas estão abaixo dos LMR preconizados pelo CODEX (FAO/WHO, 2012).

Tabela 3. Resíduos de agrotóxicos em cogumelos comercializados na cidade de Campinas - SP

Espécie	Origem da amostra	Ciromazina ¹	Carbendazim ² mg/Kg (RSD)	Tiabendazol ² mg/Kg (RSD)	Diflubenzurom ¹ mg/Kg (RSD)	Diclorvós ¹	Malatationa ¹ mg/Kg (RSD)	Tiofanato metílico ² mg/Kg (RSD)	Deltametrina ¹	Procloraz ² mg/Kg (RSD)	
Champignon	Sorocaba-SP	ND	ND	ND	ND	ND	Tr	Tr	ND	ND	
	Louveira-SP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Tr	ND	ND	
	Andradas-MG	ND	0,13 (0,01)	ND	0,29 (0,04)	ND	Tr	ND	ND	ND	
	Castro-PR	ND	ND	ND	ND	ND	Tr	ND	Tr	ND	
	Salto-SP	ND	0,75 (0,02)	ND	ND	ND	Tr	0,33 (0,10)	ND	ND	
	Pinhalzinho-SP	ND	ND	Tr	0,01 (0,00)	ND	Tr	Tr	ND	0,02 (0,00)	
	Pinhalzinho-SP	ND	0,46 (0,02)	ND	0,17 (0,06)	ND	Tr	ND	ND	Tr	
	Pinhalzinho-SP	ND	0,44 (0,04)	ND	ND	ND	Tr	ND	ND	Tr	
	Pinhalzinho-SP	ND	ND	ND	ND	ND	Tr	ND	ND	0,06 (0,01)	
	Louveira-SP	ND	ND	ND	ND	ND	Tr	ND	ND	Tr	
	Piracicaba-SP	ND	ND	ND	ND	ND	Tr	ND	ND	ND	
	Castro-PR	ND	ND	ND	ND	ND	Tr	ND	ND	ND	
	Cabreúva-SP	ND	0,34 (0,06)	ND	ND	ND	Tr	0,06 (0,00)	ND	Tr	
	Mogi das Cruzes-SP	ND	ND	ND	ND	ND	Tr	ND	ND	ND	
	Mogi das Cruzes-SP	ND	ND	ND	ND	ND	Tr	ND	ND	ND	
	Cabreúva-SP	ND	ND	ND	ND	ND	Tr	ND	ND	ND	
	Mogi das Cruzes-SP	ND	ND	ND	ND	ND	Tr	ND	ND	ND	
	Andradas-MG	ND	1,35 (0,14)	0,49 (0,05)	ND	ND	Tr	Tr	ND	ND	
	Shimeji	Tuiuti-SP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		Mogi das Cruzes-SP	ND	ND	ND	ND	ND	0,03 (0,00)	ND	Tr	ND
Suzano-SP		ND	ND	ND	ND	ND	0,04 (0,00)	ND	ND	ND	
Pinhalzinho-SP		ND	ND	ND	ND	Tr	Tr	ND	ND	ND	
Andradas-MG		ND	Tr	Tr	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Cabreúva-SP		ND	ND	ND	ND	ND	Tr	ND	ND	ND	
Andradas-MG		ND	ND	ND	ND	ND	Tr	ND	ND	ND	
Mogi das Cruzes-SP		ND	0,01 (0,00)	ND	Tr	Tr	Tr	Tr	ND	ND	
Piracicaba-SP		ND	ND	ND	ND	ND	Tr	ND	ND	ND	
Cabreúva-SP		ND	ND	ND	ND	ND	Tr	ND	ND	ND	
Sorocaba-SP		ND	0,01 (0,00)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
Salto-SP		ND	Tr	ND	ND	Tr	Tr	ND	ND	ND	
Sorocaba-SP		ND	ND	ND	ND	ND	ND	Tr	ND	ND	
Mogi das Cruzes-SP		ND	ND	ND	ND	ND	Tr	ND	ND	ND	
Cabreúva-SP		ND	ND	ND	ND	ND	Tr	Tr	ND	ND	
Sorocaba-SP		ND	ND	ND	ND	ND	Tr	ND	ND	ND	
Shitake	Salto-SP	ND	Tr	ND	ND	ND	Tr	ND	ND	ND	
	Salto-SP	ND	Tr	ND	ND	ND	Tr	ND	ND	ND	
	Piracicaba-SP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	Andradas-MG	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Tr	ND	ND	
	Sorocaba-SP	ND	ND	ND	ND	ND	Tr	Tr	ND	ND	
	Andradas-MG	ND	ND	ND	ND	ND	Tr	Tr	ND	ND	
	Tuiuti-SP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	Tuiuti-SP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	

¹: inseticida; ²: fungicida; LOD: limite de detecção; RSD: desvio padrão relativo, n=2; ND: não detectado <LOD; Tr: <LOQ e >LOD

A presença dos resíduos também pode ser explicada pela falta de registro para o uso de agrotóxico no cultivo de cogumelos, pois se trata de uma cultura com suporte fitossanitário insuficiente (minor crops), com baixo retorno econômico, levando as empresas produtoras de agrotóxicos a não solicitarem registro. Além da utilização indevida de agrotóxicos, a presença dessas substâncias nas amostras analisadas pode ter origem na utilização de substratos provenientes de resíduos agrícolas de culturas que tenham recebido aplicação de agrotóxico. A maioria dos resíduos agrícolas gerados no Brasil é derivada das produções de cana-de-açúcar, laranja, milho, soja entre outras culturas que são exportadas pelo país. Esses resíduos são ricos em água, carbono e nitrogênio, e podem ser utilizados como substrato no cultivo de cogumelos (SILVA, 2016). O bagaço de cana-de-açúcar tem sido largamente utilizado como substrato ou camada de cobertura no cultivo de cogumelos, e a aplicação de defensivos na lavoura de cana pode gerar bagaço contaminado com resíduos de agrotóxicos. Estudos demonstram que a utilização de substrato contaminado com agrotóxicos no cultivo pode levar a cogumelos com resíduos (DU et al, 2018; DU et al, 2017; CARVALHO et al, 2014).

4. CONCLUSÕES

QuEChERS combinado com UPLC-QqQ-MS/MS mostrou-se adequado para análise de resíduos de agrotóxicos em cogumelos, uma matriz ainda pouco estudada quanto a ocorrência desses compostos, reforçando a versatilidade do método de preparo de amostra que tem sido amplamente utilizado para análise de resíduos em diversas matrizes.

O método foi validado para a determinação de resíduos de 9 agrotóxicos seguindo os requisitos SANTE/11813/2017, o qual apresentou linearidade, exatidão e precisão aceitáveis, e os limites de quantificação foram adequados se basearmos nos LMR estabelecidos por agências internacionais.

Os baixos níveis dos resíduos detectados nas amostras comerciais indicam que a utilização de agrotóxicos ocorre na fungicultura nacional, mas possivelmente não representam um risco ao consumidor. Porém é necessário que haja a regulamentação da utilização dos agrotóxicos em cogumelos para que o mesmo seja utilizado com eficiência e segurança, tanto para o produtor, como para o meio ambiente e o consumidor final.

5. AGRADECIMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade, M. C. N.; Gracioli, L. A. Control of saprophytic fungi in the shiitake edible mushroom cultivated in eucalyptus logs. **Acta Scientiarum-Agronomy**, v. 27, n. 2, p. 293-299, 2005.

ANPC (2017) Associação Nacional dos Produtores de Cogumelos. Disponível em: <https://www.anpccogumelos.org/cogumelos>. Acesso em 24/01/2017.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2017). Agrotóxicos e Toxicologia: Monografias de Agrotóxicos. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos> > Acesso em 23/04/2018

Cao, X., Liu, S., Yang, X., Liu, Z., & Liu, L. (2016). A modified quechers sample preparation method for simultaneous determination of 62 pesticide residues in edible fungi using gas chromatography–triple quadrupole mass spectrometry. **Food analytical methods**, 9(1), 263-274.

Carvalho, M. A., Marques, S. C., Martos, E. T., Rigitano, R. L., & Dias, E. S. (2014). Bioaccumulation of insecticide in *Agaricus subrufescens*. **Horticultura Brasileira**, 32(2), 159-162.

Chang, Q., Fan, C., Chen, H., Kang, J., Wang, M., & Pang, G. (2014). Determination of 187 pesticide residues in edible fungi by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, 6(12), 4288-4304.

Commission, E. (2018). Guidance Document on Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues and Analysis in Food and Feed. SANTE/11813/2017.

Du, P., Wu, X., Xu, J., Dong, F., Shi, Y., Li, Y., ... & Zheng, Y. (2018). Different residue behaviors of four pesticides in mushroom using two different application methods. **Environmental Science and Pollution Research**, 25(9), 8377-8387.

Du, P., Wu, X., He, H., Zhang, Y., Xu, J., Dong, F., .& Liu, X. (2017). Evaluation of the safe use and dietary risk of beta-cypermethrin, pyriproxyfen, avermectin, diflubenzuron and chlorothalonil in button mushroom. **Scientific Reports**, 7(1), 8694.

FAO/WHO (2012) Codex Alimentarius Commission. Pesticide residues in food and feed. Codex pesticide residues in food online database. <http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/index.html>

Frenich, A. G., Vidal, J. M., Pastor-Montoro, E., & Romero-González, R. (2008). High-throughput determination of pesticide residues in food commodities by use of ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 390(3), 947-959.

Furlani, R. P. Z.; Godoy, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 154-157, 2007.

Furlani, R. P. Z.; Godoy, H. T. Vitamins B 1 and B 2 contents in cultivated mushrooms. **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 816-819, 2008

Gałgowska, M., & Pietrzak-Fiećko, R. (2017). Pesticide contaminants in selected species of edible wild mushrooms from the north-eastern part of Poland. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, 52(3), 214-217.

Gurgel, A. M., Guedes, C. A., Gurgel, I. G. D., & da Silva Augusto, L. G. (2017). Reflexos da perda do controle estatal sobre os agrotóxicos no Brasil e sua regulação pelo mercado. **Revista Eletrônica de Comunicação, Informação & Inovação em Saúde**, 11(3).

Ishikawa, N.K., Vargas-Isla, R., Gomes, D.; Menolli Jr., N. (2017). Principais cogumelos comestíveis cultivados e nativos do estado de São Paulo. **Pesquisa & Tecnologia** 14(2).

Lesueur, C.; Knittl, P.; Gartner, M.; Mentler, A.; Fuerhacker, M. Analysis of 140 pesticides from conventional farming foodstuff samples after extraction with the modified QuEChERS method. **Food Control**, v. 19, n. 9, p. 906-914, 2008.

Liu, T., Zhang, C., Peng, J., Zhang, Z., Sun, X., Xiao, H., ... & Tu, K. (2016). Residual behaviors of six pesticides in shiitake from cultivation to postharvest drying process and risk assessment. **Journal of agricultural and food chemistry**, 64(47), 8977-8985.

Lu, Z., Fang, N., Zhang, Z., Wang, B., Hou, Z., Lu, Z., & Li, Y. (2018). Simultaneous Determination of Five Neonicotinoid Insecticides in Edible Fungi Using Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (UHPLC-MS/MS). **Food Analytical Methods**, 11(4), 1086-1094.

Meng, Z., Shi, Z., Liang, S., Dong, X., Lv, Y., & Sun, H. (2015). Rapid screening and quantification of cyromazine, melamine, ammeline, ammeline, cyanuric acid, and dicyandiamide in infant formula by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry and triple quadrupole mass spectrometry. **Food control**, 55, 158-165.

Mitchell, S. H., & Kilpatrick, M. (2003). Occurrence of pesticide residues in mushrooms in Northern Ireland, July 1997-January 1999. **Food Additives & Contaminants**, 20(8), 716-719.

Moreno-González, D., Huertas-Pérez, J. F., Gámiz-Gracia, L., & García-Campaña, A. M. (2015). High-throughput methodology for the determination of 33 carbamates in herbal products by UHPLC-MS/MS. **Food analytical methods**, 8(8), 2059-2068.

Nan, J., Wang, J., Piao, X., Yang, C., Wu, X., Quinto, M., & Li, D. (2015). Novel and rapid method for determination of organophosphorus pesticide residues

in edible fungus using direct gas purge microsyringe extraction coupled on-line with gas chromatography–mass spectrometry. **Talanta**, 142, 64-71.

Navarro, M. J., Merino, L., & Gea, F. J. (2017). Evaluation of residue risk and toxicity of different treatments with diazinon insecticide applied to mushroom crops. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, 52(3), 218-221.

Navickiene, S.; Junior, O. P. A.; Brito, N. M.; Graciolli, L. A.; Ribeiro, M. L. Determination of benomyl residues in shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*) by liquid chromatography with UV detection. **Journal of chromatographic science**, v. 45, n. 6, p. 340-344, 2007.

Nogaim, Q.; Amra, H.; Abou-Donia, M.; Abou-Arab, A. Occurrence of chemical contaminants in Egyptian edible mushroom. **Pakistan Journal of Life and Social Sciences**, v. 9, n. 2, p. 134-139, 2011

Oshita, D.; Jardim, M. I. C.S.F. Comparison of different sorbents in the QuEChERS method for the determination of pesticide residues in strawberries by LC–MS/MS. **Chromatographia**, v. 77, n. 19-20, p. 1291-1298, 2014.

Poulsen, M. E.; Andersen, J. H.; Petersen, A.; Jensen, B. H.. Results from the Danish monitoring programme for pesticide residues from the period 2004–2011. **Food Control**, v. 74, p. 25-33, 2017

Queiroz, S. C., Ferracini, V. L., & Rosa, M. A. (2012). Multiresidue method validation for determination of pesticides in food using QuEChERS and UPLC-MS/MS. **Quimica Nova**, 35(1), 185-192.

Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004

Rigotto, R. M., & Rocha, M. M. (2014). Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública Pesticide use in Brazil and problems for public health Uso de pesticidas en Brasil y los problemas para. **Cad. Saúde Pública**, 30(7), 1-3.

Rizzetti, T. M., Kemmerich, M., Martins, M. L., Prestes, O. D., Adaime, M. B., & Zanella, R. (2016). Optimization of a QuEChERS based method by means of central composite design for pesticide multiresidue determination in orange juice by UHPLC–MS/MS. **Food chemistry**, 196, 25-33.

Sapozhnikova, Y., & Lehotay, S. J. (2013). Multi-class, multi-residue analysis of pesticides, polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons, polybrominated diphenyl ethers and novel flame retardants in fish using fast, low-pressure gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica chimica acta**, 758, 80-92.

SILVA, A.C.S., Parâmetros industriais para a produção de *Pleurotus ostreatus*. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências – Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 136p. 2016.

Sobhanardakani, S. Residual Levels of Diazinon and Benomyl on Greenhouse Mushrooms. **Iranian Journal of Toxicology Volume**, v. 9, n. 29, 2015.

Wieland, M.; Hacker, K.; Bauer, N.; Schüle, E.; Wauschkuhn, C.; Roux, D.; Anastassiades, M. 2010. Pesticide residues in fresh and dried mushrooms on the German market. Chemisches und Veterinaruntersuchungsamt, Stuttgart, Baden-Württemberg, Germany. <http://cvusa.xn-untersuchungsamt-bw-nzb.de/pdf/MushroomPM036.pdf>. Acesso em 20/09/2014.

Zied, D. C., Dourado, F. A., Dias, E. S., & Pardo-Giménez, A. (2017). First study of hormesis effect on mushroom cultivation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 33(11), 195.

ANEXOS

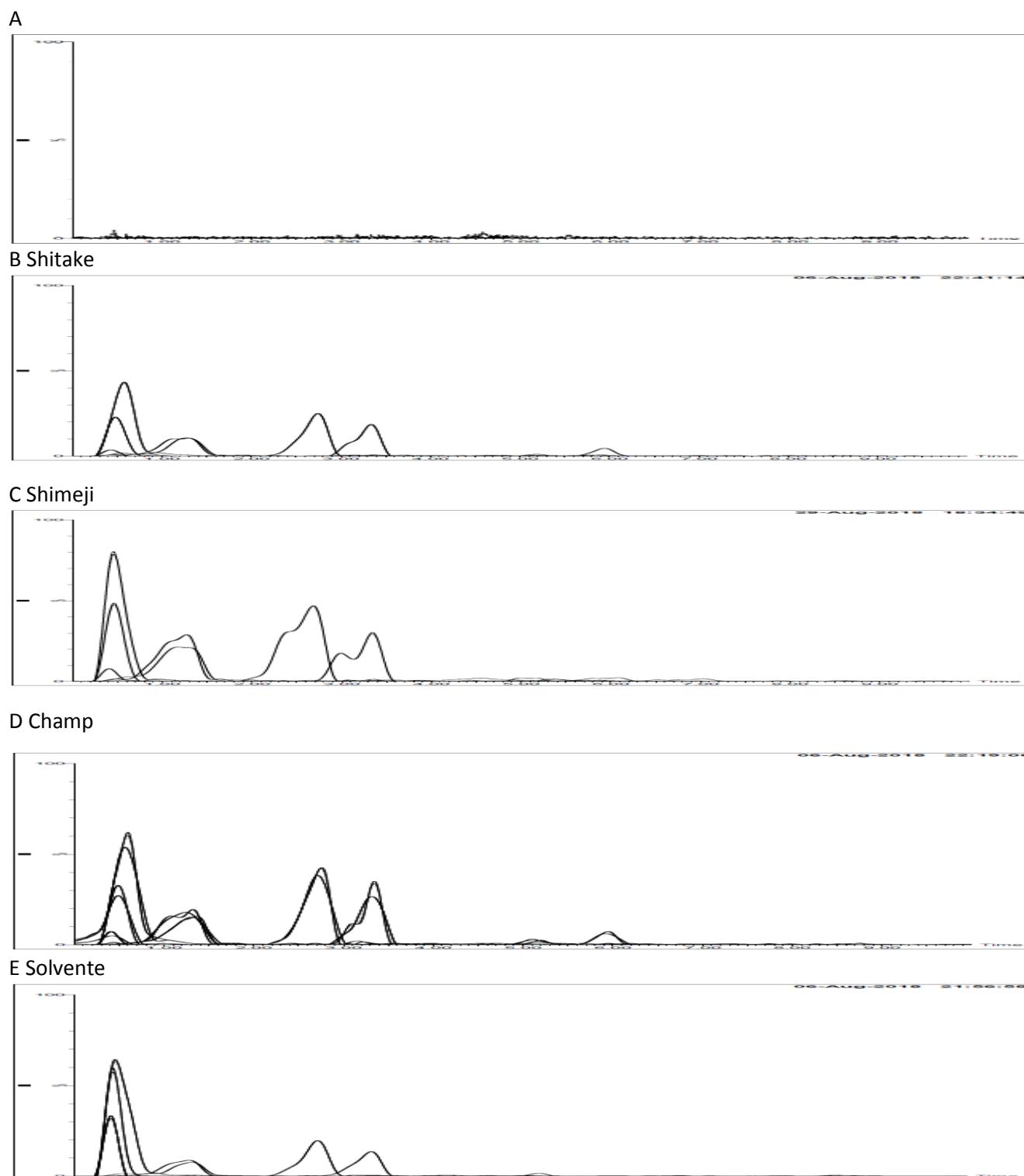


Figura 5. Perfil cromatográfico das amostras (TIC): amostra branco (A); Solução padrão na concentração 0,125 mg/kg para deltametrina e 0,100 mg/kg para os demais agrotóxicos nas matrizes shitake (B), shimeji (C), champinon (D) e no solvente (metanol 1% ác. fórmico) (E) Condições cromatográficas: Coluna: Acquity UPLC®BEH C-18 (100 mm x 2,1 mm, 1,7 μ m) Fase Móvel : Metanol 0,1 % ác. fórmico : Água 0,1% ác. fórmico (gradiente conforme descrito no capítulo 2); Vazão: 0,3ml/min.

Tabela 1. – Equações das retas das curvas de calibração em metanol e nas matrizes estudadas.

Composto	Solvente (metanol)	Champignon	Shitaki	Shimeji
Ciromazina	$Y = 570005 X + 185,1$	$Y = 3572 X + 20,5$	$Y = 2751 X + 6,9$	$Y = 8908 X + 43,9$
Carbendazim	$Y = 1666979 X + 415,4$	$Y = 35326 X + 42,4$	$Y = 33624 X + 42,0$	$Y = 87181 X - 106,8$
Tiabendazol	$Y = 166230 X + 662,0$	$Y = 45838 X + 51,4$	$Y = 43956 X + 42,4$	$Y = 104214 X + 196,8$
Diflubenzurom	$Y = 2555 X + 12,8$	$Y = 2279 X + 16,7$	$Y = 1731 X + 9,4$	$Y = 2829 X + 16,6$
Diclorvós	$Y = 60817 X + 302,7$	$Y = 54299 X + 169,7$	$Y = 49064 X + 89,6$	$Y = 85943 X - 70,4$
Malationa	$Y = 59017 X + 48,7$	$Y = 50343 X + 11,8$	$Y = 46271 X + 148,4$	$Y = 48362 X - 73,0$
Tiofanato metílico	$Y = 115166 X + 480,2$	$Y = 52104 X + 283,7$	$Y = 57319 X + 281,3$	$Y = 73616 X + 383,7$
Deltametrina	$Y = 6250 X + 42,7$	$Y = 1804 X + 7,3$	$Y = 2559 X + 33,9$	$Y = 2018 X + 13,2$
Procloraz	$Y = 88149 X + 278,7$	$Y = 83315 X + 352,5$	$Y = 75460 X + 365,3$	$Y = 90968 X + 234,9$

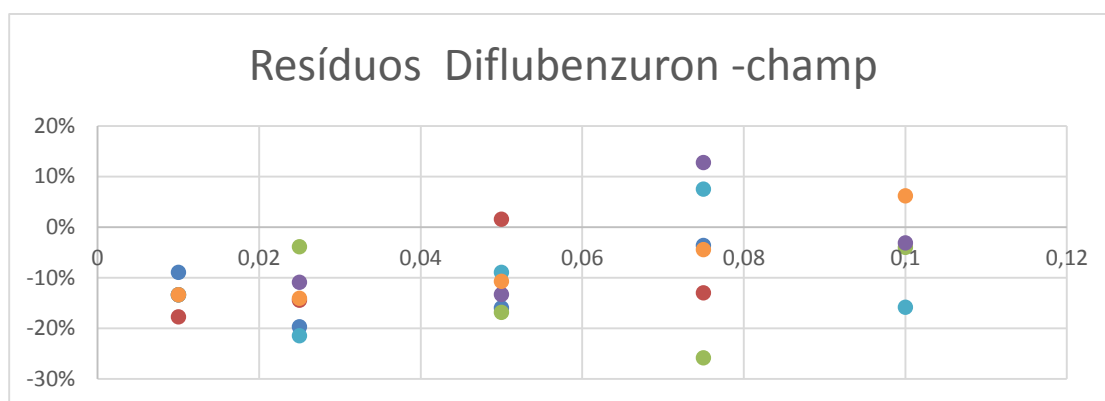


Figura 9: Gráfico típico de resíduos em amostra de champignon

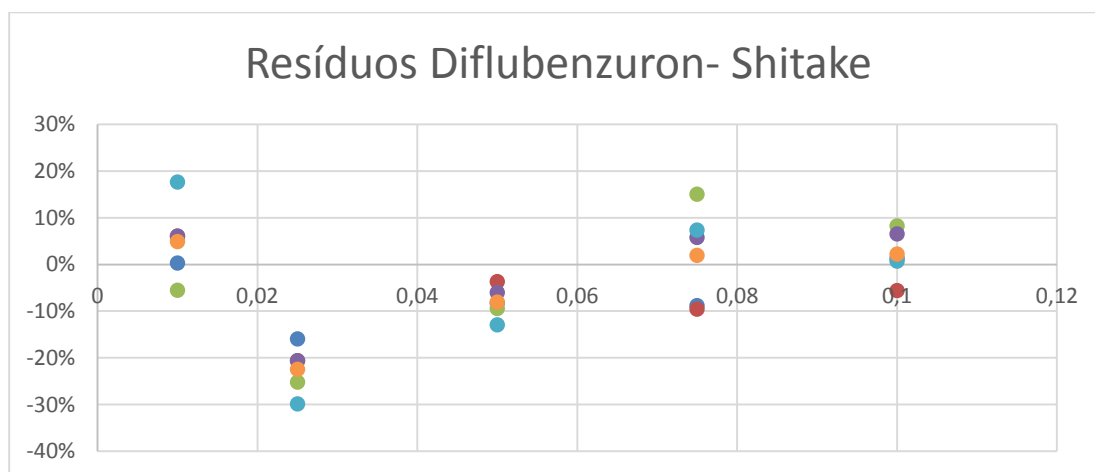


Figura 10: Gráfico típico de resíduos em amostra de shitake

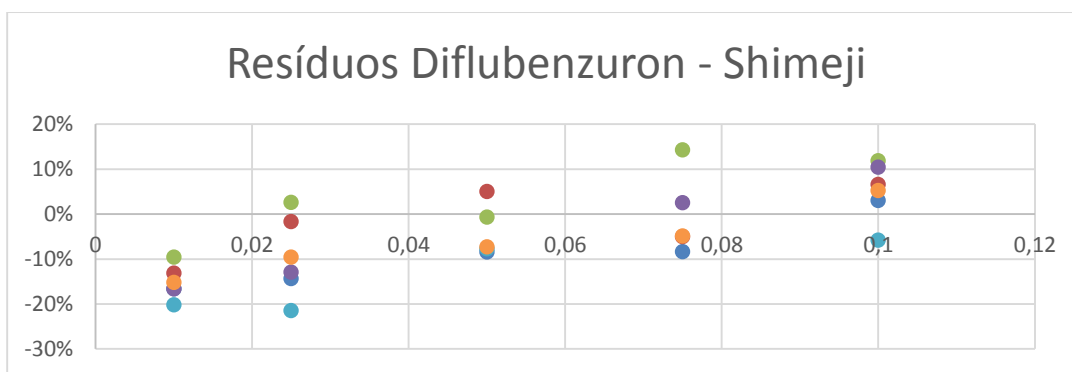


Figura 11: Gráfico típico de resíduos em amostra de shimeji

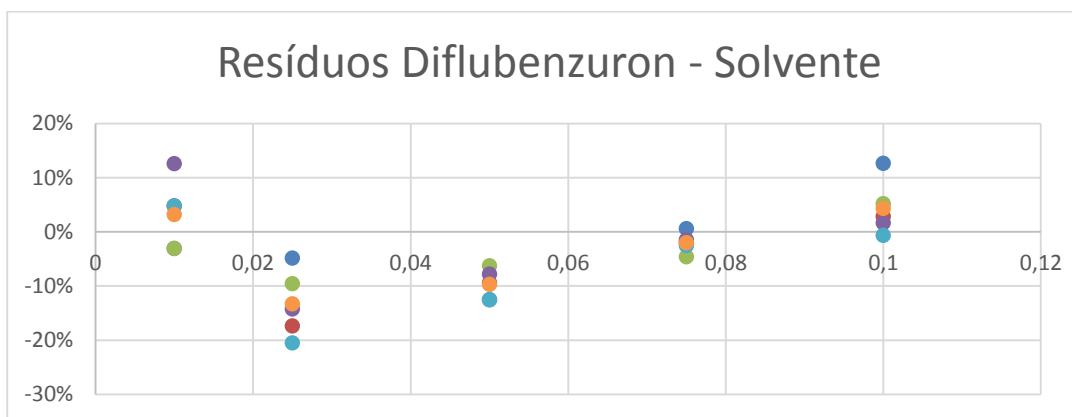


Figura 12: Gráfico típico de resíduos em solvente

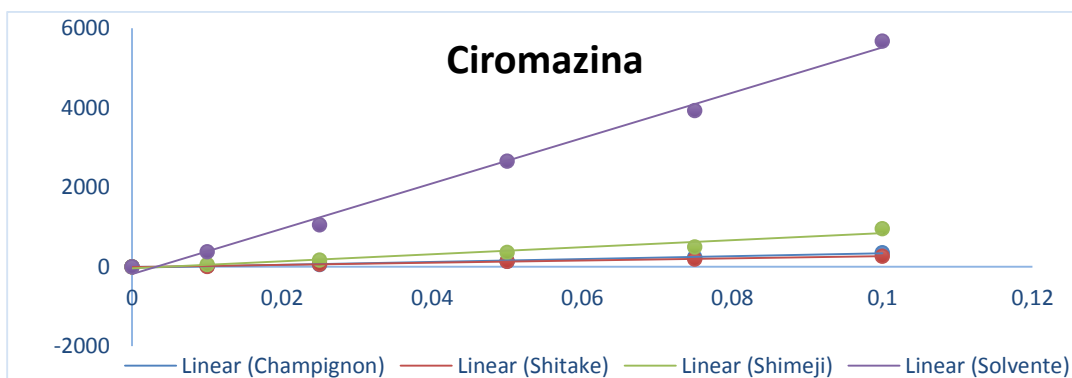


Figura 13: Curvas padrões nas três matrizes e solvente (Ciromazina)

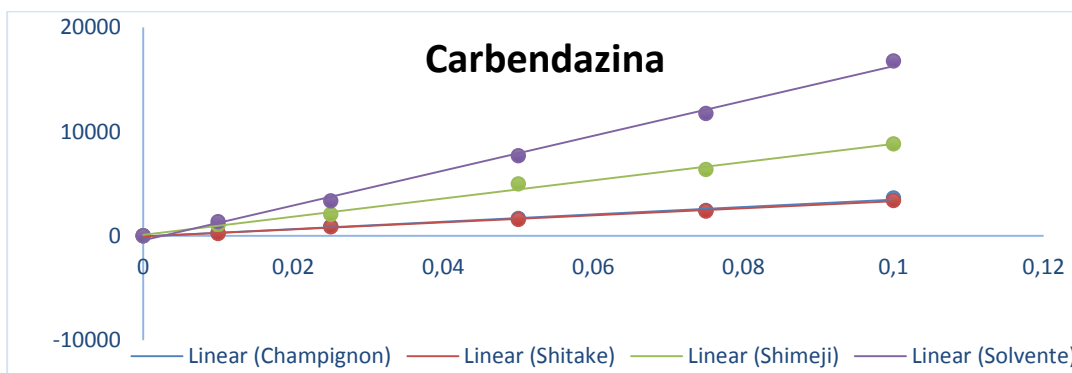


Figura 14: Curvas padrões nas três matrizes e solvente (Carbendazina)

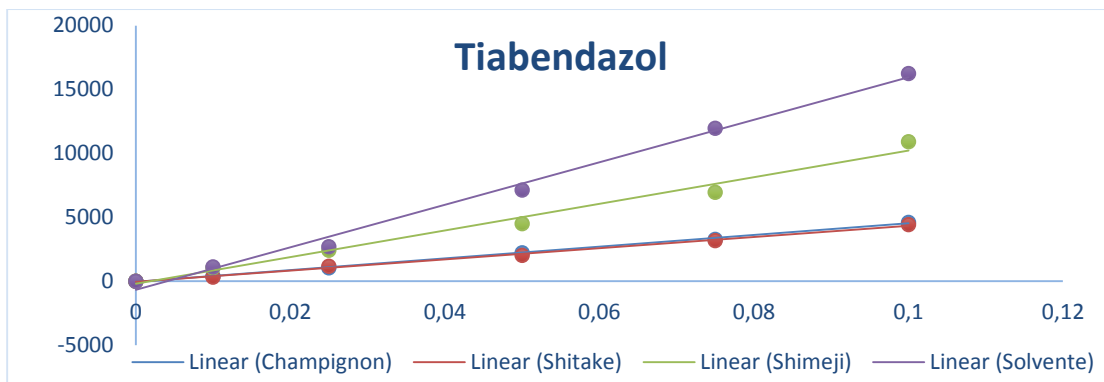


Figura 15: Curvas padrões nas três matrizes e solvente (Tiabendazol)

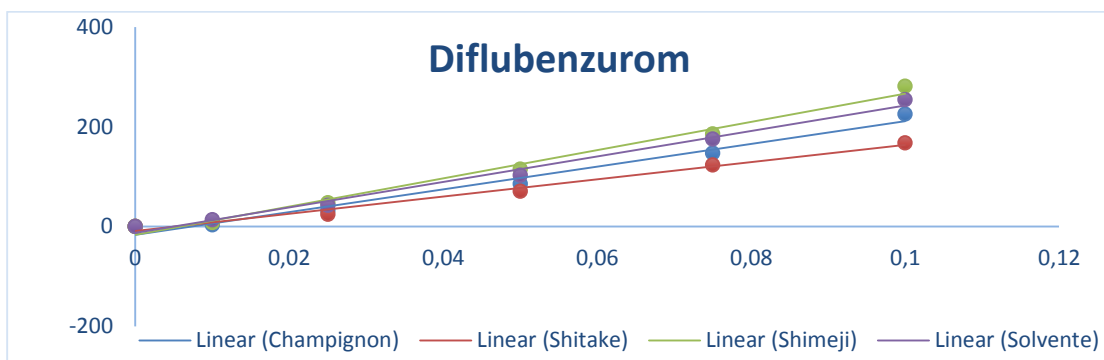


Figura 16: Curvas padrões nas três matrizes e solvente (Diflubenzuron)

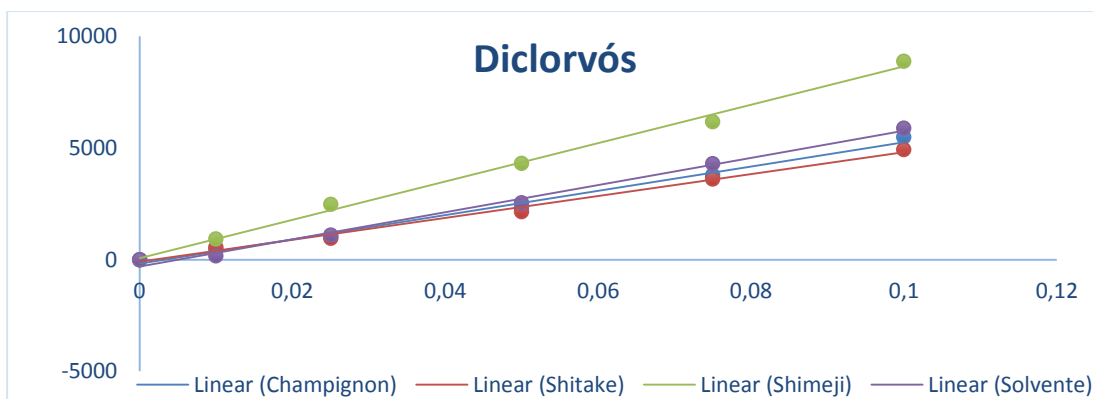


Figura 17: Curvas padrões nas três matrizes e solvente (Diclorvós)

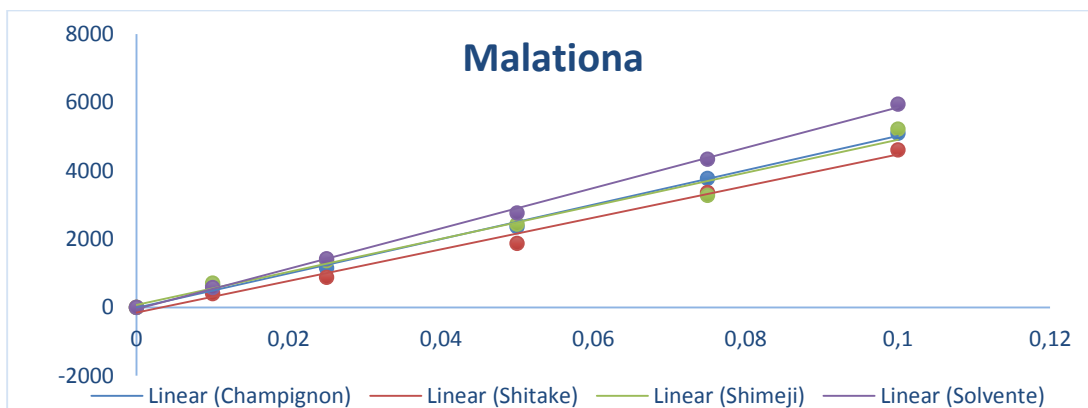


Figura 18: Curvas padrões nas três matrizes e solvente (Malationa)

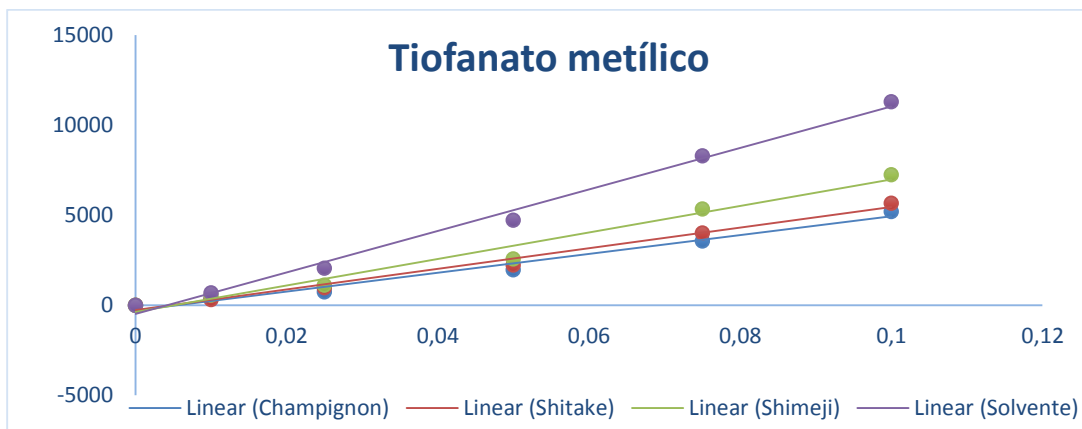


Figura 19: Curvas padrões nas três matrizes e solvente (Tiofanato metílico)

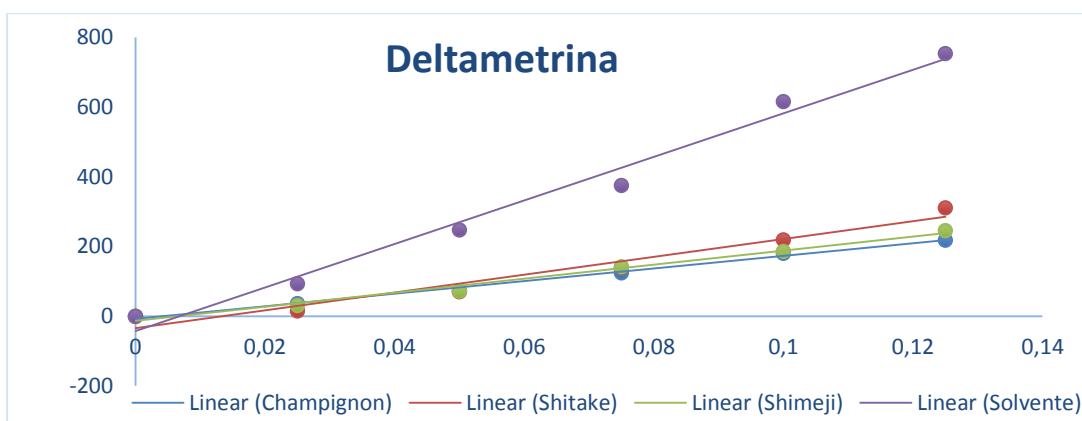


Figura 20: Curvas padrões nas três matrizes e solvente (Deltametrina)

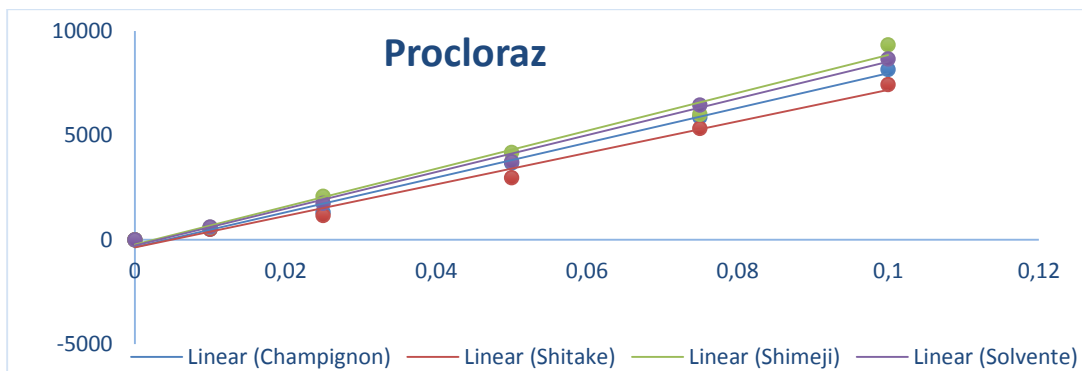


Figura 21: Curvas padrões nas três matrizes e solvente (Procloraz)