

Jaylei Monteiro Gonçalves

**ESPÉCIES COMESTÍVEIS DE COGUMELOS: PERFIL MINERAL,
BIOACUMULAÇÃO DE METAIS E PROCEDIMENTO DE PREPARO
DE MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para a obtenção do título de doutor em Vigilância Sanitária.

Orientadora: Dra. Silvana do Couto Jacob

Rio de Janeiro

2012

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Gonçalves, Jaylei Monteiro.

Espécies comestíveis de cogumelos: perfil mineral, bioacumulação de metais e preparo de material de referência certificado. / Jaylei Monteiro Gonçalves. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2012.

99 f. : il., tab.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz, 2012.

Orientador: Silvana do Couto Jacob

1. Cogumelo. 2. MRC. 3. IDR. 4. Bioacumulação. 5. ICP-MS.

Jaylei Monteiro Gonçalves

**ESPÉCIES COMESTÍVEIS DE COGUMELOS: PERFIL MINERAL,
BIOACUMULAÇÃO DE METAIS E PREPARO DE MATERIAL DE
REFERÊNCIA CERTIFICADO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Dr. Josino da Costa Moreira

Dra. Tatiana Dillenburg Saint'Pierre

Dra. Shirley de Mello Pereira Abrantes

Dra. Silvana do Couto Jacob

Dedico este projeto à minha família.
Aos meus pais, em especial à minha mãe.
À minha esposa por acreditar que eu sou
mais do que penso.
Aos meus filhos pelos inúmeros sorrisos
que me mantiveram no caminho.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À direção do INCQS, em nome do diretor Eduardo Leal pela oportunidade de fazer o curso de doutorado.

À minha orientadora, Dra. Silvana Jacob, companheira de trabalho há 25 anos, pela orientação e total liberdade no desenvolvimento do trabalho.

À Kátia Christina Leandro, amiga e Coordenadora da Pós-graduação pela préstima ajuda.

À Monique Souza (UFF) e Rafael Christian Chavez Rocha (PUC) pela obtenção dos relevantes dados analíticos.

Ao apoio incondicional na tradução e formatação dos artigos pela amiga e Dra Renata Medeiros e à ajuda prestada pelo pessoal do laboratório, as amigas Juliana Matéra e Dra Lísia Gobbos, em etapas essenciais do trabalho.

À amiga Cláudia Maria da Conceição pela providencial ajuda no momento necessário e ao auxílio singular, ainda que tardio, da bolsista, Kátia Magalhães do Couto, na organização dos últimos dados.

À Heloísa Padilha e à Cláudia Aronne que sempre me deram voz e motivação essencial para a realização desse projeto.

Ao dono do cultivo Cogumelos Imperial, Sr. Ricardo Fernandes pela concordância e no apoio à realização deste trabalho.

À psicóloga Cristiane Magalhães pelo apoio: Mens sana in corpore sano!

Aos companheiros de jornada que, seja no deserto ou em Shamballa, me ajudaram a chegar ao fim desse trabalho.

“E é no deserto mesmo que caminho.”
(Extraído do texto, Pertencer, de Clarice
Linspector)

Vamos nós!
(Bordão do desenho “Os Impossíveis”)

RESUMO

No presente estudo foram determinadas as concentrações de vinte e cinco elementos (Al, As, Ba, Bi, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Ga, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Rb, Sb, Se, Sn, Sr, V e Zn) em três espécies comestíveis de cogumelos, *Lentinula edodes* (Shiitake), *Pleurotus ostreatus* (Shimeji) e *Pleurotus eryngii* (Cardoncello) coletadas no Cultivo Cogumelos Imperial, Petrópolis, Rio de Janeiro. As amostras foram coletadas trimestralmente durante o ano de 2010. Um grama de amostra foi seco em estufa, homogeneizado em processador doméstico e pesado em cadinho de porcelana. Após a pré-digestão com adição ácido nítrico concentrado procedeu-se à mineralização em forno mufla na temperatura de 450° C por 12 h. As cinzas foram solubilizadas com 2 mL de ácido nítrico 10 % (v/v) e o conteúdo transferido com água desionizada para frasco de polipropileno de 15 mL. Utilizou-se para a determinação dos elementos as técnicas analíticas ICP-MS, utilizando Rh como padrão interno e EAA – chama. Dois materiais de referência certificados do National Institute of Standards and Technology (NIST), Apple Leaves nº 1515 e Mussel Tissue nº 2976 foram utilizados obtendo valores de recuperação em torno de 98 %, com exceção para o Sn (51 %). Os resultados demonstraram que os cogumelos estudados são alimentos com altos teores de Fe, Mg, Mn, Mo e Zn com mais de 30 % das quantidades recomendadas para ingestões diárias para estes nutrientes conforme a RDC nº 269 e a portaria nº 27. Os cogumelos também apresentaram uma razão muito baixa Na/K, caracterizando-os como alimentos recomendados para hipertensos e as concentrações de Cd, Pb e As estão abaixo dos limites máximos permitidos preconizados pela legislação em vigor. Com o perfil mineral traçado procedeu-se ao preparo de dois cogumelos, Shiitake e Cardoncello, como candidatos a material de referência certificado e foi realizado um estudo colaborativo com dez laboratórios participantes. Nove elementos, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn, tiveram suas concentrações certificadas. Nos estudos de bioacumulação fatores foram determinados para 14 elementos, Al, Ba, Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Rb, Sr, V, sendo Al, Ca, Mn e Sr elementos bioexcluídos. Concluiu-se que entre as estruturas morfológicas, chapéu e pé, os elementos encontram-se em maior quantidade no chapéu.

Palavras-chave: Cogumelo. MRC. Bioacumulação.

ABSTRACT

In this study we determined the concentration of twenty-five elements (Al, As, Ba, Bi, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Ga, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Rb, Sb, Se, Sn, Sr, V and Zn) in three species of edible mushrooms, *Lentinula edodes* (shiitake), *Pleurotus ostreatus* (Shimeji) and *Pleurotus eryngii* (Cardoncello) from Petropolis, Rio de Janeiro. Samples were collected quarterly during the year 2010. One gram of sample was oven-dried, homogenized in domestic processor and after a pre-digestion with concentrated nitric acid addition proceeded to mineralization in a muffle furnace at a temperature of 450 ° C for 12 h. The ashes were solubilized with 2 ml of nitric acid 10 % (v/v) and transferred with deionized water to a polypropylene 15 mL bottle. For the elements determination it was used ICP-MS, using Rh as internal standard and FAAS. Two certified reference materials from NIST, Apple Leaves n° 1515 and Mussel Tissue n° 2976, obtained recovery values around 98 %, except for the Sn (51 %). The results showed that the mushrooms are foods with high levels of Fe, Mg, Mn, Mo and Zn over 30% from the recommended daily intake for these nutrients according to Brazilian Legislation. The mushrooms also showed a very low ratio Na/K, characterizing them as recommended foods for hypertensive and their concentrations of Cd, Pb and As are below the recommended maximum limits allowed by Brazilian legislation. Two mushrooms, Shiitake and Cardoncello, as candidates of certified reference material was prepared and a collaborative study took place with ten laboratories. Nine elements, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na and Zn, had their concentrations certified. In bioaccumulation studies, factors were determined for 14 elements Al, Ba, Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Rb, Sr, V and the results showed that Al, Ca, Mn, Sr are bioexcluded elements. It was concluded that among the morphological structures, cap and stem, the elements are in greater quantity in the cap.

Keywords: Mushroom. CRM. Bioaccumulation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 O COGUMELO	11
1.1.1 Ascomicetos e basidiomicetos	12
1.1.2 Absorção de nutrientes – micorriza e saprófito	14
1.1.3 Consumo no mundo e no Brasil	15
1.1.4 Valor nutricional e medicinal	19
1.1.5 Os cogumelos do estudo	21
1.1.5.1 <i>Lentinula edodes</i> – SHIITAKE	22
1.1.5.2 <i>Pleurotus ostreatus</i> – SHIMEJI	23
1.1.5.3 <i>Pleurotus eryngii</i> – CARDONCELLO	23
1.1.6 Cultivo	24
1.1.6.1 Substratos	27
1.2 O COGUMELO COMO CANDIDATO A MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO (MRC)	28
1.2.1 Importância do MRC	28
1.2.2 Escolha do MRC	29
1.2.3 MRC com elementos inorgânicos	30
1.2.4 Vigilância sanitária	31
1.3 BIOACUMULAÇÃO	33
1.3.1 Bioacumulação de vanádio, cromo, cádmio e chumbo nas espécies selecionadas para o estudo.	35
2 OBJETIVOS	38
2.1 OBJETIVOS GERAIS	38
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
3 HIPÓTESES	38
4 METODOLOGIA	39
4.1 COLETA E PREPARO DOS COGUMELOS E SUBSTRATOS	39
4.1.1 Cogumelos – perfil mineral	39
4.1.2 Cogumelos – MRC	40
4.2 ESTUDOS DA HOMOGENEIDADE E ESTABILIDADE – MRC	42
4.2.1 Homogeneidade	42

4.2.2 Estabilidade	44
4.3 ESTUDO COLABORATIVO – MRC	45
4.4 CONTAMINAÇÃO E DIGESTÃO DOS SUBSTRATOS	46
4.4.1 Contaminação do substrato	46
4.4.2 Digestão dos substratos	48
5 MÉTODOS ANALÍTICOS	49
5.1 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA (FAAS)	50
5.2 ESPECTROMETRIA DE MASSA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO (ICP-MS)	51
5.2.1 Interferências espectrais	51
5.2.2 Interferências não espectrais	53
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
6.1 PERFIL MINERAL	55
6.1.1 Desempenho analítico	55
6.1.2 Avaliação dos processos de decomposição, por microondas e por calcinação	60
6.1.3 Avaliação do processo de trituração dos cogumelos	61
6.1.4 Concentração dos elementos estudados nas três espécies de cogumelo	63
6.1.5 Comparação estatística entre as concentrações dos elementos estudados nas três espécies de cogumelos.	66
6.2 AVALIAÇÃO NUTRICIONAL	68
6.3 MRC	72
6.3.1 Estudo da homogeneidade	72
6.3.1.1 Avaliação da relação: granulometria x homogeneidade	75
6.3.2 Estudo da estabilidade	77
6.3.3 Estudo colaborativo (EC)	79
6.4 ESTUDOS DE BIOACUMULACAO	85
6.4.1 Fatores de bioacumulação	85
6.4.2 Adição de V, Cr, Cd e Pb ao substrato	87
6.5 DISTRIBUIÇÃO DOS ELEMENTOS ENTRE DUAS ESTRUTURAS MORFOLÓGICAS: CHAPÉU E PÉ	91
7 CONCLUSÕES	92
7.1 PERFIL MINERAL E AVALIAÇÃO NUTRICIONAL	92

7.2 MRC- ESTUDO COLABORATIVO	92
7.3 ESTUDOS DE BIOACUMULAÇÃO	93
8 REFERÊNCIAS	94
ANEXO A – Protocolo do Estudo Colaborativo (EC) para a determinação de elementos inorgânicos nos itens de ensaios preparados com a matriz alimentícia cogumelo.	100
ANEXO B – Planilha para registro da metodologia analítica, dos resultados das duas determinações dos elementos quantificados pelos laboratórios participantes e demais informações pertinentes ao EC.	104
ANEXO C – Gráficos de z-score dos elementos avaliados no EC para o Cardoncello.	106
ANEXO D – Gráficos de z-score dos elementos avaliados no EC para o Shiitake.	108

1 INTRODUÇÃO

1.1 O COGUMELO

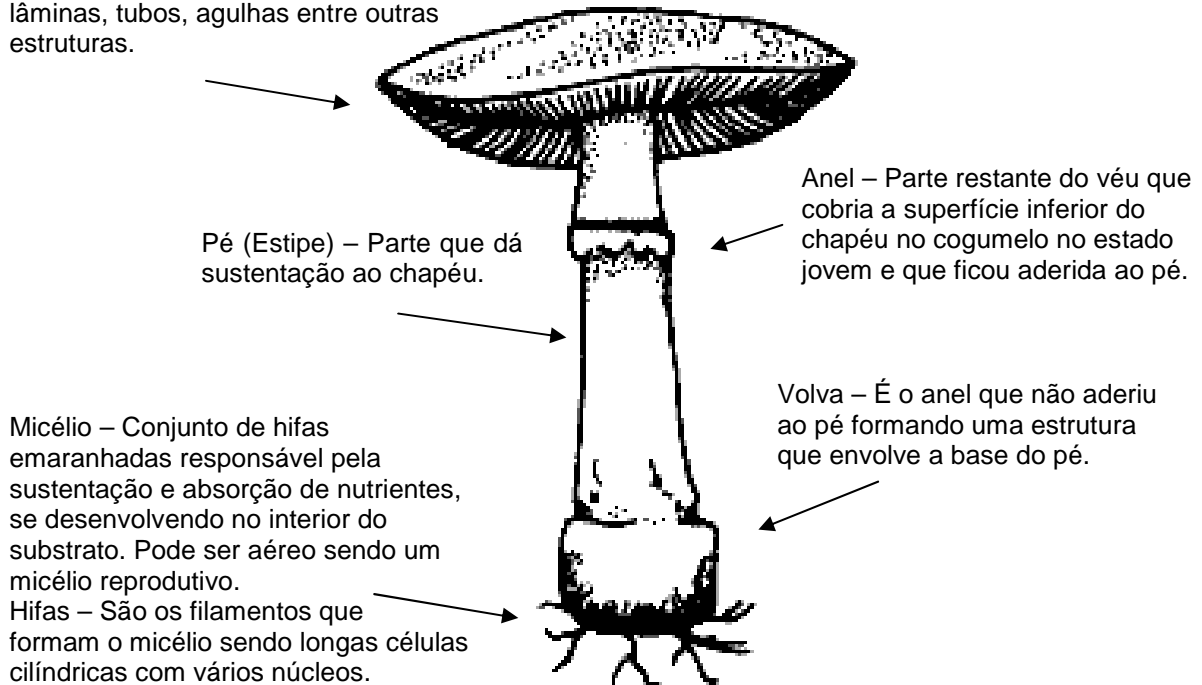
Os cogumelos pertenciam ao reino vegetal até 1969 quando eles inauguraram um novo reino da natureza, o Reino Fungi e, portanto, são considerados fungos, além dos mofos e bolores. Diferenciam-se dos vegetais porque não sintetizam clorofila, apresentam paredes celulares com quitina enquanto as células vegetais contêm celulose, com exceção de alguns fungos aquáticos, e não armazenam amido como substância de reserva. São organismos heterótrofos que necessitam obter seu alimento a partir de outro organismo, uma vez que não são capazes de sintetizá-los. Podem nutrir-se de matéria orgânica morta – fungos saprofitos, ou viva – fungos parasitários.

Cogumelo é o nome comum dado à frutificação de fungos superiores pertencentes aos filos Ascomycota (ascomicetos) e Basidiomycota (basidiomicetos), sendo essa frutificação a estrutura de reprodução sexuada destes organismos (STAMETS, 1983). Um esquema das estruturas básicas de um cogumelo é visualizado na FIGURA 1.

Cogumelo comestível, pela definição da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) na Resolução RDC nº 272, é o produto obtido de espécie(s) de fungo(s) comestível(is), tradicionalmente utilizada(s) como alimento. Pode ser dessecado, inteiro, fragmentado, moído ou em conserva, submetido a processo de secagem, defumação, cocção, salga e ou fermentação e/ou outro processo tecnológico considerado seguro para a produção de alimentos.

FIGURA 1 – Estruturas básicas de um cogumelo

Chapéu (Píleo) – Parte mais alta do cogumelo. Na parte inferior do chapéu está o himênio onde se encontram os esporos podendo ser formado por lâminas, tubos, agulhas entre outras estruturas.



Fonte:

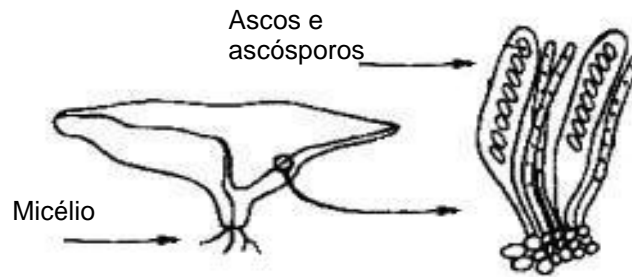
http://bp0.blogger.com/_g70NKDrwGRU/R0cGboPpIXI/AAAAAAAAASE/tsuN_Vsi-iw/S240/figura+12.gif em http://viseufunghi.blogspot.com/2007_12_01_archive.html.

Existem aproximadamente 45 mil espécies de cogumelos descritas na literatura, destas, cerca de duas mil são conhecidas como comestíveis, mas somente pouco mais de 25 espécies são cultivadas e aceitas como alimento e somente 10 espécies têm se tornado produto de larga comercialização (URBEN e SIQUEIRA, 2003).

1.1.1 Ascomicetos e basidiomicetos

Os ascomicetos produzem seus esporos (ascósporos) em esporângios específicos chamados ascos (sacos), os quais, na maioria das espécies, estão contidos numa estrutura chamada de ascoma (FIGURA 2). Cada asco produz oito ascosporos (ou um múltiplo de 8) embora ascos com 4 esporos sejam característicos de algumas espécies.

FIGURA 2 – Ascos e ascósporos.



Fonte: <http://lesbeauxjardins.com/cours/botanique/4-champignons/asco.jpg>.

O filo Ascomycota reúne cerca de 32.000 espécies, ao qual pertencem inclusive a maioria das formas anamórficas, leveduras e formas liquenizadas. Este grupo engloba também a maioria dos fungos patogênicos para as plantas (KIRK et al., 2001). Dois cogumelos desse filo são expostos na FIGURA 3.

FIGURA 3 – Cogumelos Ascomicetos: (a) *Gyromitra esculenta* e (b) *Morchella rotunda*.

(a)

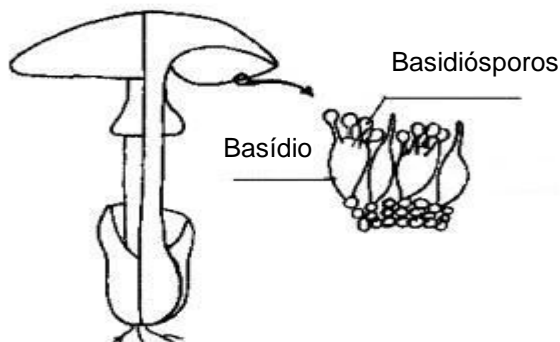


(b)

Fontes: 1 – http://farm4.staticflickr.com/3228/3082395523_35b8a823a1_o.jpg.
2 – http://farm4.staticflickr.com/3182/3085848413_d3b7b0dce5.jpg.

Os basidiomicetos são cogumelos caracterizados pela formação de esporângio típico, o basídio, que é uma estrutura microscópica formada por hifas especiais que assumem o aspecto de clara ou tacape e onde ocorre a produção de esporos (FIGURAS 4 e 5). Um basídio, geralmente, produz quatro esporos, chamados basidiósporos, no entanto, esse número pode variar de dois a oito esporos.

FIGURA 4 – Basídio e basidiósporos.



Fonte: <http://lesbeauxjardins.com/cours/botanique/4-champignons/basidio.jpg>.

No mundo estima-se que o grupo dos Basidiomycota tenha em torno de 30.000 espécies, correspondendo a 37% do número descrito dos fungos verdadeiros (KIRK et al., 2001).

FIGURA 5 – Cogumelos Basidiomicetos: (a) *Tremella mesenterica* (Witch's butter), (b) *Amanita muscaria* e (c) *Pholiota squarrosa*



(a)



(b)



(c)

Fontes: 1 – http://farm6.staticflickr.com/5100/5491738407_21e6d29b82.jpg.
 2 – http://farm4.staticflickr.com/3265/2917585967_fdeeb3aac9.jpg.
 3 – http://farm2.staticflickr.com/1109/1270783382_5abc9e1ac7.jpg.

1.1.2 Absorção de nutrientes – micorriza e saprófito

Os cogumelos dividem-se em dois grupos, de acordo com a forma como se alimentam: Os simbióticos, como as espécies micorrizas, e os saprófitos, que decompõem a matéria orgânica.

Micorriza – é uma associação mutualística do tipo simbiótico, existente entre certos fungos e raízes de algumas plantas. As micorrizas formam-se quando as hifas

de um fungo invadem as raízes de uma planta e auxiliam as raízes da planta na função de absorção de água e sais minerais do solo com o aumento da superfície de absorção ou rizosfera. Deste modo as plantas podem absorver mais água e adaptar-se a climas mais secos. Em troca, os cogumelos recebem carboidratos, que não conseguem sintetizar, da planta, pois não possuem clorofila.

Ectomicorrizas – São micorrizas formadas, na grande maioria dos casos, por fungos com hifas septadas da classe dos Basidiomicetos. Nas ectomicorrizas, as hifas formam um invólucro em torno das células das raízes, nunca as penetrando, mas aumentando grandemente a área de absorção, o que, aparentemente, as torna mais resistentes às rigorosas condições de seca e baixa temperatura, e prolonga a vida das raízes.

Saprófito – É a designação dada em biologia aos organismos, entre os quais plantas, fungos e outros seres, que se alimentam absorvendo substâncias orgânicas normalmente provenientes de matéria orgânica em decomposição.

O interessante em relação ao modo de absorver nutrientes é que, de acordo com alguns autores, como DURSUN et al. (2006), mesmo que a absorção de nutrientes em todas as espécies seja efetuada pelas hifas, através da formação de uma rede microscópica junto ao substrato (fonte de alimento), esse mecanismo de captação de nutrientes do substrato parece ser mais eficaz nos fungos saprófitos do que nos fungos micorrízicos.

1.1.3 Consumo no mundo e no Brasil

Em 1650 no Ocidente, em Bonnefons na França, iniciou-se a produção de cogumelos em substrato feito com esterco de cavalos e resíduos úmidos. Naquela época, acreditava-se que a "semente" dos cogumelos estava presente no esterco dos cavalos, embora fosse reconhecido que uma pilha de composto pudesse ser inoculada com partes de outras pilhas. A produção comercial de cogumelos foi formalizada aproximadamente em 1700. Nesse período, as cavernas dos arredores de Paris foram alargadas, devido à extração de pedras para a construção de edifícios parisienses. O ambiente úmido e escuro dessas cavernas constituía o ambiente ideal para o crescimento dos cogumelos. A combinação entre a produtividade e o desenvolvimento da França nas artes culinárias impulsionou o cultivo comercial pelos próximos dois séculos. (HERRERA, 2001 apud MOURA, 2008).

Contrastando com a citação acima, no Brasil o cultivo comercial é recente, data dos anos 50 e foi iniciado pela produção do *Agaricus bisporus*, vulgarmente

conhecido como Champignon, na região de Mogi das Cruzes, São Paulo (BONONI, 2003).

No mundo, a quantidade de cogumelos cultivados está em torno de três milhões e meio de toneladas métricas, ou seja, quase 26 vezes menor que a produção de carne, que é de aproximadamente oitenta e oito milhões de toneladas métricas e, atualmente, a China é o maior produtor mundial de cogumelos (URBEN, 2003).

As espécies de cogumelos mais comercializadas mundialmente são o “champignon” que responde por cerca de 38% do mercado global, seguida pelas espécies do gênero *pleurotus*, como o *Pleurotus ostreatus*, o Shimeji, que responde por cerca 25% deste mercado e em terceiro lugar o *Lentinula edodes*, o Shiitake, com uma comercialização em torno dos 10%.

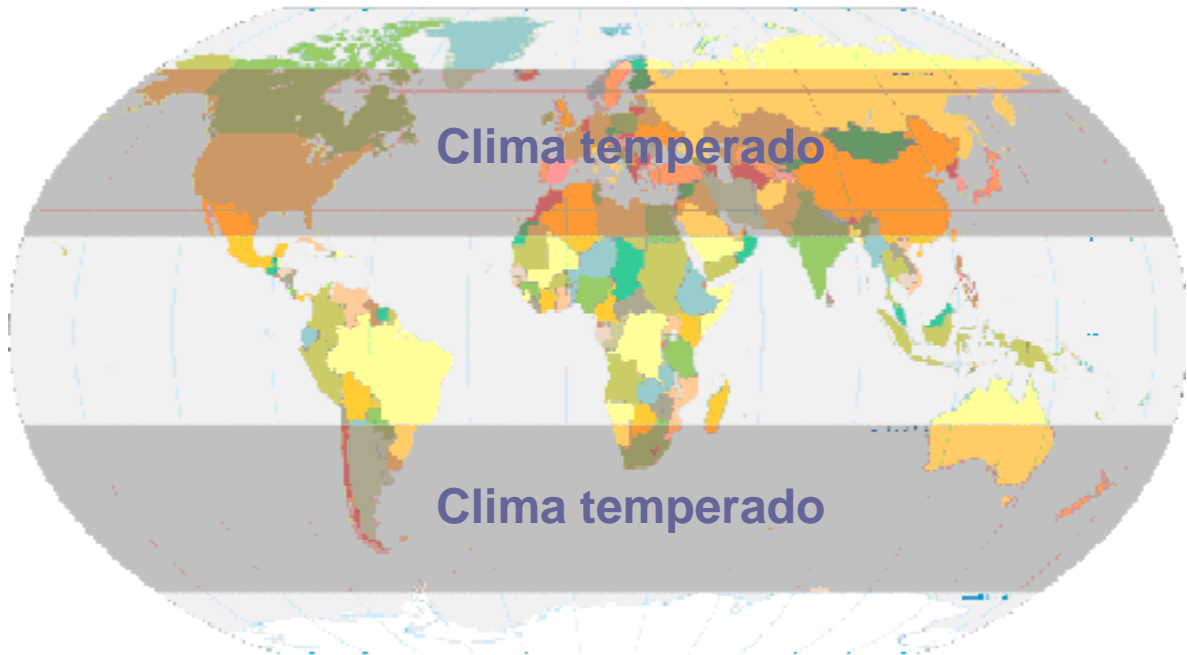
O Brasil segue a ordem de cultivo e consumo das espécies citadas acima, com inclusão de outro cogumelo, o *Agaricus Blazei*, conhecido como o Cogumelo do Sol, porém, é o “champignon” o responsável pela quase totalidade da produção nacional, que está em torno de três mil toneladas métricas por ano. (FAEMG, 2011)

O consumo de cogumelos por habitante no Brasil é considerado baixo, cerca de 70 a 160 gramas/habitante ano, quando comparado com outros países como a China, aonde o consumo per capita chega a 10 kg/habitante ano (KALAIČ e SVABODA, 2000),

Apenas em termos comparativos, o consumo per capita de carne bovina do brasileiro é de 37 kg por ano, enquanto na China esse valor cai para 4 kg.

Atribui-se o baixo consumo de cogumelos no Brasil ao preço elevado, principalmente devido a cultivos de baixa produtividade, à crença popular quanto aos cogumelos serem venenosos e também aos hábitos alimentares. No entanto, um fator importante que não é considerado é que a maior incidência de cogumelos se dá em áreas de clima temperado (FIGURA 6), das quais a maior parte do Brasil não se inclui, com temperaturas médias anuais acima de 10 °C nos meses mais quentes e entre -3 °C e 18 °C nos meses frios.

FIGURA 6 – Regiões do planeta com predominância do clima temperado.



Fonte: <http://img505.imageshack.us/img505/2306/climastemperadosil0.jpg> em <http://meteo12.nforum.biz/t/16-tipos-de-clima>.

Segundo BONONI et al. (1999), espécies comestíveis são encontradas nas matas brasileiras: *Auricularia fuscosiicciuea*; *Oudemansiella canarri*; *Favolus brasiliensis*; *Suillus edulis*; *Macrolepiota procera*; *Lepista nuda*; *Armiliana mellea*; *Auriculcuia delicata*; *Laetiporus sulphureus*; *Agaricus silvaticus*; *Agrocybe perfecta*; *Coprimis comatus* e *Pleurotus ostreatoroseus* (FIGURA 7).

No entanto, é possível, quase afirmar, que são espécies pouco conhecidas pela maioria das pessoas, ainda que não tenha sido feito estudo sobre esse tema. Fora o fato de algumas espécies estarem mais restritas a determinadas localizações geográficas, por exemplo, a espécie *Favolus brasiliensis* consumida por populações indígenas da Amazônia Brasileira (PRANCE, 1984) ou a *Oudemansiella canarri* que “pode ser encontrada ao sul do país colonizando o pinheiro brasileiro” (RUEGGER ET al., 2001).

FIGURA 7 – Exemplos de cogumelos comestíveis encontrados no Brasil: (a) *Oudemansiella canarii*, (b) *Favolus brasiliensis*, (c) *Fistulina hepatica* e (d) *Lepista nuda*.



(a)



(b)



(c)



(d)

Fontes:

(a) http://farm3.static.flickr.com/2140/1517543804_5f4d3d69e1.jpg?v=0 em <http://cogumelosmagicos.org/comunidade/threads/cultivo-do-cogumelo-comest%C3%ADvel-oudemansiella-canarii.3835/>.

(b) <http://imagenes.infojardin.com/sube/images/arx1195534487q.jpg> em <http://www.infojardin.com/foro/showthread.php?t=42470&page=74>.

(c) <http://www.rogersmushrooms.com/MediaPath/BF50AF4B811B4BC99E2350393977B2BF.jpg>

(d) http://nd02.jxs.cz/496/234/4bd75d7879_58588629_o2.jpg em <http://kudlufvfotoatlashub.blog.cz/1001/ciruvka-fialova-lepista-nuda>

Além da falta de conhecimento e da não disponibilidade em todo o território brasileiro das espécies comestíveis, ainda advém duas questões. A primeira, relativa ao sabor, pois mesmo que algumas espécies sejam comestíveis, o cheiro ou o paladar podem não ser apreciáveis, o que ocorre com a espécie *Laetiporus sulphureus*, que tem um “gosto deliciosamente picante, mas muito seco”. A segunda questão ligada à saúde, como no caso, da *Armillaria mellea* (Cogumelo mel) que se ingerida em maiores quantidades pode causar dores estomacais.

De todo modo, o fato que prevalece sobre a discussão quanto ao baixo consumo de cogumelos comestíveis no Brasil é que a produção e a demanda vêm crescendo em torno de 30% ao ano, principalmente para o Shiitake e o Shimeji, que estão entre os três cogumelos mais consumidos no país (FAPEMG, 2005 e SEBRAE, 2006). Esse aumento do consumo desde a última década é devido a uma maior diversidade alimentar, com a adoção de costumes advindos de outras regiões do globo, como por exemplo, do Japão, pela substituição de alimentos de origem animal por outros de origem vegetal, pelo reconhecimento das características nutricionais dos cogumelos como alimentos que contêm baixos teores de gorduras e elevados teores de proteínas e de elementos inorgânicos, alguns dos quais essenciais, mas, principalmente, pela adoção de políticas públicas direcionadas para a capacitação de produtores na atividade de cultivo de cogumelos (URBEN 2004).

1.1.4 Valor nutricional e medicinal

Os cogumelos são alimentos muito apreciados desde a idade antiga por se acreditar em seu elevado valor nutritivo e em seu potencial medicinal, além de serem classificados como uma especiaria nobre em pratos culinários. As propriedades dos cogumelos vão muito além do sabor exótico e das suas formas graciosas. Essas iguarias têm também funções terapêuticas, como prevenir doenças e aumentar a capacidade de defesa do organismo (FURLANI e GODOY, 2007).

O consumo de cogumelos como fonte de nutrientes ou na terapêutica é antigo e os relatos de cultivos com finalidade comercial são descritos a partir do século VI.

São excelentes alimentos para hipertensos pela baixa razão sódio/potássio e também pelo elevado teor de potássio que junto com os teores de cálcio e magnésio exercem efeito anti-hipertensivo e têm uma ação protetora contra danos cardiovasculares (KRUMMEL, 1998; DIRETRIZES BRASILEIRAS, 2006; SACKS et al. (2001). Razões Na/K entre 1,11 e 1,92, segundo YANG et al. (2011), estão associadas a um significativo aumento do risco de morte por doenças cardiovasculares na população americana.

Os cogumelos são alimentos com baixo teor de gordura, entre 1,1 a 8,3% em peso seco, sendo o conteúdo médio de 4,0%, e algumas espécies contêm todos os aminoácidos essenciais ao homem (<http://www.funghieflora.com.br>).

Em relação aos minerais, esses são encontrados em concentrações na faixa de 800 a 40000 mg kg⁻¹ para elementos, como o potássio, fósforo, enxofre e

magnésio, enquanto que outros, como o zinco, ferro, cobre, cálcio, sódio e manganês estão entre 5 a 500 mg kg⁻¹ (KALAC, 2009). Para os metais tóxicos, sabe-se que muitas espécies de cogumelos acumulam elementos, como chumbo, cádmio, cromo, alumínio e mercúrio (DEMIRBAS, 2001; DURSUN et al., 2006), no entanto, a não ser que estejam próximos a locais contaminados, os níveis de metais pesados em cogumelos não oferecem risco à saúde humana (LEE et al., 2009).

Entre outros benefícios, são divulgadas ações antimicrobiana, antiinflamatória, antioxidante, antimutagênica e antitumoral, a diminuição dos níveis de colesterol e até na melhora do quadro do mal de Alzheimer pelo estímulo do fator de crescimento dos nervos (PASCHOAL, 2001). No entanto, de forma resumida, o que se sabe é que em cogumelos da família *Agaricaceae*, um dos principais componentes ativos, a 1-3-D-Beta-Glucana, possui ação antineoplásica, exercendo uma atividade imunomoduladora, com inibição do crescimento tumoral, por estimulação de respostas celulares, em especial a produção de citocinas. Além da 1-3-D-Beta-Glucana, encontram-se nos cogumelos componentes bioativos, como proteínas, vitaminas (riboflavina, niacina, tiamina, ácido fólico e ácido ascórbico), minerais (cobre, fósforo, magnésio, potássio, sódio e zinco), ácidos graxos insaturados e fibras (BUSWELL e CHANG, 1993). Outras substâncias com reconhecida importância farmacológica também podem ser encontradas, como: ergosterol, lecitina, terpenóides e aminoácidos imunomoduladores, como a arginina e a glutamina (NOVAES, 2007).

Adentrando o terreno da ficção, uma curiosidade dos cogumelos é a ligação com as suas ditas propriedades quase mágicas (FIGURA 8), como descrito na citação a seguir:

Quando utilizado propriamente em arranjos positivos e em doses corretas, os chamados cogumelos mágicos têm provado ter benefícios duradouros para a saúde e para o espírito. Eu digo isso baseado em experiência pessoal, tanto quanto a pesquisa científica documentada. Tomar a quantidade certa da substância encontrada nesses cogumelos pode ajudar a melhorar, positivamente, a atitude, o humor, o comportamento e os níveis de felicidade, de acordo com o novo estudo publicado no jornal de Psicofarmacologia. Pesquisadores da Universidade John Hopkins, Escola de Medicina em Baltimore determinaram que a psilocibina, uma substância psicodélica pode melhorar o bem estar de uma pessoa por mais de um ano após a sua ingestão e isso, não parece causar nenhum sintoma adverso conhecido (<http://www.rawstory.com/rs/2011/06/15/magicmushrooms-positive-clinical-effects-lasting-over-a-year-say-researchers/>, tradução nossa).

FIGURA 8 – Cogumelos mágicos



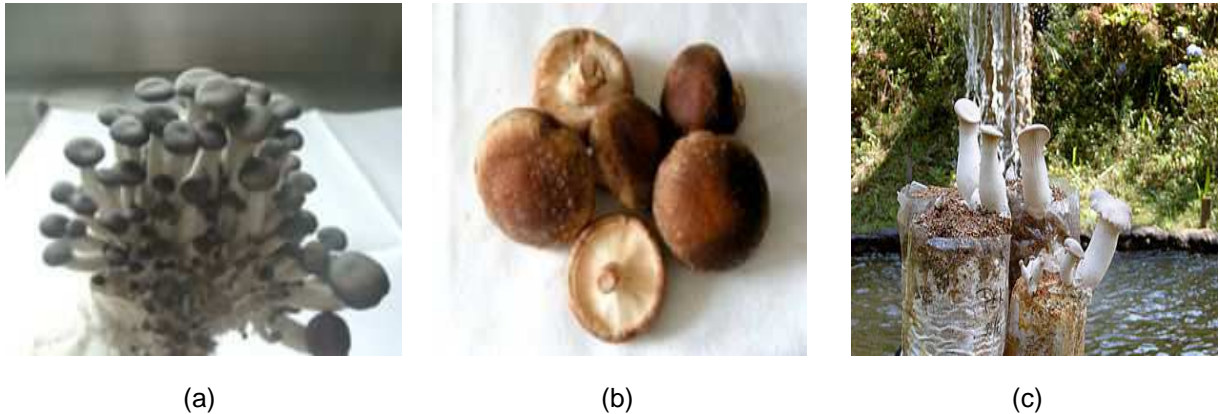
Fonte: http://4.bp.blogspot.com/-6iXBfbmMJIE/TifB5Y3pxYI/AAAAAAAAACao/1Ne0Ko-JWYE/s1600/magic_mushrooms.jpg

1.1.5 Os cogumelos do estudo

Como demonstrado no item 1.1.4, a concentração de minerais nos cogumelos é relevante, sendo alimentos com elevado teor de alguns minerais.

Três cogumelos serão melhor detalhados nos próximos itens, a espécie *Lentinula edodes*, o **Shiitake**, a *Pleurotus ostreatus*, o **Shimeji** e a *Pleurotus eryngii*, o **Cardoncello** (FIGURA 9). Esses cogumelos foram selecionados para o estudo devido à facilidade de acesso ao cultivo, pelo uso de técnicas simples, robustas e padronizadas, além de terem crescimento rápido. Fora esses motivos, o Shiitake e o Shimeji estão entre os três cogumelos comestíveis mais consumidos no Brasil e o Cardoncello que, embora seja um cogumelo pouco estudado, é de fácil aquisição, pois também é cultivado pelo mesmo produtor do qual foram adquiridos os cogumelos.

FIGURA 9 – Cogumelos do estudo. (a) Shimeji, (b) Shiitake e (c) Cardoncello



Fontes:

(a) http://www.jornallivre.com.br/images_enviadas/o-que-e-o-cogumelo-shimeji-pre.jpg

(b) http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/65/Lentinula_edodes.jpg

(c) <http://www.cardoncello.com.br/cardoncello/cardon.jpg>

1.1.5.1 *Lentinula edodes* – SHIITAKE

A espécie *Lentinula edodes*, com o nome comum de Shiitake, é um cogumelo comestível nativo do Leste da Ásia. A palavra Shiitake tem origem japonesa, *shii* (uma árvore parecida com o carvalho) e *take* (cogumelo) e a primeira referência histórica do consumo de shiitake data de 199 A.C., na China, e no Brasil começou a ser cultivado no início da década de 1990 (<http://pt.scribd.com/doc/41525306/tipos-de-cogumelos>).

É um fungo aeróbio, decompositor de madeira, que degrada celulose e lignina para obter energia e, na natureza, se desenvolve sobre o tronco de árvores mortas, característica de espécies saprófitas. Seu cultivo comercial é realizado tanto com a utilização de toras de madeira, da mesma forma que no meio natural ou pela produção em compostos orgânicos à base de serragem, farelo de arroz, trigo e/ou soja, previamente hidratada com correção do pH.

O Shiitake é nutritivo, rico em proteínas (17,5% peso seco) e contém nove aminoácidos essenciais. Tem também importância medicinal, possuindo substâncias com propriedades medicinais para o tratamento e controle de pressão arterial, redução do nível de colesterol, fortalecimento do sistema imunológico e inibição do desenvolvimento de tumores, vírus e bactérias (BRAGA, 2012)

Especificamente na ação anti-tumoral, o Shiitake é um cogumelo que possui um polissacarídeo solúvel em água e de alta massa molecular, a lentiniana. O

mecanismo de ação da lentiniana relativo ao aumento da produção de interleucina-1, substância que age no combate dos tumores, passa tanto pela estimulação dos macrófagos quanto pelo estímulo da proliferação de linfócitos T, dos fatores que aumentam a produção de interleucina-1 (SALGADO, 2005).

1.1.5.2 *Pleurotus ostreatus* – SHIMEJI

Sob o nome japonês shimeji se agrupam mais de 20 espécies de cogumelos silvestres. Há certa confusão na classificação de tais cogumelos. O verdadeiro Shimeji (cogumelo de chão úmido), por exemplo, é o *Lyophyllum shimeji*, espécie silvestre, não cultivável, encontrada em solos úmidos e ricos em restos de madeira. O que conhecemos no país como *Pleurotus ostreatus*, é o Shimeji preto, cogumelo com variedades branco e preto, o mais comum (<http://www.spiegel.de/wissenschaft/natur/0,1518,703531,00.html>).

O Shimeji preto é nutritivo, rico em proteínas (19% peso seco) e contém onze aminoácidos. Tem também princípios medicinais já relatados na literatura científica, incluindo as beta-glucanas (polissacarídeos são comuns a todos os cogumelos, pois fazem parte da parede das hifas) e compostos de baixo peso molecular, tais como a lovastatina (anticolesterolêmico e auxiliar em terapias de cardiopatias) e derivados do ergosterol (WIKIPEDIA 2012)

1.1.5.3 *Pleurotus eryngii* – CARDONCELLO

O Cardoncello é um cogumelo pouco estudado em relação ao seu conteúdo mineral, mas, sendo do mesmo gênero que o Shimeji, apresenta um perfil semelhante aos demais pleurotus (MANZI, 1999).

É um cogumelo comestível, saprófito, frequentemente consumido no Mediterrâneo, Europa Central, Ásia, África do Norte e Turquia (LEWINSOHN, 2002), mas o cultivo, comparado ao Shimeji, exige maiores cuidados, pois, é um cogumelo que cresce mais vagarosamente e mais sujeito a contaminação por outros fungos competidores (AKYÜZ e KIRBAĞ, 2010).

1.1.6 Cultivo

De uma forma resumida, o cultivo do cogumelo é iniciado com a inoculação de uma cepa do fungo para uma primeira colonização (crescimento do micélio), por exemplo, em grãos de arroz e com ou sem suplementação de farelo ou farinha de trigo. Uma quantidade específica dessa cultura inicial é então transferida para o saco que contém o substrato, previamente autoclavado, e esse saco, que possui um pequeno filtro 0,22 μm na parte superior para possibilitar a aeração, é fechado e mantido num galpão com umidade controlada até a total colonização do substrato.

Após 30 a 40 dias, o saco é retirado e o substrato colonizado vai para um novo galpão onde permanecerá por 3-4 semanas. Após esse tempo ocorre o processo de choque térmico, o qual para o Shiitake é feito com a imersão do substrato colonizado em água, sendo necessário um Δt de 7 °C em relação à temperatura ambiente e para o Shimeji e o Cardoncello o choque é feito em refrigerador.

FIGURA 10 – Etapas do cultivo do cogumelo (Shiitake)



a) Resíduo de tora de eucalipto (serragem).



b) Sala de inoculação.

FIGURA 10 – Etapas do cultivo do cogumelo (Shiitake) - Continuação



c) Autoclaves.



d) Câmara de colonização.



e) Substrato colonizado.



f) Colonização total do substrato.

FIGURA 10 – Etapas do cultivo do cogumelo (Shiitake) – Continuação



g) Piscina para choque térmico.



h) Frutificação

Fonte: Fotografias do próprio autor obtidas no local do cultivo.

1.1.6.1 Substratos

Os fungos, incluindo os que produzem cogumelos, fazem uso de uma variedade de compostos orgânicos, para suprir suas necessidades de carbono, e entre esses compostos estão monossacarídeos, polissacarídeos, ácidos orgânicos, álcoois e produtos naturais como a lignina e a celulose, os quais fornecem energia para seu metabolismo (FIGUEIRÓ, 2011).

Para os cogumelos do estudo, o composto mais utilizado é uma mistura de vários substratos, tendo como base o resíduo de tora de eucalipto (serragem) suplementado com farelos de trigo, arroz ou outro cereal. Após a mistura, normalmente é efetuada a adição de carbonato de cálcio ou dolomita como fonte de cálcio e para a correção do pH que deve estar em torno de 4.

O cultivo também pode ser efetuado com a utilização de vários resíduos lignocelulósicos como substratos, tais como palhas de cereais, bagaço de cana-de-açúcar, serragens, casca de frutas, folhas de bananeira, restos de papel, resíduos cítricos, polpa de café, entre outros. Na maioria dos cultivos, estes substratos são misturados a outras fontes nutricionais, com destaque para os farelos e uréia.

A suplementação do substrato com farelos, principalmente, o de trigo, proporciona um aumento do teor de determinados elementos, como Fe e Mg, o que pode ser visualizado na TABELA 1, como exemplo para o Shimeji.

TABELA 1 – Teores de elementos inorgânicos (mg kg^{-1}) encontrados no Shimeji com a utilização de substratos diferentes.

Elementos	WANG ¹	MOURA ²	DEMIRBAŞ ³	MATILLA ⁴
Na	219	45	6,3	130
Fe	71	61	133	54
Ca	-----	-----	106	10
K	21714	23012	51000	37300
Mg	1819	-----	1280	2000
Cu	25	-----	86	8,4
Zn	137	89	0,22	83
Mn	16	-----	248	11

Substratos:

1 – 50% bagaço de malte + 50% farelo de trigo

2 – 90% serragem + 10% farelo de arroz

3 – Solo Turquia

4 – Solo Finlândia

1.2 O COGUMELO COMO CANDIDATO A MATERIAL DE REFERÊNCIA CERTIFICADO (MRC)

No escopo da avaliação da qualidade de um laboratório, um dos requisitos, senão o mais importante, baseia-se na qualidade dos dados de análises obtidos, a qual assegura que os resultados sejam válidos e adequados aos fins propostos. O controle da qualidade desses resultados pode ser efetuado a partir da comparação dos valores medidos de um ou mais analitos com os valores certificados de materiais de referência (ANVISA, 2005).

Através da realização de uma pesquisa preliminar norteada por parâmetros como: matriz de baixa complexidade, facilidade na obtenção e no preparo dos cogumelo para análise, o crescimento rápido e o relativo controle do conteúdo de minerais através do uso padronizado das mesmas condições no cultivo, levantou-se a hipótese de poder utilizar os cogumelos do estudo como MRC.

1.2.1 Importância do MRC

A utilização de um MRC é reconhecida como componente essencial no controle metrológico dos dados obtidos de vários tipos de análises, na sua comparação e rastreabilidade a padrões internacionais. (ARUNACHALAM et al., 2006). Numa definição mais exata, de acordo com a norma da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e da International Standardization Organization (ISO), a ABNT ISO GUIA 30: “MRC é um material de referência acompanhado por um certificado, com um ou mais valores de propriedades, certificado por um procedimento que estabelece a sua rastreabilidade à obtenção exata da unidade na qual os valores de propriedade são expressos, com cada valor certificado acompanhado por uma incerteza para um nível de confiança estabelecido”.

A utilização de um MRC no processo analítico é capaz de assegurar um alto nível de confiabilidade dos dados analíticos quando o mesmo é adequado, ou seja, exibe uma composição da matriz similar à amostra e uma concentração apropriada do analito de interesse (VENELONOV e SAHUQUILLO, 2006).

Os MRC são adquiridos de instituições internacionais como o NIST (National Institute of Standards and Technology) ou o IAEA (International Atomic Energy Agency) e devido ao custo, são muitas vezes relegados a segundo plano, deixando

de lado um dos meios mais eficientes de se atestar a validade (especificidade – seletividade – exatidão) de um determinado método, vindo a acarretar problemas para a Instituição dentre os quais, o atraso de um processo de acreditação.

Cabe dizer que, atualmente, a acreditação tornou-se um requisito básico para a sobrevivência de muitas empresas, o que se aplica também aos laboratórios, os quais sofrem com a pressão para garantir a qualidade e a manutenção das características de seus produtos e/ou serviços (OLIVARES, 2006).

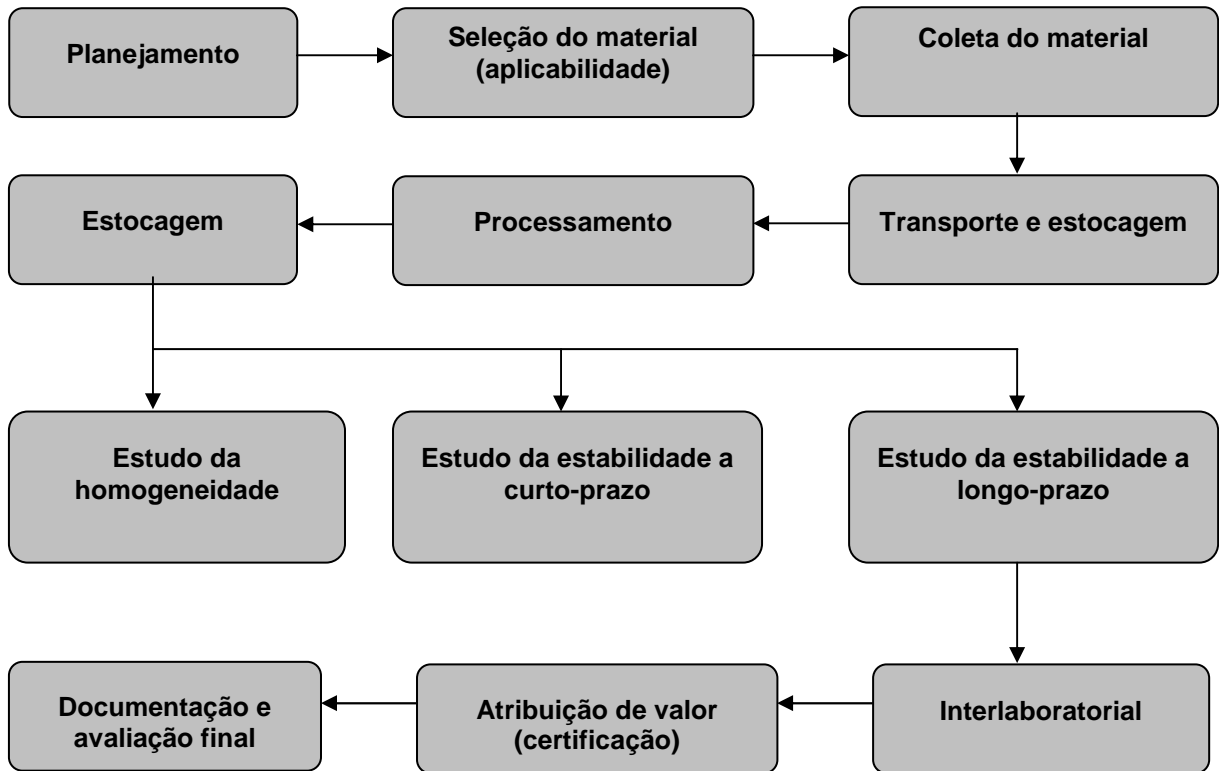
1.2.2 Escolha do MRC

A norma ISO GUIDE 35 detalha todos os passos necessários à produção de um MRC, porém, os mesmos não fazem parte de uma receita básica, pois características como a concentração dos analitos, a composição centesimal do material ou a disponibilidade do mesmo são escolhas particulares do analista-fabricante (EMONS et al., 2004). Por exemplo, em muitos ensaios a equivalência entre a matriz do MRC e a amostra real é um ponto de alta relevância, pois somente o uso de soluções-padrão aquosas pode levar a erros consideráveis quando se pretende analisar matrizes complexas, como é o caso de alimentos, seja no que diz respeito à interferências no preparo das amostras ou no próprio método analítico.

De acordo com o documento do INMETRO (DOQ-CGCRE-016), que orienta a seleção e uso de material de referência (MR), a adequação de um MR depende dos detalhes da especificação analítica, pois efeitos de matriz e de outros fatores, tais como, faixa de concentração, podem até ser mais importantes do que a incerteza do valor certificado. Assim sendo, a escolha de um MRC apropriado é essencial para garantir a exatidão dos resultados e conseqüentemente, a validação de um método analítico.

Algumas etapas que abrangem o estabelecimento de um MRC podem ser visualizadas na FIGURA 11 (EMONS et al., 2004).

FIGURA 11 – Etapas de um procedimento geral para a produção de um MRC



1.2.3 MRC com elementos inorgânicos

Dentre os elementos químicos mais tóxicos, incluem-se o cádmio, o chumbo e o arsênio, os quais podem estar presentes nos alimentos e na água, como resultado de atividades humanas ou mesmo de processos naturais. Embora existam metais que sejam essenciais, como o cobre, o selênio e o zinco, todos podem representar uma ameaça à saúde, dependendo da concentração a que se está exposto.

Apesar de existirem diferentes vias de exposição (exposição ocupacional, inalação, etc.), a principal para o ser humano é a via digestiva, através de alimentos e das águas contaminadas (PIVETTA, 2002; LLOBET, 2003). Nesse sentido, a determinação de elementos inorgânicos em produtos alimentícios faz parte de uma característica fundamental das atividades dos laboratórios em saúde: a de contribuir para o estudo das soluções pertinentes aos principais agravos que comprometem a manutenção da saúde do cidadão (MOURA, 1992).

A fiscalização, o controle dos alimentos e o monitoramento quanto ao teor de elementos inorgânicos são imprescindíveis na determinação de fatores de risco, na avaliação de eventuais contaminações propositais ou ambientais, para assegurar

que os limites máximos de contaminantes estejam de acordo com a legislação em vigor ou ainda, para verificar a veracidade das informações declaradas no rótulo pelo fabricante.

1.2.4 Vigilância Sanitária

De acordo com a Lei nº 8080 de 19 de setembro de 1990, Vigilância Sanitária é definida como “um conjunto de ações capazes de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e da circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde”. Como se fazer isso sem qualidade?

IVO (2000) discorre sobre a Vigilância Sanitária (VS) como um campo estratégico que põe em prática um modelo de atenção que vai além das necessidades clínico-assistenciais, se pautando em uma política de saúde voltada para a qualidade e COSTA e ROZENFELD (2000) ressaltam o papel do laboratório na estrutura da VS, devendo este, ser moderno e estar equipado para dar respostas ágeis na avaliação da qualidade de produtos e das repercussões de riscos e de agravos sobre a saúde das pessoas. A mesma pergunta se faz presente: Como se fazer isso sem qualidade?

Um ponto de extrema relevância que é abrangido pelo projeto em relação ao Setor de Contaminantes Inorgânicos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) é tanto o papel fundamental exercido como referência nacional na área de monitoramento de metais pesados, quanto à colaboração intrínseca com os Laboratórios Centrais de Controle dos Estados da Federação (LACENs) na verificação da qualidade analítica dos resultados das determinações dos teores de elementos inorgânicos. Qualidade que se reflete diretamente, na correta avaliação rotineira das formulações dos diversos produtos, na quantificação dos nutrientes essenciais em alimentos e na identificação e na quantificação de elementos indesejados e/ou contaminantes presentes no produto que está sendo analisado. Nesse sentido, alguns valores de referência e limites máximos devem ser considerados de acordo com os itens abaixo:

1- Na avaliação de um produto alimentício quanto à quantidade de minerais presentes. Para essa avaliação, considera-se a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de cada elemento essencial (TABELA 2), a partir do descrito na Resolução RDC nº

269 (ANVISA, 2005), a qual estabelece que um alimento pode ser considerado FONTE do nutriente quando apresenta uma quantidade mínima de 15% da IDR por 100 g ou contendo ALTO TEOR se possui, no mínimo, 30% da IDR por 100 g.

2- Na avaliação da possibilidade de risco quanto à presença no alimento de contaminantes metálicos em quantidades acima dos limites máximos permitidos e estabelecidos pela legislação vigente (TABELA 3).

3- Na estimativa da ingestão do metal a partir da quantidade do alimento consumida e dos valores toxicologicamente seguros recomendados pelo JECFA – FAO/WHO (TABELA 3).

TABELA 2 – Valores recomendados para ingestão diária de adultos e crianças de 1 a 10 anos.

	IDR (mg)	
	Adultos	Crianças de 1 e 10 anos
Ca¹	1000	500 - 700
Cu¹	0,9	3,4 - 4,4
Fe¹	14	6 - 9
Mg¹	260	60 - 100
Mn¹	2,3	1,2 - 1,5
Zn¹	7	4,1 - 5,6
K^{2*}		3500
Na^{2*}		2400
		IDR (µg)
Cr¹	35	11 - 15
Mo¹	45	17 - 22
Se¹	34	17 - 21

Fontes:

1- Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005 - ANVISA-MS.

2- 21 CFR (Code of Federal Regulation) parte 101.9. 1996. Food and Drugs Administration (FDA).

* Valor de Referência diário.

TABELA 3 – Limites máximos e ingestão semanal (Al, As, Pb e Sn), mensal (Cd) ou máxima (Cu, Fe e Zn) tolerável provisória de elementos inorgânicos.

Elemento	Limite máximo de tolerância¹ (mg kg⁻¹)	Ingestão tolerável provisória² (mg kg⁻¹ corpóreo (x 70 kg*))
Al	-----	1 (70)
Sb	2	-----
As	1	0,015 (1,05)
Cd	1	0,025 (1,75)
Pb	0,8 (vegetais 0,5)	< 0,0003 (0,021)
Cu	30	0,5 (35)
Cr	0,1	-----
Sn	250	14 (980)
Fe	-----	0,8 (56)
Ni	5	-----
Se	0,3	-----
Zn	50	1 (70)

Fontes:

1- Decreto 55871 de 26 de março de 1965.

2- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) reports.

* Estimativa do peso corpóreo de um homem adulto.

Levando-se em consideração o exposto, fica claro que o projeto se insere na política de saúde vigente ao pensar sobre a produção de um MRC para elementos inorgânicos que seja capaz de auxiliar os Laboratórios do Sistema de Vigilância Sanitária a garantir a qualidade de seus resultados analíticos. Está também de pleno acordo com a missão do INCQS de contribuir para a promoção e recuperação da saúde e prevenção de doenças e de atuar como referência para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle de qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à Vigilância Sanitária.

1.3 BIOACUMULAÇÃO

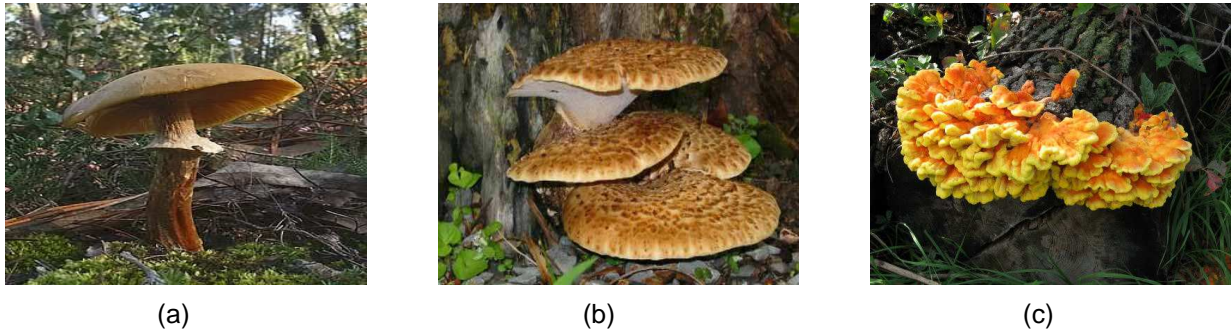
A troca de elementos entre a atmosfera, litosfera e hidrosfera é um ponto essencial para a existência da biosfera. Mecanismos desenvolvidos de incorporação permitem a acumulação seletiva de íons metálicos íons ou moléculas nos seres vivos, distribuindo-os segundo um padrão incrivelmente complexo pelas diversas partes do organismo (BARROS, 2006).

Os cogumelos, como já visto, apresentam um perfil nutricional interessante quanto às concentrações de minerais, devido à absorção de elementos inorgânicos presentes no ambiente onde crescem ou são cultivados.

Como descrito por HUGHES (1975), os processos de aquisição, mecanismos de extração, transporte e incorporação biológica, estão diretamente relacionados com a natureza química de cada elemento, ou seja, nas propriedades que tem origem na configuração eletrônica e espacial e que influenciam a afinidade por outros átomos e moléculas, bem como o comportamento redox. Esses processos também são afetados, tanto por fatores ambientais, tais como o conteúdo de matéria orgânica no substrato e o seu pH, quanto pela composição bioquímica de cada espécie (KALÁČ e SVOBODA, 2000).

Um estudo efetuado por DEMIRBAS e colaboradores (2002) com três espécies, *Armillaria mellea* (Armilária), *Polyporus squamosus* e *Polyporus sulphureus* (Orelhas-de-pau), mostradas na FIGURA 12, comprovou que a absorção de um dado elemento é proporcional ao aumento da concentração do mesmo no substrato. Da mesma forma, a espécie *Pleurotus ostreatus*, o Shimeji, mostrou acumular cobre, zinco e cádmio também proporcionalmente à concentração destes elementos no meio (SANGLIMSUWAN, 1993). Esse fato também foi observado por WANG (2001) para a mesma espécie, inclusive concluindo que o aumento da absorção de um determinado elemento pode ser conseguido com a adição desse elemento ao substrato, no entanto, cabe o registro que TYLER (1982) concluiu, após o estudo de duas espécies, *Collybia peronata* e *Amanita rubescens*, que a captação de elementos inorgânicos (mecanismos de acumulação ou exclusão) tem mais relação com a espécie cultivada do que com as características do substrato.

FIGURA 12 – (a) *Armillaria mellea*, (b) *Polyporus squamosus*, (c) *Polyporus sulphureus*.



Fonte:

(a) http://4.bp.blogspot.com/_bt3W70m_A8M/SQ-qTS-1CtI/AAAAAAAAA-g/_fv2MWS_2SM/s400/Armillaria+mellea.jpg

(b) http://www.pznw.co.uk/wildlife/images/dryads_saddle.jpg

(c) <http://www.rogersmushrooms.com/MediaPath/4195E4510C214C78A3323455999AFAD4.jpg>

Por conta dessa capacidade de acumulação, algumas espécies de cogumelos são consideradas bioindicadores da poluição por metais e demonstraram o aumento da concentração de metais quando presentes em locais contaminados próximos à fundições ou estradas movimentadas (LAAKSOVIRTA e ALAKUIJALA, 1978; BARGAGLI e BALDI, 1984).

1.3.1 Bioacumulação de vanádio, cromo, cádmio e chumbo nas espécies selecionadas para o estudo.

A partir dos trabalhos realizados sobre a acumulação de elementos por cogumelos e pela disponibilidade do fácil acesso ao local de cultivo, ficou decidido que seria interessante estudar a bioacumulação de alguns metais nas espécies selecionadas para o projeto de tese. Escolheu-se estudar a bioacumulação do vanádio, do cromo, do cádmio e do chumbo.

O vanádio foi escolhido para estudo por sua importância no tratamento do diabetes e pela escassez de dados na literatura sobre a acumulação deste elemento nas espécies abordadas no projeto. Sobre a bioacumulação de vanádio, sabe-se que nos cogumelos do gênero *Amanita* (FIGURA 13) o conteúdo desse elemento é cerca de 100 vezes maior do que aquele normalmente encontrado em plantas, menor que 2 mg kg^{-1} (FRAÚSTO, 1991; BERRY, 1999) e que nessa espécie de cogumelo o metal está presente em uma estrutura denominada de amavadina (FIGURA 14).

FIGURA 13 – (a) *Amanita muscaria*, (b) *Amanita phalloides*, (c) *Amanita virosa*



(a)



(b)



(c)

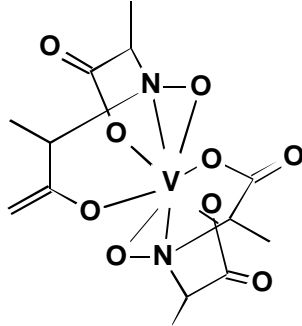
Fonte:

(a) <http://img641.imageshack.us/img641/8218/12752953.jpg>

(b) <http://ciupercei.org/pics/007-Amanita-Phalloides.jpg>

(c) http://nemoo.files.wordpress.com/2007/08/amanita-virosa_edited-2.jpg

FIGURA 14 – Molécula de Amavadina



Como curiosidade, o gênero *Amanita* possui de 900 a 1000 espécies e somente 17 espécies tiveram os seus componentes químicos plenamente estudados (LI, 2005). Alguns dos cogumelos desse gênero são conhecidos pela presença de substâncias com propriedades tóxicas e/ou alucinógenas, sendo estimado que 90% dos casos letais por envenenamento, devido ao consumo de cogumelos provém de duas espécies desse gênero, *Amanita phalloides*, cogumelo conhecido como “Death Cap” ou “Cicutu verde” e *Amanita virosa*; “Destroying Angel” (WIELAND, 1968). Outra espécie, a *Amanita muscaria*, além de ser utilizada em cerimoniais pelo seu efeito alucinógeno é um dos mais belos cogumelos presentes na natureza.

Quanto ao cromo, a escolha foi tanto pela ligação desse metal ao diabetes, pois tem uma função importante no metabolismo da insulina, atuando como um cofator para o hormônio (DDT, 2003), quanto pelo fato de existirem trabalhos poucos trabalhos sobre a avaliação da concentração de cromo nos cogumelos a serem estudados no projeto. Apenas um trabalho para o Shiitake e para o Cardoncello (DE

PAULI, 2010; MOURA, 2008) e três para o Shimeji (DE PAULI, 2010; STURION, 2000 e DEMIRBAŞ, 2001).

O cádmio e o chumbo foram escolhidos como elementos de comparação e controle, pelo fato de já existirem alguns trabalhos sobre a bioacumulação do Cd em espécies, como a *Agaricus bisporus*, o Champignon, *Lentinus tigrinus*, *Russula delica* e sobre a bioexclusão do chumbo (FAVERO, 1991; BALDRIAN, 2003; GARCÍA, 2009; TÜZEN, 2003; RÁCZ, 1998).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

- Caracterizar as três espécies de cogumelos de origem conhecida quanto ao perfil mineral e avaliar a importância nutricional dos cogumelos caracterizados sob o ponto de vista da ingestão de elementos inorgânicos;
- Preparar um material de referência certificado a partir do cogumelo para determinação de elementos inorgânicos em alimentos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração de vanádio e cromo nos cogumelos e nos substratos utilizados em seus cultivos;
- Avaliar a absorção de vanádio e cromo após contaminação do substrato com diferentes compostos de vanádio e mensurar os fatores de bioacumulação.

3 HIPÓTESES

Os cogumelos estudados poderão ser considerados fonte de minerais?

As três espécies de cogumelos terão o mesmo perfil mineral?

O cogumelo será um bom candidato para MRC? Sendo a resposta positiva, todos os elementos determinados poderão ser incluídos num estudo colaborativo?

Qual a concentração de vanádio e cromo nas três espécies a serem estudadas e nos seus respectivos substratos?

Existe diferença na absorção de vanádio e cromo tanto pelas três espécies de cogumelos quanto em relação à contaminação do substrato em diferentes etapas?

Qual o fator de bioacumulação de cada espécie (se houver)?

4 METODOLOGIA

Sendo um dos objetivos a preparação de um material certificado, a metodologia adotada, com algumas modificações, seguiu os tópicos descritos na ISO 35, como coleta do material, acondicionamento, armazenamento, estudos de homogeneidade e estabilidade, estudo interlaboratorial, documentação e avaliação final.

4.1 COLETA E PREPARO DOS COGUMELOS E SUBSTRATOS

4.1.1 Cogumelos – perfil mineral

Um quilo de cada espécie foi coletado trimestralmente durante o ano de 2010, desidratado a 50 °C por 4 h no local do cultivo e posteriormente acondicionado em sacos de polietileno de baixa densidade para ser levado ao laboratório, onde foi guardado sob a temperatura de 7 °C em refrigerador.

Para a determinação dos elementos inorgânicos na amostra previamente desidratada, uma nova secagem foi efetuada no laboratório a 90 °C em estufa por 12 h.

Após a etapa de secagem, os cogumelos foram triturados em processador doméstico (marca Arno) e acondicionados em frascos plásticos de polipropileno.

Três alíquotas de cerca de um grama dos cogumelos secos foram pesadas com exatidão em cadinhos de porcelana aos quais adicionou-se 5 mL de HNO₃ concentrado (Suprapur MERCK) e levou-se a uma chapa de aquecimento a 80 °C por 4 h. Após essa etapa de pré-digestão os cadinhos foram então mantidos por 12h em mufla a 500 °C.

As cinzas foram dissolvidas com 2 mL de HNO₃ 10% m/v e transferidas, quantitativamente, com água desionizada (Milli-Q Millipore 18,2 MΩ cm⁻¹ resistividade), para frascos de polipropileno, aferindo-se o volume final para 15 mL. Replicatas (n=5) dos materiais de referência certificados, Apple Leaves NIST N° 1515 e Mussel Tissue NIST N° 2976, tratados do mesmo modo que as amostras foram executadas em paralelo, a cada procedimento de digestão para verificar a qualidade dos resultados. Também foram preparadas soluções em branco.

Para a determinação de umidade, cinco alíquotas contendo aproximadamente 5 g de cada cogumelo *in natura* foram secas, em separado, à temperatura de 90 °C por 12 h. Após esse tempo foram retiradas da estufa, colocadas em dessecador até a temperatura ambiente (22 °C) e pesadas. O procedimento foi repetido, com o tempo das alíquotas na estufa reduzido para 2 h, até obtenção de peso constante.

Na etapa de trituração das amostras, foi verificada a possibilidade de contaminação através do contato do cogumelo com as partes plásticas e metálicas do processador, mediante três ciclos de processamento com o processador vazio e limpo, com dois solventes: água desionizada e ácido nítrico 1%. Esse procedimento foi efetuado antes do início de processamento da primeira amostra e após a homogeneização da última amostra.

4.1.2 Cogumelos – MRC

Foi adquirido um quilo de Shiitake e seiscentos gramas do Cardoncello do cultivo “Cogumelos Imperial”, previamente desidratados pelo produtor.

Os cogumelos foram secos em estufa a 90 °C por 12 h, sendo posteriormente triturados em moinho de martelo da marca Brahm com tela de granulação de 30 mesh (595 µm) (FIGURA 15). Após a moagem e uma homogeneização manual com uma espátula de plástico, aproximadamente 8 g de cogumelo seco foram acondicionados em sachês de laminado de alumínio e lacrados sob vácuo, gerando o quantitativo de 90 sachês para o Shiitake e 37 para o Cardoncello.

FIGURA 15 - Moinho de martelo e cogumelos desidratados



(a) Cogumelos desidratados prontos para moagem.



(b) Parte interna do moinho.



(c) Cogumelos moídos.



(d) Enchimento dos sachês.

Os sachês foram então divididos em dois grupos; um grupo foi acondicionado em isopor à temperatura ambiente e outro seguiu para ser irradiado com radiação gama (tempo de 56 min e dose de 1 kgy), no Centro Tecnológico do Exército, Seção de Defesa Nuclear, localizado em Barra de Guaratiba no Rio de Janeiro, sob a supervisão do Doutor Hélio de Carvalho Vital.

Todos os sachês foram devidamente codificados para identificar a espécie de cogumelo e o tipo de técnica utilizada na conservação: secagem ou irradiação.

Para a determinação dos elementos inorgânicos foram efetuados dois procedimentos:

a) Calcinação: Pesou-se com exatidão cerca de 1 g da amostra em cadinho de porcelana, adicionou-se 5 mL de ácido nítrico e procedeu-se à secagem em chapa de aquecimento, a 90 °C. Após a secagem, procedeu-se a calcinação a 450

°C por 12 h, em mufla, sendo que a temperatura foi em aumentada a cada hora, de 50 °C até alcançar os 450 °C.

b) Microondas: Uma massa de cerca de 0,5 g de amostra foi medida em uma barquinha de polipropileno e transferida para o frasco a ser utilizado no microondas, ao qual adicionou-se 5 mL de ácido nítrico. Após ter sido fechado, o frasco foi levado ao forno de microondas e o programa de digestão iniciado conforme TABELA 4.

TABELA 4 – Programa de digestão do microondas.

Temperatura (°C)	Pressão (Bar)	Rampa de alteração da temperatura (min)	Tempo de permanência na temperatura (min)	Potência (% da máxima *)
170	50	2	5	90
190	50	5	15	90
50	0	1	10	0
50	1	1	1	0

* Potência máxima: 1450W.

Os dois procedimentos de digestão, calcinação e microondas, foram efetuados e comparados posteriormente, a partir da digestão de materiais de referência.

4.2 ESTUDOS DA HOMOGENEIDADE E ESTABILIDADE – MRC

4.2.1 Homogeneidade

Para avaliação da homogeneidade dos dois cogumelos candidatos a material de referência, Shiitake e Cardoncello, 10 itens de ensaio (sachês) de cada espécie contendo o cogumelo seco e irradiado foram aleatoriamente selecionados utilizando a função “ALEATORIOENTRE” do programa Excel[®]. Essa função permite a escolha aleatória entre dois números definidos.

De cada item de ensaio foram retiradas duas alíquotas de cerca de 1 g cada, as quais foram tratadas conforme descrito em 4.1.2 (calcinação). As alíquotas foram denominadas de Sub-amostra 1 e Sub-amostra 2.

De acordo com a ISO 13528, foi calculada a média $\bar{x}_{t,k}$ (t igual ao número da amostra ($t = 1, 2, \dots, g$) e k o número da alíquota ($k = 1, 2$)) entre as duas alíquotas

(sub-amostras 1 e 2) para cada cogumelo, e em seguida, calculou-se a média geral, \bar{x} .

O desvio padrão das médias obtidas para cada amostra, s_x , foi calculado conforme a Equação 1, sendo o grau de liberdade igual ao número de itens de ensaio, 10, subtraído de uma unidade.

$$s_x = \sqrt{\sum (x_t - \bar{x})^2 / (g - 1)} \quad (1)$$

Calculou-se também, para cada amostra, a amplitude, ou seja, a diferença entre as sub-amostras, w_t , a partir da Equação 2.

$$w_t = |x_{t,1} - x_{t,2}| \quad (2)$$

Dos valores definidos acima, calculou-se os desvios padrão, s_w e s_s , respectivamente, dentro das amostras e entre as amostras, conforme as Equações 3 e 4, a seguir:

$$s_w = \sqrt{\sum w_t^2 / (2g)} \quad (3)$$

$$s_s = \sqrt{s_x^2 - (s_w^2 / 2)} \quad (4)$$

Os resultados obtidos permitirão afirmar que as amostras são **suficientemente homogêneas** para serem utilizadas em um estudo colaborativo se atenderem ao critério estabelecido na Equação 5. Nessa equação, o termo \hat{s}_H é o desvio padrão alvo (DA) obtido através da equação de HORWITZ (Equação 6) para a concentração média de cada elemento no estudo de homogeneidade e c é o nível de concentração expresso em fração mássica, por exemplo, $1 \cdot 10^{-6}$ para a faixa de concentração expressa em mg kg^{-1} .

$$s_s \leq 0,3\hat{s}_H \quad (5)$$

$$\hat{s}_H = 0,02c^{0,8495}$$

(6)

4.2.2 Estabilidade

Para cada amostra de cogumelo candidata a MRC, foi estudada a estabilidade a longo e a curto prazo dos itens de ensaio, com a finalidade de definir quais condições específicas de temperatura e tempo poderiam ser devidamente estabelecidas, sem prejudicar os valores de propriedades das amostras a longo prazo.

Avaliou-se a estabilidade temporal entre as amostras irradiadas e não irradiadas dos dois cogumelos considerando-se os seguintes números de dias: 0; 30; 60; 90; 180, 240 e 360. Nesse tempo, as amostras foram mantidas na mesma temperatura, 21 °C.

A estabilidade de curta duração foi estudada, a fim de verificar o comportamento da amostra sob uma condição de temperatura adversa no transporte. Esse estudo foi efetuado durante o tempo de 7 dias comparando-se os itens de ensaio à temperatura ambiente e à temperatura de 40 °C (estufa).

Os resultados foram avaliados através da análise dos resíduos da regressão linear, obtendo tanto os valores do coeficiente angular quanto os intervalos de confiança, de acordo com o que estabelece a ISO Guide 35 (2006).

Como pode ser visualizado na equação 7, foi calculado o erro padrão, s_e , do valor de y , número de dias, para cada valor de x , concentração, de acordo com a equação 8, sendo \hat{y}_i o valor previsto de y_i para um determinado x_i e n o número de pares x, y considerados na regressão.

$$s_e = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \quad (7)$$

$$y = ax + b \quad (8)$$

A partir do valor de s_e , calculou-se o erro padrão do coeficiente angular, s_a , como descrito pela Equação 9.

$$s_a = \sqrt{\frac{s_e^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (9)$$

Desta forma, a partir do valor de t de Student obtido para o nível de confiança de 95% e n pares x, y , obtém-se de acordo com a Equação 10, o intervalo de confiança (IC).

$$\text{IC} = a \pm t_{0,95;n-2} \cdot s_a \quad (10)$$

4.3 ESTUDO COLABORATIVO – MRC

Após o cumprimento das etapas acima, deu-se início a um estudo colaborativo (EC) com laboratórios de Instituições públicas e privadas que possuem equipamentos compatíveis com os utilizados nesse trabalho e que se propuseram a participar do estudo.

A finalidade dessa etapa foi de se obter o valor designado para cada elemento caracterizado na matriz candidata a MRC.

O procedimento experimental para análise de dados seguiu a indicação estabelecida no item 10.5.2 da ISO Guide 35 (2006; VAN DER VEEN et al. 2001), no qual a média das médias dos resultados, $\bar{\bar{x}}$, de todos os laboratórios participantes é a melhor escolha para ser o valor de propriedade do material. As equações utilizadas estão apresentadas abaixo:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^{n_i} x_i \quad (11)$$

$$\bar{\bar{x}} = \frac{1}{p} \sum_{i=1}^p Y_i \quad (12)$$

Onde: x_{ij} = os resultados j reportados pelos laboratórios i .

p = o número de laboratórios participantes

n_i = o número de resultados reportados pelos laboratórios i .

$\bar{\bar{x}} = \bar{Y}$ = média das médias.

A incerteza padrão combinada associada com a média das médias foi calculada através das equações 13 e 14.

$$s^2 = \frac{1}{p-1} \sum_{i=1}^p (Y_i - \bar{Y})^2 \quad (13)$$

Onde: $(Y_i - \bar{Y})^2 = (\bar{x}_i - \bar{x})^2$

A incerteza padrão combinada foi calculada através da equação 14.

$$u_{carac} = \frac{s}{\sqrt{p}} \quad (14)$$

4.4 CONTAMINAÇÃO E DIGESTÃO DOS SUBSTRATOS

4.4.1 Contaminação do substrato

A contaminação do substrato por cada metal foi feita separadamente e realizada em duas etapas distintas do cultivo: no início da colonização do substrato e no substrato já colonizado. Os procedimentos adotados em cada etapa encontram-se descritos abaixo.

1- Por diluição de 5 g de cada elemento na forma de sais (cloretos de chumbo, cádmio e cromo, metavanadato de sódio e sulfato de vanadila) em tanques diferentes que foram completados com 1000 L de água, resultando em uma solução aquosa com concentração final de 5 mg L^{-1} a ser utilizada para o choque térmico (FIGURA 16)

Nessa etapa foram utilizados 25 sacos contendo os substratos colonizados, os quais permaneceram submersos por 12 h.

FIGURA 16 – (a) Caixa d'água utilizada para choque térmico com tocos submersos (b) Tocos de substrato após o choque térmico.



(a)



(b)

2- Pela aplicação de solução na concentração de 1000 mg L^{-1} diretamente no substrato já ensacado e em fase de colonização. Cada solução foi injetada por uma seringa com agulha de 2 cm e diâmetro de 2 mm, resultando em uma concentração final de 8 mg kg^{-1} para cada elemento em cada conjunto de sacos de substrato, como exemplificado na TABELA 5 e na FIGURA 17.

A injeção foi efetuada em quatro pontos diferentes do saco na parte superior e de baixo para cima.

TABELA 5 – Volumes totais injetados de cada solução e concentração final no saco de substrato.

<u>Volume total injetado</u> (mL)	<u>Concentração da solução</u> (mg L^{-1})	<u>Metal (Sal)</u>
12	1000	Cr (CrCl_3)
12	1000	V (VOSO_4)
12	1000	V (NaVO_3)
12	1000	Pb (PbCl_2)
<u>Peso do saco</u> (kg)	<u>Concentração final do metal no saco</u> (mg kg^{-1})	
1,5	8	

FIGURA 17 – Sacos de substrato em fase de colonização injetados com as soluções dos metais.



4.4.2 Digestão dos substratos

Seguindo o procedimento realizado por BERVOETS (2005), foi efetuada a tamização de 50 g de substrato em peneira de 500 mesh com posterior transferência para bquer de 500 mL e adição de 200 mL de água desionizada. Após 2h de repouso foi efetuada a filtração, com filtro qualitativo, e o decantado foi seco a 60 °C por 48 h. Procedeu-se à digestão com HNO_3 e $HClO_4$ (4:1) e transferiu-se quantitativamente, com água desionizada, para balão volumétrico de 1000 mL. Para a determinação dos elementos inorgânicos foi efetuada uma diluição de 40x com água desionizada.

5 MÉTODOS ANALÍTICOS

Na quantificação das concentrações dos vinte e cinco elementos (Al, As, Ba, Bi, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Ga, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Rb, Sb, Se, Sn, Sr, V e Zn) foram utilizados dois Espectrômetros de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado, sendo um da marca Thermo Scientific, modelo X-Series 2 e outro da marca Perkin Elmer, modelo ELAN 6000, e um Espectrômetro de Absorção Atômica com chama da marca Perkin Elmer, modelo AA400.

As condições operacionais usadas na técnica de Espectrometria de Absorção Atômica com chama (FAAS) para a determinação de Ca, K, Na, Mg, Fe e Zn foram as constantes no software do equipamento e estão apresentadas na TABELA 6. As condições para determinar os demais elementos pela técnica de Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS) podem ser visualizadas na TABELA 7.

Uma descrição sucinta sobre o fundamento das duas técnicas, FAAS e ICP-MS, e sobre os principais componentes dos respectivos instrumentos, bem como, os procedimentos efetuados para o controle das interferências pertinentes à cada técnica encontram-se nos itens 5.1 e 5.2.

TABELA 6 – Condições operacionais e comprimentos de onda (λ) utilizados em FAAS para determinação de Ca, K, Na, Mg, Fe e Zn.

ELEMENTO	λ (nm)	Fendas (mm)	Vazão dos gases (L min ⁻¹)
Ca	422,67	2,7-0,6	6,00-7,10
Fe	248,33	1,8-1,35	10-2,5
K	767,49	2,7-0,45	10-2,98
Mg	285,21	2,7-1,05	10-2,5
Na	589,00	1,8-0,6	10,88-3,62
Zn	213,86	2,7-1,8	10-2,5

Observações:

- 1- As vazões dos gases referem-se aos gases ar e acetileno, respectivamente, com exceção do elemento cálcio, utilizado o óxido nitroso ao invés do ar.
- 2- Os valores para as fendas referem-se à largura e à altura.

TABELA 7 – Condições operacionais do ICP-MS e parâmetros de aquisição de dados:

X-Series 2	
Potência do gerador de RF (W)	1400
Vazão de Ar (Plasma) (L min ⁻¹)	13
Vazão de Ar (gás Auxiliar) (L min ⁻¹)	0,7
Vazão de Ar (Nebulizador) (L min ⁻¹)	0,98
Vazão do gás CCT (8%H ₂ /He)	6,98
Focus (V)	-5,3
Extração (V)	-94,1
Hexapolo Bias (V)	-10
Tempo de residência (ms) (dwell time)	20
Modo de varredura	Peak jump
Número de réplicas	3
Câmara de nebulização	Cônica
Nebulizador	Concêntrico
ELAN 6000	
Nebulizer Gas Flow	1,11
Lens Voltage	12,75
ICP RF Power	1175
Analog Stage Voltage	-2562,00
Pulse Stage Voltage	1300,00
Discriminator Threshold	30,00
AC Rod Offset	-13,00
Número de réplicas	3

5.1 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA (FAAS)

A técnica de absorção atômica é utilizada em um vasto campo de aplicações para a determinação de elementos inorgânicos e tem como fundamento, a absorção de radiação eletromagnética pelo analito de interesse, advinda de uma fonte de emissão, em um comprimento de onda específico.

Os principais componentes de um espectrômetro são o a fonte de emissão, o sistema de nebulização, o queimador, o detector e o sistema de aquisição de dados.

As interferências presentes na técnica de FAAS e que podem afetar a concentração determinada do analito de interesse podem ser espectrais e não espectrais (química, de matriz, de ionização, de fundo).

A interferência espectral ocorre por sobreposição de linhas de absorção, em elementos específicos, por exemplo, fato que não é comum e para os elementos determinados nesse projeto não ocorre. O maior cuidado foi relacionado às interferências não-espectrais, e a mais importante, advinda da ionização do analito de interesse, deve ser corrigida com a supressão da ionização com a adição de uma solução que contenha um elemento químico com uma menor energia de ionização.

Para os elementos analisados neste projeto por FAAS, Ca, K, Na, Mg, Fe e Zn, utilizou-se soluções supressoras de ionização para os três primeiros: cloreto de céσιο (2000 mg kg⁻¹ na solução final) para a determinação de Na e K e cloreto de potássio (5000 mg kg⁻¹ na solução final) para a determinação do Ca. Nas determinações de Fe e Zn foi utilizado a correção de fundo (background) através do uso de uma lâmpada de deutério, já presente no instrumento e a determinação do Mg não demandou maiores cuidados.

5.2 ESPECTROMETRIA DE MASSA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO (ICP-MS)

A técnica de ICP-MS possui características multielementares, baixos limites de detecção, ampla faixa linear, uma eficiente geração de íons monovalentes e espectro de massa simples e de fácil interpretação. A técnica baseia-se na separação dos íons positivos produzidos em um plasma em função da razão massa/carga (THOMAS, 2008).

5.2.1 Interferências espectrais

Esse tipo de interferência se deve à formação de íons de óxidos e dupla carga, à sobreposição isobárica, além de íons poliatômicos, os quais possuem a mesma razão massa/carga (m/z) que o analito de interesse (D'ILIO et al., 2011).

A TABELA 8 apresenta exemplos de elementos que podem sofrer interferência espectral devido aos óxidos, hidróxidos, íons de dupla carga e na TABELA 9 podem ser visualizados os isótopos utilizados no projeto.

TABELA 8 – Exemplos de espécies químicas que sofrem interferência de óxidos, hidróxidos, íons de dupla carga e espécies poliatômicas.

Óxidos, hidróxidos, dupla carga e espécies poliatômicas	Analito afetado
$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$, $^{37}\text{Cl}^{14}\text{N}$	$^{51}\text{V}^+$ (99,76%)
$^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$, $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{36}\text{S}^{16}\text{O}^+$	$^{52}\text{Cr}^+$ (83,76%)
$^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$, $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$	$^{56}\text{Fe}^+$ (91,72%)
$^{40}\text{Ca}^{16}\text{OH}^+$	$^{57}\text{Fe}^+$ (2,2%)
$^{43}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$	$^{59}\text{Co}^+$ (100%)
$^{46}\text{Ca}^{16}\text{OH}^+$	$^{63}\text{Cu}^+$ (69,17%)
$^{48}\text{Ti}^{16}\text{O}^+$	$^{64}\text{Zn}^+$ (48,6%)
$^{48}\text{Ca}^{16}\text{OH}^+$	$^{65}\text{Cu}^+$ (30,83%)
$^{138}\text{Ba}^{++}$	$^{69}\text{Ga}^+$ (60,108%)
$^{40}\text{Ar}^{++}$, $^{64}\text{Zn}^{16}\text{O}^+$	^{80}Se (49,82%)

OBS: A abundância natural encontra-se entre parênteses.

TABELA 9 – Isótopos utilizados na determinação dos elementos por ICP-MS.

Elemento	Isótopo
Al	27
As	75
Ba	137
Bi	209
Cd	111
Cr	52
Cu	65
Fe	56 e 57
Ga	69
Li	7
Mn	55
Mo	95
Ni	60
Pb	208
Rb	85
Sb	121
Se	82
Sn	118
Sr	88
V	51
Zn	66

O isótopo ^{56}Fe foi determinado no instrumento, X-series 2, através do uso da interface célula de colisão (Collision Cell Technology – CCT), no qual o gás inerte, He, foi utilizado para atenuar os interferentes poliatômicos ($^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$, $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$) por processos colisionais.

5.2.2 Interferências não espectrais

As interferências não espectrais em ICP-MS são caracterizadas pela variação do sinal do analito (aumento ou redução), devido a problemas no transporte da amostra, na eficiência na produção de íons no plasma e do efeito de carga espacial (extração e condução dos íons ao analisador de massas) (THOMAS, 2008).

Todas as determinações foram efetuadas procurando atenuar as diferenças entre as propriedades físico-químicas das soluções de referência e da amostra

(viscosidade, densidade, tensão superficial). As amostras foram diluídas em água desionizada e manteve-se a concentração de ácido, nas amostras e soluções-padrão, equivalentes.

Utilizou-se como padrão interno o ^{103}Rh , elemento que foi adicionado em linha à todas as soluções analisadas por ICP-MS, com a finalidade de corrigir as variações temporais da intensidade do sinal, decorrentes do comportamento físico diferenciado dos analitos no plasma.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 PERFIL MINERAL

6.1.1 Desempenho analítico

O parâmetro linearidade foi avaliado em todas as curvas analíticas mediante a inspeção visual e em relação aos coeficientes de correlação obtidos. De acordo com Miller (1989), valores de r maiores do que 0,99 avaliados em conjunto com a visualização gráfica da curva analítica são suficientes para assegurar que existe uma relação linear entre as variáveis, x e y .

Todos os coeficientes de correlação obtidos nas determinações efetuadas por ICP-MS e por AAS ($r > 0,998$) sugerem relações lineares entre a faixa de trabalho e as contagens ou absorvâncias.

Para dirimir eventuais dúvidas quanto à linearidade, foi utilizado o teste de Mandel (MANDEL, 1964), o qual testa a hipótese do modelo não-linear ter um melhor ajuste que o linear, através dos resíduos das regressões de primeira e segunda ordem. Como exemplo é apresentada a verificação da linearidade da curva analítica do cálcio (TABELA 10).

TABELA 10 – Avaliação da curva analítica do cálcio obtida por AAS através da planilha de cálculo do teste de Mandel.

No.	Valores de x Concentração AB (mg L ⁻¹)	Valores de y Absorvância (Abs)
1	1	0,115
2	2	0,225
3	2,5	0,274
4	3	0,336
5	4	0,425
6	5	0,538
Desvio-padrão residual da função de calibração de primeira ordem :		
	0,01269959	Abs
Desvio-padrão residual da função de calibração de segunda ordem :		
	0,00562298	Abs
Desvio-padrão ² =	0,00055026	Abs ²
Valor de teste =	17,4035849	
F(f1=1, f2=N-3,P99%)=	34,1160558	
Resultado:	O modelo não linear não leva a um ajuste significativamente melhor.	

A veracidade do procedimento analítico das duas técnicas utilizadas e nos três equipamentos utilizados no projeto foi verificada através do uso de dois materiais de referência certificados do National Institute of Standards and Technology (NIST), Apple Leaves n°1515 e Mussel Tissue n°2976, e os resultados estão apresentados nas TABELAS 11, 12 e 13.

As médias das três determinações são referentes aos valores obtidos de três determinações trimestrais (n=5) efetuadas em paralelo com a leitura das amostras.

O instrumento da Perkin Elmer somente foi utilizado nos últimos experimentos, sendo efetuado somente uma determinação com os dois materiais de referência.

TABELA 11 – Recuperação percentual das análises efetuadas com os dois MRC por ICP-MS no instrumento da marca Thermo, modelo X-series 2.

<u>APPLE LEAVES</u>	<u>Concentração mg kg⁻¹</u>						<u>Concentração µg kg⁻¹</u>			
	Al	Cu	Fe	Mn	Rb	Zn	Mo	Pb	Se	V
1ª determinação	250	5,4	29	17	11,1	11,3	65	226	40	180
2ª determinação	329	6,5	85	51	10,3	10,1	82	719	64	293
3ª determinação	332	5,9	106	96	8,5	9,7	80	435	53	239
<u>Média</u>	303	5,9	74	55	10	11	76	460	52	237
<u>Concentração certificada</u>	286	5,6	83	54	10,2	12,5	94	470	50	260
<u>% do valor certificado</u>	106	105	89	102	98	88	80	98	104	91
<u>MUSSEL TISSUE</u>	<u>Concentração mg kg⁻¹</u>				<u>Concentração µg kg⁻¹</u>					
	Al	Cu	Fe	Zn	Pb	Sn				
1ª determinação	151	4,4	164	114	-----	71				
2ª determinação	192	4,6	207	111	1151	42				
3ª determinação	106	4,6	155	137	1021	34				
<u>Média</u>	149	4,5	175	121	1086	49				
<u>Concentração certificada</u>	134	4,02	171	137	1190	96				
<u>% do valor certificado</u>	111	112	102	88	91	51				

NOTA: A 1ª determinação do Pb não foi determinada por um erro operacional.

TABELA 12 – Recuperação percentual das análises efetuadas com os dois MRC por ICP-MS no instrumento da marca Perkin Elmer, modelo ELAN 6000.

APPLE LEAVES	Concentração mg kg⁻¹						Concentração µg kg⁻¹			
	Al	Cu	Fe	Mn	Rb	Zn	Mo	Pb	Se	V
Concentração obtida	288	5,3	78	55	10	11	95	471	51	258
Concentração certificada	286	5,6	83	54	10,2	12,5	94	470	50	260
% do valor certificado	101	95	94	102	102	90	101	100	102	99

MUSSEL TISSUE	Concentração mg kg⁻¹				Concentração µg kg⁻¹	
	Al	Cu	Fe	Zn	Pb	Sn
Concentração obtida	145	4,4	173	125	1203	57
Concentração certificada	134	4,02	171	137	1190	96
% do valor certificado	108	109	101	91	101	59

TABELA 13 – Recuperação percentual das análises efetuadas com os dois MRC por FAAS.

APPLE LEAVES	Concentração mg kg⁻¹			
	Fe	K	Na	Zn
1ª determinação	80	16008	28,1	12,1
2ª determinação	70	16545	26,1	13,4
3ª determinação	76	15997	26	11
Média	75	16183	26,7	12,2
Concentração certificada	83	16100	24,4	12,5
% do valor certificado	91	101	110	97

MUSSEL TISSUE	Concentração mg kg⁻¹			
	Fe	K	Na	Zn
1ª determinação	175	9478	38502	117
2ª determinação	176	9587	39001	131
3ª determinação	178	9662	40087	125
Média	176	9576	39197	124
Concentração certificada	171	9700	35000	137
% do valor certificado	103	99	112	91

Observou-se que, para a maioria dos elementos estudados, as concentrações encontradas foram concordantes com os valores certificados, isto é, situaram-se entre 88 a 112% dos valores certificados, com exceção do Sn com uma recuperação de 51%. Os valores de recuperação, nas concentrações medidas dos 13 elementos presentes nos dois MRC, com poucas exceções, Cu-112%, Na-112%, Sn-51 e 59%, estão de acordo com as faixas aceitáveis presentes no documento da Associação de Comunidades Analíticas (AOAC, 1998), apresentados na TABELA 14.

TABELA 14 – Faixa de aceitação do fator de veracidade/recuperação.

Concentração (C)	Intervalos (%)
10000 mg kg ⁻¹	97-103
1000 mg kg ⁻¹	95-105
100 mg kg ⁻¹	90-107
10 mg kg ⁻¹	80-110
1 mg kg ⁻¹	80-110
100 µg kg ⁻¹	80-110
10 µg kg ⁻¹	60-115
1 µg kg ⁻¹	40-120

Fonte: AOAC Peer-Verified Methods Program, Manual on policies and procedures, Arlington, Va., USA (1998).

A baixa recuperação do Sn não foi fruto de pesquisa mais aprofundada, por não ser um elemento de alta relevância para a conclusão do estudo.

O desvio-padrão relativo de cada método foi avaliado através da análise de 5 alíquotas individuais dos dois MRCs e para todos os elementos determinados, nas duas técnicas analíticas, ICP-MS e FAAS, situou-se na faixa de 2 a 11%. Os valores obtidos estão de acordo com os valores constantes do documento da Associação de Comunidades Analíticas (AOAC, 1998), apresentados na TABELA 15.

TABELA 15 – Valores de aceitação para o desvio-padrão relativo.

Concentração	Desvio-padrão relativo
100 mg kg ⁻¹	5,3
10 mg kg ⁻¹	7,3
1 mg kg ⁻¹	11
0,1 mg kg ⁻¹	15
0,01 mg kg ⁻¹	21
0,001 mg kg ⁻¹	30

Fonte: AOAC Peer-Verified Methods Program, Manual on policies and procedures, Arlington, Va., USA (1998).

Em relação à incerteza, foram considerados para fins de cálculo os seguintes fatores: repetitividade; preparo da amostra; preparo dos padrões; curva analítica e resolução do equipamento. No cálculo da incerteza associada aos valores de concentração, optou-se por considerar a maior incerteza (4%), calculada na determinação do potássio por FAAS, como a incerteza para todos os demais elementos. Detalhes sobre o cálculo podem ser vistos na TABELA 16.

TABELA 16 – Cálculo da incerteza da medição para a determinação de potássio por FAAS.

Fatores	Estimativa da grandeza	Fonte da incerteza	Valor da incerteza ±	Unidade	Distr.	DIV.	C _(i)	u(i)
Concentração	18967	Repetitividade	1037,00	mg L ⁻¹	Normal	3,16	1	0,01729
Diluição e massa	18966,667	U preparo da amostra	0,00841	mg L ⁻¹	Normal	2,00	1	0,00000
Padrão	1	U preparo dos padrões	0,013304	mg L ⁻¹	Normal	2,00	1	0,00017
Concentração	18967	U curva	0,005224	mg L ⁻¹	retangular	1,73	1	0,00000
Concentração	18967	U equipamento	189,6660	mg L ⁻¹	retangular	1,73	1	0,00578
Concentração	18967	resolução	0,005000	mg L ⁻¹	retangular	1,73	1	0,00000
uc		Incerteza padrão Combinada						0,01823
Resultado=	18967	mg L ⁻¹						
U		Incerteza padrão Expandida (95,45%)						k= 2,25 0,041109 relativo
a=		0,021557471						779,69544 mg L ⁻¹
b=		0,390413793						4,111 %

6.1.2 Avaliação dos processos de decomposição, por microondas e por calcinação.

O material de referência, Apple Leaves, foi submetido aos dois processos de decomposição utilizados para as amostras, por microondas e calcinação, e os desvios-padrão obtidos foram comparados através da análise de variância, fator único (TABELA 17 e ANEXO 1). De acordo com os valores calculados, todos os valores obtidos de F foram menores que o F crítico, indicando que os dois conjuntos de dados apresentaram variâncias equivalentes ao nível de significância avaliado (95%).

Os dois processos de decomposição também foram comparados através do teste t unicaudal (Equação 15) e os resultados obtidos indicaram haver diferença estatisticamente significativa somente para o Na. Para os demais elementos não houve diferença significativa entre cada um dos conjuntos de dados e os valores certificados para o MRC utilizado no estudo.

$$t = \frac{(\bar{x}_{\text{calcinação ou microondas}} - \bar{x}_{\text{certificado}}) \sqrt{n}}{S_{\text{calcinação ou microondas}}} \quad (15)$$

TABELA 17 – Comparação dos dois processos de decomposição de amostra, por calcinação e microondas.

Método de digestão	Concentração - mg kg ⁻¹									Concentração - µg kg ⁻¹		
	Al	Cu	Fe	K	Mn	Na	Rb	Zn	Pb	Se	V	
<u>CALCINAÇÃO</u>												
Alíquotas												
1	310	5,9	75,7	15636	49,9	30,8	10,6	11,0	525	53,2	277	
2	276	4,9	77,8	17001	55,3	27,9	11,2	10,6	396	32	203	
3	299	6,4	75,5	15360	54,6	26,8	9,8	14,3	536	62,5	283	
Média	295	5,73	76,3	15999	53,3	28,5	10,5	12,0	486	49,2	254	
s	17	0,76	1,7	879	2,9	2,1	0,7	2,0	78	15,6	45	
<u>MICROONDAS</u>												
1	291	6,2	82,5	15856	55,3	23,2	10,1	12,5	451	49,6	245	
2	295	6,0	83,8	16001	56,4	24,1	11,5	11,5	658	39,9	274	
3	286	4,7	81,4	16246	54,3	26,6	9,9	12,0	451	61,3	232	
Média	291	5,63	82,6	16034	55,3	24,6	10,5	12,0	520	50,3	250	
s	5	0,81	1,2	197	1,1	1,8	0,9	0,5	120	11	22	
<u>Concentração certificada</u>	286	5,6	83	16100	54	24,4	10,2	12,5	470	50	260	
F calculado	0,19	0,04	0,69	0,005	1,25	6,01	0,11	0,001	0,173	0,008	0,018	
F crítico						7,709						
t calculado												
Calcinação	0,899	0,302	0,591	0,199	0,433	3,437	0,822	0,455	0,349	0,085	0,220	
Microondas	1,793	0,071	0,625	0,577	2,199	0,229	0,596	1,732	0,725	0,043	0,779	
t crítico						2,920						

NOTA: Determinações efetuadas por ICP-MS (Instrumento da Thermo). Na e K por FAAS.

6.1.3 Avaliação do processo de trituração dos cogumelos.

Como descrito em 4.1.1, na trituração do cogumelo, estudou-se a possibilidade de contaminação do cogumelo por algum dos elementos, a serem determinados no projeto, a partir do contato com as partes plásticas e metálicas do processador. Para isso, não possuindo um cogumelo isento dos 25 elementos a serem analisados, optou-se por fazer uma avaliação da concentração desses elementos, antes do início de processamento da primeira amostra e ao término da trituração da última amostra, através da utilização de dois solventes, água desionizada e ácido nítrico 1%.

Em dois recipientes do processador adicionou-se a quantidade de, aproximadamente, 100 mL, de cada um dos solventes, especificados acima. Efetuaram-se três ciclos de processamento, de 5 segundos cada, e ao final, um

volume de, aproximadamente, 15 mL, de cada solução, foi transferido para um frasco plástico e as concentrações dos elementos determinadas posteriormente.

De acordo com as concentrações obtidas para os analitos de interesse (TABELA 18), o aumento da concentração ocorreu, notadamente, para o Al, Ba, Fe, Mn e Sr, mas em níveis que não afetaram os valores de concentração dos elementos determinados nos cogumelos.

TABELA 18 – Concentração dos analitos de interesse na água desionizada e no HNO₃ 1% no início e ao final do procedimento de trituração.

Elementos	Água desionizada INÍCIO	Água desionizada FINAL	HNO ₃ 1% INÍCIO	HNO ₃ 1% FINAL
	Concentração - mg L⁻¹			
Al	0,079	0,101	0,509	0,809
As	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Ba	< 0,001	0,003	0,075	0,087
Be	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Bi	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Ca	0,012	0,020	0,028	0,022
Cd	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Co	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Cr	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Cs	0,016	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Cu	0,006	0,006	0,009	0,008
Fe	0,038	0,043	0,559	0,550
Ga	< 0,001	< 0,001	0,002	0,002
In	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Li	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Mg	0,016	0,016	0,028	0,030
Mn	0,003	0,005	0,152	0,144
Mo	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Ni	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Pb	< 0,001	< 0,001	0,004	0,004
Rb	< 0,001	< 0,001	0,013	0,014
Sb	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Se	< 0,001	< 0,001	0,002	0,002
Sn	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Sr	< 0,001	< 0,001	0,088	0,088
V	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Zn	0,010	0,021	0,024	0,027

6.1.4 Concentrações dos elementos estudados nas três espécies de cogumelos.

As variações inter-espécies observadas podem ser atribuídas às características de cada uma e as variações entre as coletas, atribuídas principalmente a diferenças amostrais, por exemplo, tamanho e peso dos indivíduos processados, distribuição não homogênea dos elementos nas diversas partes dos cogumelos, etc, embora tenha se procurado homogeneizar o máximo possível as amostras coletadas. Durante este estudo foi mantido constante o local de cultivo de todas as espécies e a natureza dos substratos utilizados.

As concentrações médias (n=4) dos vinte e cinco elementos determinados em cada espécie de cogumelo e nas quatro coletas trimestrais efetuadas em 2010 estão sumarizados nas TABELAS 19, 20, 21 e 22.

TABELA 19 – Concentrações dos macronutrientes na massa seca, determinadas por FAAS nas amostras dos cogumelos Shiitake, Shimeji e Cardoncello coletadas trimestralmente no ano de 2010.

SHIITAKE					SHIMEJI				
Concentração (mg kg⁻¹)					Concentração (mg kg⁻¹)				
	Ca	Na	K	Mg		Ca	Na	K	Mg
<u>1a coleta</u>	45	10,6	14017	5005	<u>1a coleta</u>	59	4,5	22008	2271
<u>2a coleta</u>	61	12,0	17501	4999	<u>2a coleta</u>	43	4,9	32500	2532
<u>3a coleta</u>	40	8,9	14000	3100	<u>3a coleta</u>	41	4,4	21007	2000
<u>4a coleta</u>	42	9,0	14480	3934	<u>4a coleta</u>	51	4,7	22823	2435
<u>Média</u>	47	10,1	15000	4260	<u>Média</u>	55	4,6	24585	2310
Máximo	61	12,0	17501	5005	Máximo	59	4,9	32500	2532
Mínimo	40	8,9	14000	3100	Mínimo	41	4,4	21007	2000

CARDONCELLO				
Concentração (mg kg⁻¹)				
	Ca	Na	K	Mg
<u>1a coleta</u>	57	8,1	18773	4700
<u>2a coleta</u>	61	6,1	17337	3244
<u>3a coleta</u>	57	5,9	17047	2584
<u>4a coleta</u>	61	5,9	17004	3405
<u>Média</u>	59	6,5	17540	3483
Máximo	61	8,1	18773	4700
Mínimo	57	5,9	17004	2584

TABELA 20 – Concentrações de micronutrientes e elementos-traço na massa seca, determinados por ICP-MS nas amostras do cogumelo **SHIITAKE** coletadas trimestralmente no ano de 2010.

	SHIITAKE																				
	Concentração (mg kg⁻¹)										Concentração (µg kg⁻¹)										
	²⁷ Al	¹³⁷ Ba	⁶⁵ Cu	⁵⁶ Fe	⁷ Li	⁵⁵ Mn	⁶⁰ Ni	⁸⁵ Rb	⁶⁶ Zn	⁷⁵ As	²⁰⁹ Bi	¹¹¹ Cd	⁵² Cr	⁶⁹ Ga	⁹⁵ Mo	²⁰⁸ Pb	¹²¹ Sb	⁸² Se	¹¹⁸ Sn	⁸⁸ Sr	⁵¹ V
1a	78	1,34	2,3	555	1,22	69	1,63	43	74	191	32	119	555	87	1000	199	35	139	38	311	95
2a	90	1,36	1,7	676	0,47	29	1,35	42	134	98	35	247	775	108	810	170	37	128	206	260	116
3a	90	1,33	12,5	435	0,74	21	1,57	52	82	106	37	200	685	273	753	490	30	141	64	320	94
4a	68	1,35	7,4	428	0,83	47	1,42	56	158	147	31	133	523	154	1278	195	32	122	77	350	58
Média	82	1,35	6,0	524	0,82	41	1,49	48	112	136	34	175	635	156	960	264	33	130	96	310	91
Máximo	90	1,36	12,5	676	1,22	69	1,63	56	158	191	37	247	775	273	1278	490	37	141	206	350	116
Mínimo	68	1,33	1,7	428	0,47	21	1,35	42	74	98	31	119	523	87	753	170	30	122	38	260	58

TABELA 21 – Concentrações de micronutrientes e elementos-traço na massa seca, determinados por ICP-MS nas amostras do cogumelo **SHIMEJI** coletadas trimestralmente no ano de 2010.

	SHIMEJI																				
	Concentração (mg kg⁻¹)										Concentração (µg kg⁻¹)										
	²⁷ Al	¹³⁷ Ba	⁶⁵ Cu	⁵⁶ Fe	⁷ Li	⁵⁵ Mn	⁶⁰ Ni	⁸⁵ Rb	⁶⁶ Zn	⁷⁵ As	²⁰⁹ Bi	¹¹¹ Cd	⁵² Cr	⁶⁹ Ga	⁹⁵ Mo	²⁰⁸ Pb	¹²¹ Sb	⁸² Se	¹¹⁸ Sn	⁸⁸ Sr	⁵¹ V
1a	51	2,11	26	600	1,02	20	3,75	88	80	165	36	97	739	214	735	190	40	78	60	405	133
2a	115	2,00	18	744	1,25	15	4,15	100	66	164	40	120	740	193	850	150	35	160	111	415	113
3a	114	1,47	27	787	2,51	32	4,10	90	50	150	37	114	752	220	660	175	41	123	70	334	96
4a	50	2,01	14	930	1,05	29	4,09	75	65	180	38	90	781	187	775	164	35	40	120	408	150
Média	83	1,90	21	765	1,46	24	4,02	88	65	165	38	105	753	204	755	170	38	100	90	391	123
Máximo	115	2,11	27	930	2,51	32	4,15	100	80	180	40	120	781	220	850	190	41	160	120	415	150
Mínimo	50	1,47	14	600	1,02	15	3,75	75	50	150	36	90	739	187	660	150	35	40	60	334	96

TABELA 22 – Concentrações de micronutrientes e elementos-traço na massa seca, determinados por ICP-MS nas amostras do cogumelo **CARDONCELLO** coletadas trimestralmente no ano de 2010.

	CARDONCELLO																					
	Concentração (mg kg⁻¹)										Concentração (µg kg⁻¹)											
	²⁷ Al	¹³⁷ Ba	⁶⁵ Cu	⁵⁶ Fe	⁷ Li	⁵⁵ Mn	⁶⁰ Ni	⁸⁵ Rb	⁶⁶ Zn		⁷⁵ As	²⁰⁹ Bi	¹¹¹ Cd	⁵² Cr	⁶⁹ Ga	⁹⁵ Mo	²⁰⁸ Pb	¹²¹ Sb	⁸² Se	¹¹⁸ Sn	⁸⁸ Sr	⁵¹ V
1^a coleta	50	1,85	4,2	1197	1,42	31	3,59	101	102		30	35	110	24	144	2063	194	31	64	39	12,1	215
2^a coleta	217	2,04	11,2	1026	1,64	8	3,54	50	61		20	36	69	23	34	766	77	32	93	56	11,9	119
3^a coleta	30	1,72	16,4	1239	1,68	24	3,44	125	114		2	38	94	27	90	2751	128	30	108	51	14,4	199
4^a coleta	74	1,70	6,0	612	1,33	24	3,88	100	117		15	36	178	24	105	1388	337	30	117	37	12,0	293
Média	93	1,83	9,4	1019	1,52	22	3,61	94	98		17	36	113	25	93	1742	184	31	96	46	12,6	206
Máximo	217	2,04	16,4	1239	1,68	31	3,88	125	117		30	38	178	27	144	2751	337	32	117	56	14,4	293
Mínimo	30	1,70	4,2	612	1,33	8	3,44	50	61		2	35	69	23	34	766	77	30	64	37	11,9	119

Pela observação dos resultados apresentados, o Shimeji foi a espécie que apresentou as concentrações mais elevadas dos elementos Ba, Ni, As, Bi, Cr, Ca, Ga, Mo, Sb, Se, Sr, Sn, V e K. O Shiitake apresentou concentrações mais elevadas de Cd, Cr, Pb, Sn, Mn, Zn, Na e Mg e o Cardoncello concentrações mais elevadas de Li, V, Fe, Rb, Al e Ca.

Comparando-se os resultados mostrados nas Tabelas 19, 20, 21 e 22, observa-se que o Cardoncello apresentou variações significativas nas concentrações dos elementos Mo, Se, Fe, Mn, Zn e Al.

As amostras de Shiitake apresentaram resultados discordantes para Ga, Mo e Sn.

Quanto aos macro e micronutrientes, as concentrações que mais variaram entre as quatro coletas foram de Zn e Cu. Em relação ao Shimeji, só foram observadas variações nas concentrações de Se e Al.

As eventuais diferenças observadas entre as coletas trimestrais não ocasionaram diferenças significativas em relação ao perfil mineral de cada espécie, como será demonstrado a seguir. Entretanto, não foi intenção deste projeto avaliar qualquer influência da sazonalidade sobre os resultados obtidos e por isto procurou-se garantir que as condições do cultivo não fossem alteradas significativamente durante o período do estudo.

6.1.5 Comparação estatística entre as concentrações dos elementos estudados nas três espécies de cogumelos.

Para verificar se as espécies apresentavam o mesmo perfil mineral foi avaliado se as médias e as variâncias obtidas diferiam significativamente. Para esse fim, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) e o teste *t* não pareado (Equação 16) (GOMES, 2011).

A ANOVA foi aplicada considerando todos os valores de concentração obtidos nas quatro coletas para as três espécies do estudo e da mesma forma, aplicada somente para as duas espécies do mesmo gênero, *Pleurotus* (TABELA 23).

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad (16)$$

Como pode ser observado na TABELA 23, somente as concentrações de Al e o Pb apresentaram valores de F menores do que o crítico. No entanto, cabe a observação de que, como pode ser visualizado na TABELA 24, os dois elementos apresentaram concentrações bem discordantes entre as coletas, o que ocasionou um aumento da dispersão dos valores de concentração e conseqüentemente, na análise de variância, as concentrações de Al e Pb não apresentassem diferença estatística significativa entre as três espécies.

Na comparação dos resultados obtidos na análise das duas espécies do gênero *Pleurotus*, um maior número de elementos apresentou valores de F menores do que o crítico e poderiam ser considerados como pertencentes ao mesmo grupo, como o Ba, Cd, Li, Pb, Rb e Se, porém, se repete a mesma observação feita no parágrafo acima quanto à dispersão dos resultados de Al e Pb entre as coletas, com exceção do Ba.

TABELA 23 – Valores de F referentes à análise de variância para todos os elementos determinados nas três espécies do estudo e para as duas espécies do gênero *Pleurotus*, Shimeji e Cardoncello.

Elementos	Valores de F (três espécies)	Valores de F (duas espécies)	F crítico
Al	0,1830	0,1654	
As	123,5811	1071,6730	
Ba	18,0800	0,3422	
Bi	9,8969	3,7001	
Ca	10,5560	19,3421	
Cd	10,4756	0,3276	
Cr	440,7801	7037,7761	
Cu	28,5430	28,2697	
Fe	22,8774	9,1941	
Ga	14,2209	72,6047	
K	31,0388	23,4856	
Li	10,4684	0,4301	3,28492
Mg	24,6892	23,6588	
Mo	14,7343	19,1486	
Na	93,1820	38,2344	
Ni	310,6816	10,3644	
Pb	3,0910	0,2265	
Rb	23,4318	0,4527	
Sb	12,4812	21,2270	
Se	18,4878	0,0995	
Sn	5,1030	28,9802	
Sr	517,5480	1235,9769	
V	24,5668	17,7456	
Zn	10,3642	19,9348	

TABELA 24 – Concentrações de Al e Pb nas alíquotas provenientes das quatro coletas trimestrais das três espécies de cogumelos do estudo.

		ALUMÍNIO		
Coletas	Alíquotas	Shiitake	Shimeji	Cardoncello
1a	1	64,7	40,6	38,3
	2	75,6	78,5	55,7
	3	92,5	34,5	55,9
2a	1	86,7	105,4	225,6
	2	91,3	143,3	187,4
	3	91,3	96,3	238,0
3a	1	92,4	124,8	19,6
	2	95,2	131,6	29,8
	3	82,1	85,6	41,8
4a	1	65,4	89,6	94,0
	2	72,2	34,7	86,4
	3	67,1	25,7	42,8
		CHUMBO		
Coletas	Alíquotas	Shiitake	Shimeji	Cardoncello
1a	1	214,0	189,5	205,6
	2	194,0	201,2	200,1
	3	189,1	179,2	176,3
2a	1	164,8	148,5	85,2
	2	169,0	144,2	73,5
	3	176,3	157,3	72,5
3a	1	521,3	159,0	129,6
	2	476,4	174,2	122,6
	3	472,3	193,0	133,1
4a	1	191,4	164,5	339,0
	2	185,8	160,3	339,8
	3	209,1	167,2	332,2

6.2 AVALIAÇÃO NUTRICIONAL

A avaliação da importância nutricional dos cogumelos foi feita considerando-se as concentrações dos minerais que possuem valores de IDR estabelecidos pela Legislação nacional, conforme TABELA 2 do item 1.2.4.

Com base nos valores da Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005, todas as três espécies de cogumelos apresentaram concentrações de Fe, Mg, Mn, Mo e Zn que satisfazem a IDR recomendada (TABELA 25).

TABELA 25 – Comparação percentual entre os valores recomendados para ingestão diária de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Zn, K, Na, Cr, Mo e Se e os concentrações encontradas (em massa seca) desses elementos nos três tipos de cogumelos estudados.

	IDR - mg			Concentração mg em 100 g (massa seca)				% da maior IDR com a menor conc.	
	Adultos	Gestantes	Crianças 1-10 anos	Maior IDR	Shiitake	Shimeji	Cardoncello		Menor conc.
Ca	1000	1200	500-700	1200	4,7	4,8	5,8	4,7	0,4
Cu	0,9	1	3,4-4,4	4,4	0,6	2,1	0,9	0,6	13,6
Fe	14	27	6-9	27	52,4	76,5	102,0	52,4	194,1
Mg	260	220	60-100	260	426,0	231,0	348,0	231,0	88,8
Mn	2,3	2	1,2-1,5	2,3	4,1	2,4	2,2	2,2	95,7
Zn	7	11	4,1-5,6	11	11,2	6,5	9,8	6,5	59,1
K*				3500	1500,0	2458,0	1754,0	1500	42,9
Na*				2400	10,1	4,6	6,5	4,6	0,2

	IDR - µg			Concentração µg em 100 g (massa seca)				% da maior IDR com a menor conc.	
	Adultos	Gestantes	Crianças 1-10 anos	Maior IDR	Shiitake	Shimeji	Cardoncello		Menor conc.
Cr	35	30	11-15	35	63,5	75,3	2,5	2,5	7,1
Mo	45	50	11-22	50	96,0	75,5	174,2	75,5	151,0
Se	34	30	17-21	34	3,0	10,0	9,6	3,0	8,8

Fontes:

- 1- Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005 - ANVISA-MS.
- 2- 21 CFR (Code of Federal Regulation) parte 101.9. 1996. Food and Drugs Administration (FDA). * Valor de Referência diário.

Mesmo considerando que todas as concentrações estão expressas em massa seca e que a umidade média das espécies estudadas foi de aproximadamente 90%, os cogumelos *in natura* seriam classificados como fontes importantes para os elementos Fe e Mo.

Com relação à concentração de sódio, o Shimeji apresentou uma concentração média de sódio (4,6 mg por 100 g – massa seca,) abaixo de 5 mg por 100 g de produto alimentício, sendo classificado pela Portaria nº 27 como um alimento que não contém sódio. Os cogumelos Shiitake (10,1 mg por 100 g – massa seca) e Cardoncello (6,5 mg por 100 g – massa seca) apresentaram concentrações médias acima de 5 mg por 100 g e podem ser classificados como produtos alimentícios com baixo teor de sódio. Em contra-partida, as concentrações de

potássio encontradas nos três cogumelos foram elevadas ficando na faixa entre 1,4 a 3,25 mg por 100 g em massa seca, o que permite enquadrá-los como alimentos com alto teor de potássio.

Os valores encontrados de sódio e potássio corroboram a afirmação da introdução de que os cogumelos são alimentos recomendados para o controle da hipertensão, uma vez que a alta concentração de potássio está associada a uma pressão sanguínea mais baixa (KRUMMEL 1998 e Diretrizes Brasileiras 2006). De fato, a razão Na/K nos cogumelos estudados foi muito baixa: Shimeji – 0,001871 < Cardoncello – 0,0037058 < Shiitake – 0,0067333. Esses valores estão abaixo das razões citadas na introdução deste trabalho (1,11 a 1,92), que estariam associadas ao risco de morte por doenças cardiovasculares na população americana (YANG, 2011).

As concentrações médias de ferro encontradas de 413, 765 e 1019 mg kg⁻¹ para Shiitake, Shimeji e Cardoncello, respectivamente, foram mais elevadas do que aquelas encontradas em outros estudos: 13 e 33 mg kg⁻¹ para o Shiitake (DE PAULI 2010 e ÇAĞLARIRMAK 2007); 15, 54, 281 e 682 mg kg⁻¹ para o Shimeji (ÇAĞLARIRMAK 2007, MATTILA 2001, ISILDAK 2004 e GENÇCLEP 2009) e 31 e 355 mg kg⁻¹ para o Cardoncello (MOURA 2008 e GENÇCLEP et al., 2009) e podem estar associadas às características ambientais e alimentares do cultivo.

A concentração de Mo encontrada nos cogumelos estudados, 0,75 a 2,7 mg kg⁻¹, é comparável àquela encontrada nos alimentos de origem animal como é o caso dos fígado de porco, cordeiro e vaca que contêm, em média, 1,5 mg kg⁻¹ (COUGHLAN 1983). Cabe ressaltar a importância da ingestão de quantidades adequadas de Mo na prevenção do câncer de esôfago (PHILIP et al., 1994; MOHSEN et al., 2008) e como cofator de enzimas como a nitrogenase, nitrato redutase, sulfito oxidase e xantina oxiredutase (SCHWARZ, MENDEL e RIBBE, 2009).

As três espécies de cogumelos, Shiitake, Shimeji e Cardoncello, apresentaram concentrações médias de Se, 130, 100 e 96 µg kg⁻¹ em massa seca, respectivamente, semelhantes às concentrações encontradas em trabalho recente de COSTA-SILVA (2011) que determinou Se nos cogumelos Shiitake e Shimeji provenientes de Portugal.

As variações entre as concentrações dos elementos determinadas nesta pesquisa e àquelas encontradas por outros pesquisadores (DEMIRBAŞ, 2001;

MATILLA, 2001; MOURA, 2008; WANG, 2001; MANZI et al., 1999; GENÇCLEP et al., 2009; ISILDAK 2004), para as mesmas espécies de cogumelos, podem ser explicadas pelo tipo de substrato utilizado em cada cultivo ou pela composição do substrato onde o cogumelo foi coletado. (TABELA 26). Este fato foi comprovado por FIGUEIRÓ (2009) que trabalhou com seis substratos diferentes (palha de arroz, de feijão, de trigo, de sorgo, folha de bananeira e sabugo de milho) obtendo, por exemplo, valores para o conteúdo de Fe de 96 mg kg^{-1} em palha de arroz e de 476 mg kg^{-1} em folha de bananeira, para o conteúdo de Mn de $7,8 \text{ mg kg}^{-1}$ em sabugo de milho e de 835 mg kg^{-1} em folha de bananeira ou ainda para o Zn de $7,5 \text{ mg kg}^{-1}$ em folha de bananeira e $30,2 \text{ mg kg}^{-1}$ em palha de arroz.

TABELA 26 – Comparação dos valores de concentração encontrados no presente estudo e em outros trabalhos para o Shimeji com a utilização de substratos diferentes.

Elementos	Presente estudo ¹	WANG ²	MOURA ³	DEMIRBAŞ ⁴	MATILLA ⁵
Ca	55	-----	-----	106	10
Cu	21	25	-----	86	8,4
Fe	765	71	61	133	54
K	24585	21714	23012	51000	37300
Mg	2410	1819	-----	1280	2000
Mn	24	16	-----	248	11
Na	50	219	45	6,3	130
Zn	65	137	89	0,22	83

Substratos:

1 – 80% de resíduo de tora de eucalipto (serragem) + 10% de farelo de arroz + 5% de farelo de trigo

2 – 50 % bagaço de malte + 50% farelo de trigo

3 – 90% serragem + 10% farelo de arroz

4 – Solo Turquia

5 – Solo Finlândia

Não foram encontrados dados na literatura sobre alguns elementos determinados neste estudo, como é o caso do Al, Ba, Bi, Li, Ni, Sb e Sr para o Shiitake e para o Cardoncello e do Mo, Sn e V para todos os três.

Com relação aos elementos tóxicos, os cogumelos analisados apresentaram concentrações abaixo dos limites máximos recomendados pela legislação brasileira (TABELA 27), no entanto, a concentração de alumínio encontrada (em massa seca) fica próxima ao limite de ingestão semanal preconizado pelo JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives).

TABELA 27 – Limites máximos e ingestão semanal tolerável provisória de elementos inorgânicos versus concentração encontrada nas espécies de cogumelos estudadas (em peso seco).

Elemento	¹ Limite máximo de tolerância (mg kg ⁻¹)	² Ingestão semanal tolerável provisória (mg kg ⁻¹ corpóreo (x 70 kg*))	Concentração nos cogumelos (mg kg ⁻¹)		
			Shiitake	Shimeji	Cardoncello
Al	-----	1 (70)	82	83	93
Sb	2	-----	0,033	0,038	0,031
As	1	0,015 (1,05)	0,136	0,165	0,017
Cd	1	0,025 (1,75)	0,175	0,105	0,113
Pb	0,8 (vegetais 0,5)	< 0,0003 (0,021)	0,264	0,170	0,184
Cu	30	0,5 (35)	6,0	21	9,1
Cr	0,1	-----	0,635	0,753	0,025
Sn	250	14 (980)	0,007	0,009	0,005
Fe	-----	0,8 (56)	524	765	1019
Ni	5	-----	1,49	4,02	3,61
Se	0,3	-----	0,003	0,100	0,096
Zn	50	1 (70)	112	65	99

Fontes:

1-Decreto 55871 de 26 de março de 1965.

2- JECFA Reports.* Estimativa do peso corpóreo de um homem adulto.

6.3 MRC

Para o estabelecimento do procedimento de preparo dos dois cogumelos, a fim de serem caracterizados como MRC, foram efetuados os estudos de homogeneidade e estabilidade descritos em 4.2 e detalhados a seguir.

6.3.1 Estudo da homogeneidade

A avaliação da homogeneidade dos itens de ensaio (sachês), em relação a todos os elementos determinados, concluiu que os mesmos poderiam ser considerados como “suficientemente homogêneos”. No entanto, devido às variâncias das concentrações encontradas de alguns elementos nos próprios sachês terem sido relativamente elevadas, somente 16 dos 25 elementos analisados foram selecionados para fazerem parte do estudo colaborativo (As, Na, Mg, Ca, K, Pb, Rb, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni, Cd, Sn, V e Zn).

Como exemplo do descrito anteriormente, na TABELA 28 podem ser visualizados os dados referentes às determinações de Al e Bi, dois elementos com

variâncias bastante distintas: Al – 15324,09 e Bi – 0,00322. A diferença significativa entre as variâncias na determinação do Al é notadamente observada pelas concentrações determinadas em cada sub-amostras.

Nas TABELAS 29 e 30 encontram-se todos os valores de desvio padrão amostral, S_s , e desvio padrão alvo, \hat{S}_H , assim como a definição relativa à homogeneidade ou não, de acordo com cada elemento analisado nas duas amostras de cogumelo candidatas a MRC.

TABELA 28 – Resultados e dados estatísticos das determinações de Al e Bi para os sachês contendo o Shiitake em pó.

ALUMÍNIO (mg kg⁻¹)			BISMUTO (mg kg⁻¹)		
Nº Sachê	Sub-amostra 1	Sub-amostra 2	Nº Sachê	Sub-amostra 1	Sub-amostra 2
2	27,0106659	440,7191546	2	0,034419	0,038795
5	101,4572764	68,78752935	5	0,003192	0,030531
6	63,19241774	56,48160119	6	0,003421	0,035535
8	53,3012662	94,40992129	8	0,003515	0,034924
9	206,9727227	29,62372635	9	0,002957	0,034076
13	244,687114	657,8580000	13	0,003432	0,036550
14	43,65518766	344,7869866	14	0,003474	0,035982
22	101,7547865	58,05135726	22	0,003454	0,038108
23	50,81340734	89,35210378	23	0,003301	0,034055
31	70,87351485	47,10916708	31	0,003336	0,034253
	Média	188,7180		Média	0,035281
	Desvio-padrão (variância)	123,7905 (15324,09)		Desvio-padrão (variância)	0,001795 (0,00322)
	Desvio-alvo	10,8096		Desvio-alvo	0,007146

NOTA: O desvio-padrão é referente às médias de cada sachê.

TABELA 29 – Resultados e dados estatísticos para os elementos inorgânicos determinados nos sachês contendo o SHIITAKE em pó.

Elemento (mg kg⁻¹)	Desvio-padrão (S_s)	Desvio-alvo (Ŝ_H)	Homogeneidade
Cu	18,7196	35,9854	Suficientemente homogêneo
Fe	0,5314	0,7312	Suficientemente homogêneo
K	161,7501	595,1967	Suficientemente homogêneo
Mn	2,1244	3,7313	Suficientemente homogêneo
Na	11,056	8,2236	Homogeneidade Insuficiente
Rb	0,9722	4,3099	Suficientemente homogêneo
Zn	3,3283	8,8385	Suficientemente homogêneo

Elemento (µg kg⁻¹)	Desvio-padrão (S_s)	Desvio-alvo (Ŝ_H)	Homogeneidade
Cd	4,8201	38,8718	Suficientemente homogêneo
Pb	10,3498	35,9855	Suficientemente homogêneo
Sn	5,3541	14,4313	Suficientemente homogêneo
As	35,379	26,7455	Homogeneidade Insuficiente
Ga	6,3020	21,4188	Suficientemente homogêneo
Mo	175,151	156,3554	Homogeneidade Insuficiente
V	1,9650	16,1838	Suficientemente homogêneo

Tabela 30 – Resultados e dados estatísticos para os elementos inorgânicos determinados nos sachês contendo o CARDONCELLO em pó.

Elemento (mg kg⁻¹)	Desvio-padrão (S_s)	Desvio-alvo (Ŝ_H)	Homogeneidade
Al	56,1329	8,0291	Suficientemente homogêneo
Cu	0,4102	0,9942	Suficientemente homogêneo
Fe	18,8604	58,4443	Suficientemente homogêneo
K	159,5281	181,4335	Suficientemente homogêneo
Mn	0,6849	2,2257	Suficientemente homogêneo
Na	15,5281	18,1335	Suficientemente homogêneo
Rb	2,5563	7,5946	Suficientemente homogêneo
Zn	2,8046	8,9524	Suficientemente homogêneo

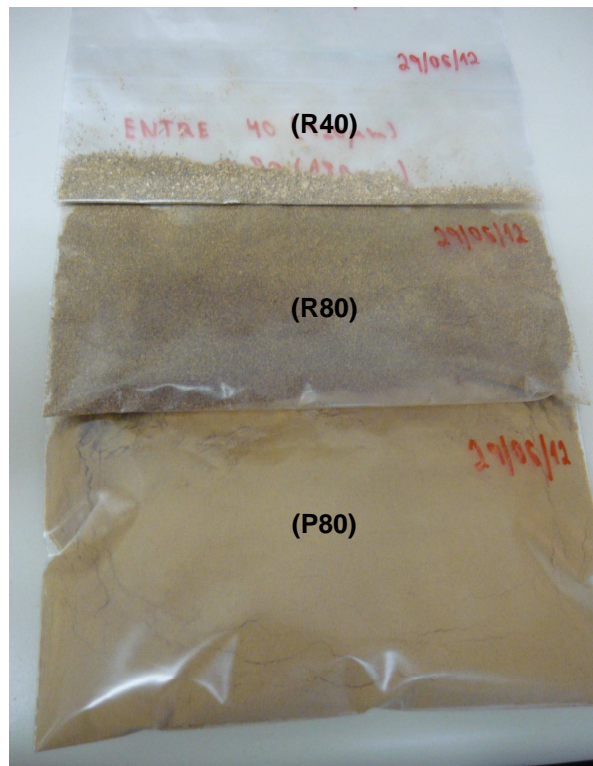
Elemento (µg kg⁻¹)	Desvio-padrão	Desvio-alvo	Homogeneidade
Bi	0,9066	8,0017	Suficientemente homogêneo
Cd	3,6420	24,2619	Suficientemente homogêneo
Pb	6,9300	37,3264	Suficientemente homogêneo
Sn	15,7433	18,2541	Suficientemente homogêneo
As	0,8154	3,6015	Suficientemente homogêneo
Ga	3,3526	20,7005	Suficientemente homogêneo
Mo	56,7605	256,1235	Suficientemente homogêneo
V	5,5039	41,4627	Suficientemente homogêneo

6.3.1.1 Avaliação da relação: granulometria x homogeneidade

A avaliação da homogeneidade efetuada entre os dez sachês, escolhidos aleatoriamente, e descrita no item 6.3.1, indicou uma diferença significativa entre as variâncias na determinação do AI entre as duas sub-amostras. Uma hipótese para essa diferença seria a falta de homogeneidade do pó e para avaliar essa questão efetuou-se o seguinte procedimento de tamisação, em três saches novos, contendo o cogumelo Shiitake em pó e também escolhidos de forma aleatória: Cogumelo em pó – tamisação em peneiras de 40 mesh (420 μm de poro) e em peneira de 80 mesh (180 μm).

Após a tamisação, foram obtidas três porções (FIGURA 18). A porção, **(R40)**, referente a porção de pó que ficou retida na peneira de 40 mesh (grânulos maiores que 420 μm), a porção do pó, **(R80)**, que ficou retido na peneira de 80 mesh (grânulos menores que 420 μm e maiores que 180 μm) e a terceira porção do pó, **(P80)**, que passou pelos poros da peneira de 80 mesh (grânulos menores do que 180 μm).

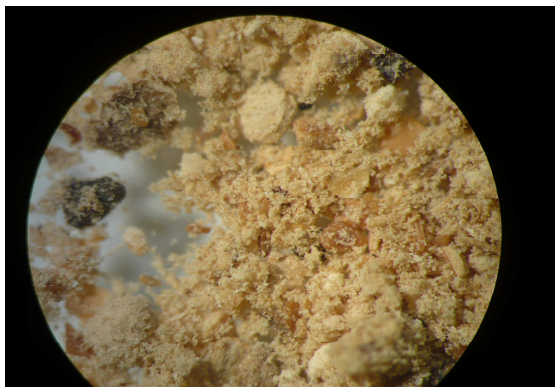
FIGURA 18 – Três porções do cogumelo em pó obtidas após a tamisação em peneiras de 40 e 80 mesh: (R40) - tamanho dos grânulos > 420 μm ; (R80) < 420 μm e >180 μm ; (P80) <180 μm .



O exame das três porções em Microscópio Estereoscópico (marca ZEISS, modelo STEMI SVG) demonstrou que a última porção, P80, apresentou maior homogeneidade entre os grânulos do pó (FIGURA 19). No entanto, após a determinação dos elementos nas três porções observou-se, através de ANOVA, fator único, que não houve diferença significativa entre as variâncias das concentrações nas três porções (TABELA 31), fato que indica não ser o procedimento de trituração, o responsável pela elevada variância das concentrações de alumínio.

Uma possível explicação tanto para a variação das concentrações entre as sub-amostras, como, para a maior concentração de alumínio encontrada nos sachês (Shiitake – 142 mg kg^{-1} e Cardoncello – 100 mg kg^{-1}), em comparação com a média das concentrações encontradas nos cogumelos *in natura* (Shiitake – 82 mg kg^{-1} e Cardoncello – 93 mg kg^{-1}), pode ser a contaminação do cogumelo em pó pelo alumínio do sachê. Contaminação que pode ter ocorrido no primeiro contato do pó com a parede interna do sachê e também de formas diferentes em porções distintas do pó, no entanto, para confirmar essa nova hipótese mais estudos devem ser efetuados no futuro.

FIGURA 19 – Visualização das três porções de pó através de Microscópio Estereoscópico.



Porção R40



Porção R80



Porção P80

TABELA 31 – Valores de F referentes à análise da variância das concentrações determinadas nas três porções de pó.

	F calculado	F crítico
Al	1,1199	
As	3,0799	
Ba	0,7617	
Ca	0,6072	
Cd	4,2832	
Cr	5,0810	
Cu	5,5287	
Fe	1,0739	
Li	2,1201	5,7861
Mg	0,9527	
Mn	2,6509	
Mo	1,0792	
Pb	2,2697	
Rb	0,6744	
V	5,2638	
Zn	1,7331	

6.3.2 Estudo da estabilidade

Para verificar a estabilidade dos itens de ensaio quanto a flutuações temporais, nas concentrações dos elementos determinados no projeto, utilizou-se o teste de resíduos da regressão linear, concentração x dias (ISO GUIA 35).

O estudo foi realizado a partir de abril de 2011 (dia 5 = dia zero) e obedeceu aos seguintes intervalos de tempo: 30; 60; 90; 180 e 240 dias.

Os resultados apresentados nas TABELAS 32 e 33 são relativos aos itens de ensaio irradiados e não-irradiados contendo o Shiitake, e indicam que todos os valores da inclinação das linhas de regressão estão entre os limites inferiores e superiores, denotando que a concentração de cada elemento não variou em função do tempo. Os mesmos resultados repetiram-se para o Cardoncello (TABELAS 34 e 35) e dessa forma, as duas amostras candidatas a MRC foram consideradas estáveis até o tempo estudado de 240 dias.

Como não houve diferença entre os itens de ensaio irradiados e não irradiados, optou-se por prosseguir com o Estudo Colaborativo somente com os irradiados.

TABELA 32 – Valores da inclinação (coeficiente angular) e intervalos superiores e inferiores relativos à inclinação das linhas de regressão para o teste de estabilidade nos itens de ensaio **irradiados** contendo o cogumelo Shiitake.

METAL	Inclinação da linha de regressão ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Intervalo Superior de confiança da inclinação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Intervalo Inferior de confiança da inclinação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
As	-0,00241	0,21753	-0,22235
Pb	-0,01025	0,41619	-0,43668
Cd	0,02846	0,27718	-0,22026
V	-0,00600	0,07359	-0,08559
Sn	-0,02261	0,68553	-0,73075
Cr	0,03099	0,63781	-0,57582

TABELA 33 – Valores da inclinação (coeficiente angular) e intervalos superiores e inferiores relativos à inclinação das linhas de regressão para o teste de estabilidade nos itens de ensaio **não-irradiados** contendo o cogumelo Shiitake.

METAL	Inclinação da linha de regressão ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Intervalo Superior de confiança da inclinação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Intervalo Inferior de confiança da inclinação ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
As	-0,01366	0,072346	-0,09966
Pb	0,036424	0,389069	-0,31622
Cd	-0,03975	0,084528	-0,16402
V	-0,00853	0,101419	-0,11849
Sn	0,12509	0,650782	-0,4006
Cr	0,010747	0,695814	-0,67432

TABELA 34 – Valores da inclinação (coeficiente angular) e intervalos superiores e inferiores relativos à inclinação das linhas de regressão para o teste de estabilidade nos itens de ensaio **irradiados** contendo o cogumelo Cardoncello.

METAL	Inclinação da linha de regressão (mg kg⁻¹)	Intervalo Superior de confiança da inclinação (mg kg⁻¹)	Intervalo Inferior de confiança da inclinação (mg kg⁻¹)
Ni	0,00032	0,00094	-0,00030
Mn	-0,00067	0,09266	-0,09401
Rb	-0,00025	0,03028	-0,03078
Cu	0,00101	0,00505	-0,00303
K	1,03723	11,86151	-9,78705
Na	0,00721	0,03418	-0,01976
Ca	0,00032	0,00094	-0,00030
Mg	-0,00067	0,09266	-0,09401
Fe	-0,00025	0,03028	-0,03078
Zn	0,00101	0,00505	-0,00303

TABELA 35 – Valores de inclinação (coeficiente angular) e intervalos superiores e inferiores relativos à inclinação das linhas de regressão para o teste de estabilidade na determinação de micro e macronutrientes nos itens de ensaio **não-irradiados** contendo o cogumelo Cardoncello.

METAL	Inclinação da linha de regressão (mg kg⁻¹)	Intervalo Superior de confiança da inclinação (mg kg⁻¹)	Intervalo Inferior de confiança da inclinação (mg kg⁻¹)
Ni	-0,000049	0,000585	-0,000684
Mn	-0,018582	0,045739	-0,082902
Rb	0,002023	0,022512	-0,018466
Cu	0,001759	0,007060	-0,003542
K	1,170002	4,707817	-2,367812
Na	-0,001347	0,024483	-0,027177
Ca	-0,000049	0,000585	-0,000684
Mg	-0,018582	0,045739	-0,082902
Fe	0,002023	0,022512	-0,018466
Zn	0,001759	0,007060	-0,003542

6.3.3 Estudo colaborativo (EC)

Com os estudos de homogeneidade e estabilidade satisfatórios, deu-se início ao EC com o convite e o envio de um item de ensaio, de cada amostra candidata a MRC de Shiitake e Cardoncello, aos laboratórios que aceitaram participar do estudo.

Foi elaborado um protocolo do EC (ANEXO A) que foi enviado juntamente com os dois sachês, os quais continham, aproximadamente, 8 g de amostra em pó.

Um arquivo contendo uma planilha do programa Excel[®] (ANEXO B) foi enviado por correio eletrônico aos laboratórios e nesse arquivo, após a devolução, foram registrados os resultados das determinações dos dezesseis elementos selecionados para o EC: As, Na, Mg, Ca, K, Pb, Rb, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni, Cd, Sn, V e Zn.

O cronograma do EC é mostrado na TABELA 36.

TABELA 36 – Cronograma do EC

ATIVIDADE	DATA FINAL
Entrega do protocolo do estudo e dos sachês contendo o cogumelo.	24/05/2012
Prazo final para o envio dos Resultados à Coordenação do Programa.	24/07/2012
Envio do Relatório Preliminar aos Participantes.	24/08/2012
Prazo final para o envio de considerações dos Laboratórios Participantes à Organização do EC sobre o Relatório Preliminar.	06/09/2012
Disponibilização do Relatório Final aos participantes por correio eletrônico e envio da Declaração de Participação no EC.	13/09/2012

Dez laboratórios considerados de excelência na quantificação de elementos inorgânicos foram convidados a participar do Estudo Colaborativo, mas somente nove laboratórios retornaram seus resultados (TABELAS 37 e 39). Os elementos Cr, Ni, Pb, Rb, Sn e V não foram considerados nos cálculos, devido ao baixo número de laboratórios que realizaram estas análises.

Após a retirada dos valores aberrantes indicados pelo teste de Grubbs (TABELAS 38 e 40), partiu-se para o cálculo do z-score, índice que avalia o desempenho dos laboratórios, e representa uma medida da distância relativa do resultado obtido pelo laboratório em relação ao valor designado como referência.

O índice z é definido na equação 13:

$$z_{ij} = \frac{y_{ij} - \hat{Y}}{\hat{s}}$$

(13)

Onde:

- \hat{Y} representa o valor de referência;
- y_{ij} o resultado do laboratório i para a substância j ;
- \hat{s} o desvio padrão.

TABELA 37 – CARDONCELLO. Resultados das determinações efetuadas pelos laboratórios participantes do Estudo Colaborativo (concentração em mg kg⁻¹).

Código do laboratório (#)	Ca	Cd	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Zn
2	101,53	0,134	8,60	13,82	36182,15	1233,48	11,44	135,08	110,31
	102,06	0,130	8,74	12,59	36338,64	1229,84	11,49	135,3	110,46
3	98	0,095	6,4	143	35865	1887	10,4	----	71
	103	0,091	5,9	148	36506	1917	9,3	----	73
6	72,8	----	8,4	144,8	32954	1509	9,4	107,4	72,2
	74,3	----	8,5	151,7	33213	1485	9,2	108,4	73,5
7	71,6	0,113	7	134	9427	1283	9,92	117	59,8
	----	----	----	----	----	----	----	----	----
8	83	0,066	9,3	145	12590	834	9,5	96	67
	----	----	----	----	----	----	----	----	----
10	225,2	----	9,9	----	27266,8	1749,5	12,5	----	52,2
	231,8	----	9,9	----	26846,9	1715,3	13,4	----	48,2
X	----	----	12,2	223,9	----	----	12,3	----	82
	----	----	12,4	222,5	----	----	11,9	----	81,5
Y	101	0,0956	8	108	32200	1540	9,3	105	67,2
	----	----	----	----	----	----	----	----	----
1	287	0,0995	----	261,8	28708	----	----	96,8	69,7
	----	----	----	----	----	----	----	----	----
INCQS	101,25	0,094	8,458	145,87	23005,9	1399,5	10,99	120,54	71,097
	89,71	0,0946	8,912	147,53	25667,1	1401,3	11,47	122,54	70,039

TABELA 38 – CARDONCELLO. Verificação de valores aberrantes através do teste de Grubbs.

		Ca	Cd	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Zn
Valor de G _{calculado}	Valor máximo	2,093	1,662	2,039	1,649	0,986	1,452	1,726	1,683	2,272
	Valor mínimo	0,724	1,616	1,461	1,931	1,768	1,816	0,982	1,084	1,320
Valor de G _{crítico} n = 7	1,94									
Valor de G _{crítico} n = 8	2,03	2,11	1,94	1,94	2,11	2,11	2,11	2,03	1,94	2,18
Valor de G _{crítico} n = 9	2,11									
Valor de G _{crítico} n = 10	2,18									
	Presença de valor aberrante	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Sim

NOTA: Valores de G ($\alpha=0,05$ - 95%) relativos ao número de laboratórios participantes em cada determinação.

TABELA 39 – SHIITAKE. Resultados das determinações efetuadas pelos laboratórios participantes do Estudo Colaborativo (concentração em mg kg⁻¹).

Código do laboratório (#)	Ca	Cd	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Zn
2	147,60	-----	7,8	85,6	23736,00	1460	15,9	73,8	98,50
	139,7	-----	8,2	92,1	25212,00	1412	16,40	75,7	99,8
3	163	0,25	9,4	104	34960	819	19,1	75	97
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
6	192,2	0,41	8,35	120,35	25220,19	1106,08	20,62	95,34	163,7
	193,88	0,42	8,54	120,68	25195,83	1115,47	20,7	95,36	165,63
7	212,4	-----	9,6	-----	18621,8	1589,2	20,7	-----	102,9
	214,3	-----	10	-----	17684,3	1619,2	21,3	-----	101,1
8	190	0,325	7	102	28376	1860	20	-----	98
	179	0,341	6,2	95	28185	1817	17	-----	101
10	138	0,33	6,9	79,9	6604	1222	17,3	77,6	82,1
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
X	-----	-----	13,0	123,7	-----	-----	19,7	-----	105,5
	-----	-----	13,8	120,9	-----	-----	19,7	-----	105,9
Y	176	0,338	7,8	67,4	23500	1420	17,5	71,2	91,3
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
1	364	323,6	-----	90,2	21837	-----	-----	71,9	101,5
	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
INCQS	163,7	0,33	7,72	89,57	18447,8	1577,4	18,54	72,89	100,75
	165,9	0,326	7,62	92,25	21303,4	1597,4	18,86	76,85	102,05

TABELA 40 – SHIITAKE. Verificação de valores aberrantes através do teste de Grubbs.

		Ca	Cd	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Zn
Valor de G _{calculado}	Valor máximo	2,017	1,753	2,284	1,482	1,603	1,430	1,425	2,191	2,714
	Valor mínimo	0,840	1,696	1,077	1,593	2,058	1,748	1,625	0,731	1,006
Valor de G _{crítico} n = 7	1,94									
Valor de G _{crítico} n = 8	2,03									
Valor de G _{crítico} n = 9	2,11	2,11	1,94	2,11	2,11	2,11	2,03	2,11	1,94	2,18
Valor de G _{crítico} n = 10	2,18									
	Presença de valor aberrante	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim

NOTA: Valores de G ($\alpha=0,05$ - 95%) relativos ao número de laboratórios participantes em cada determinação.

A interpretação do Índice z foi feita de acordo com os critérios expostos na TABELA 41. Após a retirada dos valores aberrantes, os valores obtidos indicam que os laboratórios apresentaram desempenho satisfatório na determinação de todos os elementos incluídos no EC para os dois cogumelos (TABELA 42).

TABELA 41 – Critérios para avaliação do desempenho baseado nos valor do z-score.

Valor de z	Avaliação do desempenho
$ z \leq 2$	Desempenho Satisfatório
$2 < z < 3$	Desempenho Questionável
$ z \geq 3$	Desempenho Insatisfatório

TABELA 42 – Valores de z-score para os elementos avaliados no EC nos dois itens de ensaio contendo os cogumelos Cardoncello e Shiitake.

Código do laboratório	CARDONCELLO								
	Ca	Cd	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Zn
1	2,09	0,01	-----	1,65	0,21	-----	-----	-1,03	0,20
2	-0,33	1,66	0,33	-0,93	0,99	-0,60	0,64	1,68	-----
3	-0,34	-0,30	-1,75	-0,03	0,98	1,45	-0,57	-----	0,46
6	-0,70	-----	0,15	0,01	0,66	0,21	0,98	-0,24	0,56
7	-0,72	0,67	-1,05	-0,19	-1,77	-0,44	-0,52	0,40	-0,92
8	-0,57	-1,62	0,85	-0,03	-1,44	-1,82	-0,83	-1,08	-0,10
10	1,33	-----	1,35	-----	0,04	0,93	1,74	-----	-1,00
X	-----	-----	-----	1,09	-----	-----	1,11	-----	1,57
Y	-0,34	-0,18	-0,22	-0,57	0,57	0,34	-0,98	-0,45	-0,08
INCQS	-0,41	-0,24	0,34	-0,01	-0,24	-0,08	0,38	0,72	0,30

Código do laboratório	SHIITAKE								
	Ca	Cd	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Zn
1	-----	-0,16	-----	-0,32	-0,09	-----	-----	-0,99	0,43
2	0,84	1,75	0,33	1,38	0,34	-0,84	1,21	-----	-----
3	0,50	0,04	-1,33	0,15	0,74	1,43	-0,15	-----	-0,05
6	-1,13	-----	-0,07	-0,39	0,25	0,18	-0,14	0,23	-0,13
7	-1,36	-0,02	-1,06	-0,89	-2,06	-0,49	-0,90	1,45	-----
8	-0,36	-1,69	1,19	0,46	1,60	-1,75	0,23	0,33	-0,64
10	1,64	-----	1,55	-----	-0,57	0,70	1,42	-----	0,54
X	-----	-----	-----	1,48	-----	-----	0,61	-----	1,42
Y	0,16	0,14	-0,25	-0,59	0,12	0,13	-0,78	-1,29	-1,98
INCQS	-0,29	-0,06	-0,37	-0,28	-0,34	0,65	-0,02	-----	0,40

Os resultados mostrados na TABELA 42 podem ser representados graficamente, como exemplificado para o Ca nos dois itens de ensaio (FIGURAS 20 e 21).

Os gráficos de z-score obtidos para os outros elementos encontram-se no ANEXO C.

FIGURA 20 – Representação gráfica dos valores de z-score para o Ca no Cardoncello.

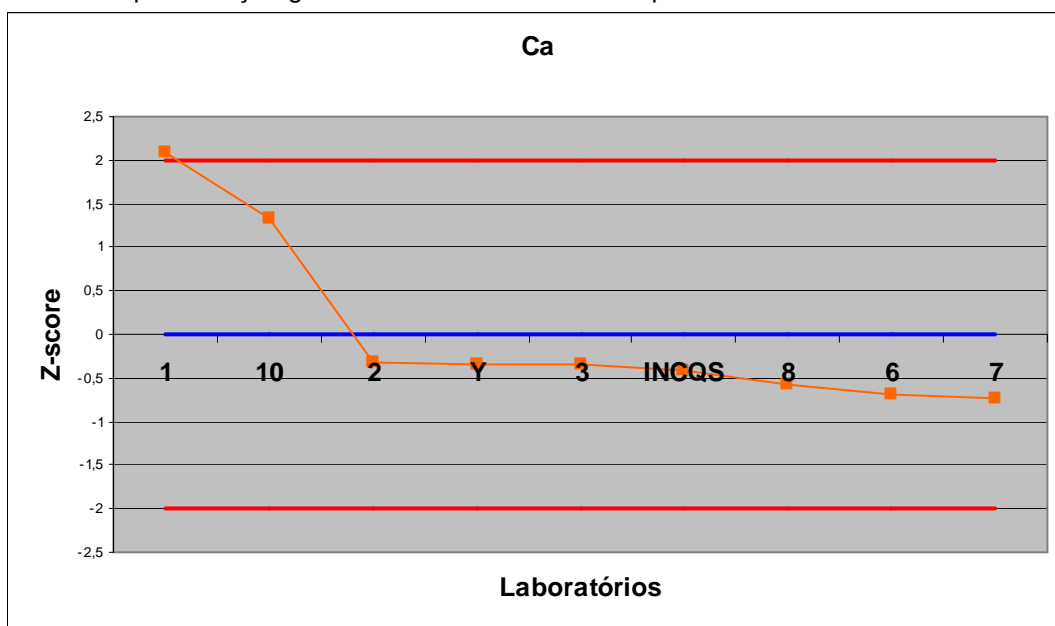
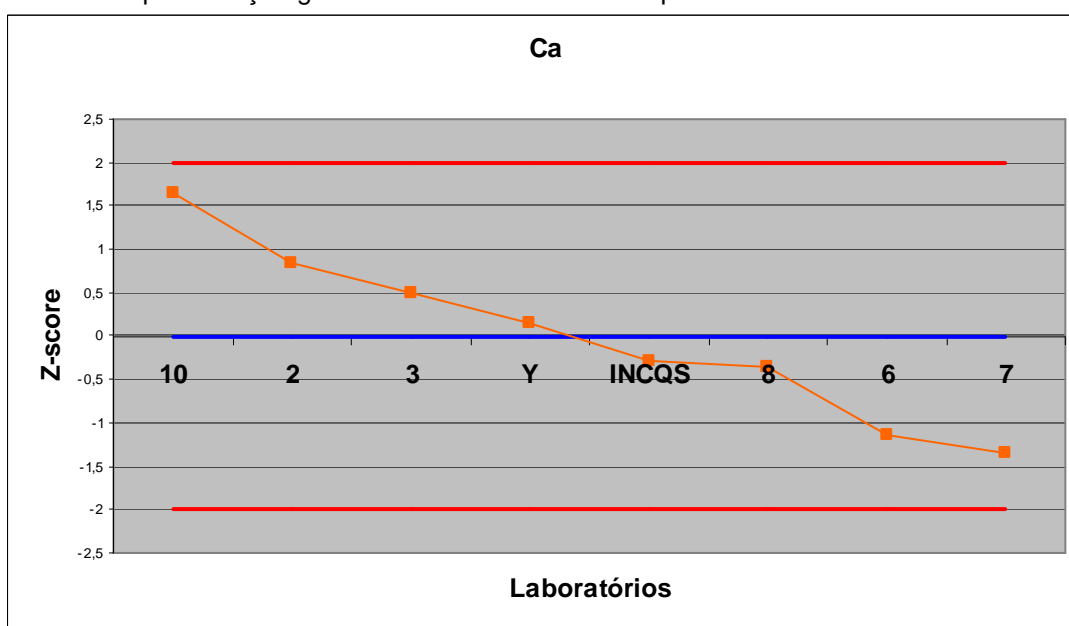


FIGURA 21 – Representação gráfica dos valores de z-score para o Ca no Shiitake.



Os valores de propriedade obtidos para os dois itens de ensaio, após o término do estudo colaborativo, estão apresentados na TABELA 43.

TABELA 43 – CARDONCELLO: Valores atribuídos às propriedades do material e suas incertezas

Elemento	<u>CARDONCELLO</u>		<u>SHIITAKE</u>	
	Resultado	Incerteza	Resultado	Incerteza
	Interlaboratorial (mg kg ⁻¹)	Padrão Combinada	Interlaboratorial (mg kg ⁻¹)	Padrão Combinada
Ca	127	25	193	23
Cd	0,099	0,008	0,331	0,018
Cu	8,7	0,6	8,8	0,7
Fe	147	23	95,8	6,0
K	26650	3248	22544	2581
Mg	1428	116	1380	113
Mn	10,6	0,4	18,7	0,5
Na	111	5	77	3
Zn	72	5	107	7

NOTA: O cálculo da estimativa da incerteza expandida utilizou o fator de abrangência, $k = 2$.

6.4 ESTUDOS DE BIOACUMULAÇÃO

6.4.1 Fatores de bioacumulação

Após a determinação dos elementos inorgânicos nos principais componentes do substrato, serragem e farelos, chegou-se aos fatores de bioacumulação (FB) apresentados na TABELA 44, lembrando que o FB é a razão entre a concentração de metal no cogumelo e a concentração no substrato. Os valores menores do que 1 denotam a bioexclusão do elemento, ou seja, o cogumelo apresenta uma menor concentração do que a encontrada no substrato, enquanto os valores maiores do que 1 representam a capacidade do cogumelo de absorver e reter o elemento, sendo, neste caso, a concentração no cogumelo maior do que a presente no composto.

De acordo com os resultados encontrados no primeiro experimento, verificou-se que os três cogumelos absorveram os elementos Ba, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Rb, V e

Zn, com fatores de bioacumulação variando entre 1,6 para o Ba no Shiitake e 24,5 para o Cu no Shimeji. O Cu, Zn e K foram os elementos que apresentaram os fatores mais altos em todos os cogumelos.

Os elementos bioexcluídos foram o Al, Ca, Mn e Sr e o sódio foi o único elemento que apresentou uma concentração equivalente ao do composto.

TABELA 44 – Concentrações de elementos inorgânicos nos componentes do composto, nos cogumelos estudados e fatores de bioacumulação e bioexclusão.

Composto	Concentração nos Farelos e na Serragem – mg kg⁻¹													
	Al	Ba	Ca	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Rb	Sr	V	Zn
Farelo de trigo	165	< 0,1	1044	0,42	2,3	112	10200	3550	127	310	106	< 0,003	0,046	33
Farelo de arroz	157	< 0,1	714	0,39	0,5	327	14504	5049	371	133	39	< 0,003	0,045	52
Serragem	198	1,1	266	0,040	0,65	200	4,2	85	24	0,45	0,84	4,0	0,04	3,1
	Concentração no Substrato pronto – mg kg⁻¹													
	Al	Ba	Ca	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Rb	Sr	V	Zn
Saco de 1.5 kg														
80% serragem 1.2 kg	158,4	0,8	213	0,032	0,52	160	3,36	68	19,2	0,36	0,67	3,2	0,032	2,48
20% mistura de farelos 0.3 kg														
0.18 kg Arroz	18,8	0,012	85,7	0,047	0,056	39,2	1740,5	605,9	44,5	16,0	4,7	0,0004	0,005	6,2
0.12 kg Trigo	19,7	0,012	125,3	0,050	0,279	13,5	1224,0	426,0	15,3	37,2	12,7	0,0004	0,006	3,9
TOTAL	197,0	0,82	424	0,13	0,86	213	2968	1100	79,0	53,5	18,1	3,2	0,043	12,6
	Concentração nos Cogumelos – mg kg⁻¹													
	Al	Ba	Ca	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Rb	Sr	V	Zn
Shiitake	82	1,35	47	0,64	6,0	524	15000	4560	41	101	48	0,31	0,091	112
Shimeji	83	1,90	55	0,75	20,5	765	24585	2410	24	50	88	0,39	0,116	65
Cardoncello	93	1,83	59	0,025	8,5	1019	17450	2483	22	65	94	0,013	0,058	99
	Fator de bioacumulação (Concentração no Cogumelo/Concentração no Composto)													
	Al	Ba	Ca	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Rb	Sr	V	Zn
Shiitake	0,416	1,638	0,111	4,954	7,013	2,464	5,054	4,146	0,519	1,887	2,652	0,097	2,120	8,870
Shimeji	0,421	2,306	0,130	5,805	24,547	3,597	8,284	2,191	0,304	0,934	4,862	0,122	2,703	5,148
Cardoncello	0,472	2,221	0,139	0,193	10,520	4,791	5,880	2,258	0,278	1,214	5,193	0,004	1,351	7,840

6.4.2 Adição de V, Cr, Cd e Pb ao substrato

A partir dos fatores de bioacumulação previamente determinados, partiu-se para a adição dos elementos específicos que seriam o foco do estudo, conforme descrito no item 1.3.1, ou seja, V, Cr, Cd e Pb.

O primeiro procedimento foi a adição dos elementos acima foi realizada na água do choque térmico, resultando, como descrito em 4.2.1, numa concentração final de 5 mg L⁻¹ para o Pb, Cd e Cr e 0,5 mg L⁻¹ para o V. Essas concentrações geraram um aumento em torno de 38x para o Cr e de 35x para o V em comparação com a concentração encontrada no composto.

Para verificar se esse aumento seria proporcional ao aumento da concentração dos elementos na água do choque térmico, o dobro e o quádruplo da concentração foi adicionado, 10 e 20 mg L⁻¹ para o Pb, Cd e Cr e 1 e 2 mg L⁻¹ para o V. No entanto, só foi possível avaliar o efeito da duplicação da concentração, e em relação ao V e ao Cr, pois, as concentrações maiores, de 20 mg L⁻¹ e 2 mg L⁻¹, respectivamente, resultaram em uma baixíssima produtividade, inclusive com efeitos morfológicos visíveis nos cogumelos, como a diminuição do diâmetro do chapéu.

O segundo procedimento foi a aplicação de solução na concentração de 1000 mg L⁻¹ de Cr (CrCl₃) e V (NaVO₃), diretamente no substrato já ensacado e em fase de colonização, resultando, caso houvesse uma total difusão da solução no substrato em uma concentração final de 8 mg kg⁻¹ para cada elemento.

Os resultados podem ser visualizados nas TABELAS 45, 46 e 47.

No primeiro procedimento, para o V, houve um aumento médio percentual considerável quando a adição foi de V⁵⁺, entre 155 e 252%, no entanto, para a adição de V⁴⁺ e de Cr³⁺, foi observado um aumento médio bem menor, 11 a 29% para o V⁴⁺ e de 13 a 20% para o Cr³⁺.

O chumbo, considerado como um metal bioexcluído, por algumas espécies de cogumelos já estudadas, *Agaricus bisporus* (RÁCZ et al. 1995), *Collybia peronata* e *Amanita rubescens* (TYLER 1982), exibiu o mesmo comportamento para o Shiitake, o Shimeji e o Cardoncello através dos resultados obtidos no presente trabalho, indicando uma tendência desse elemento ser bioexcluído nas espécies estudadas (TABELA 46). No entanto, mais estudos devem ser efetuados para que essa tendência seja confirmada.

O segundo procedimento foi severamente afetado, provavelmente, pela maior concentração dos elementos adicionados ao substrato, e prejudicou o desenvolvimento dos cogumelos; fato que também ocorreu com a duplicação das concentrações dos sais adicionados à água do choque térmico no primeiro procedimento. De todo modo, a determinação das concentrações de Cr e V foi efetuada nos poucos cogumelos que se desenvolveram (dois indivíduos – Shiitake e um indivíduo – Cardoncello) e foram registrados aumentos percentuais, em torno de 20% para o Cr³⁺ e de 100% para o V⁵⁺. Devido ao baixo número de espécimes analisados estes resultados devem ser considerados com as devidas restrições.

TABELA 45 – Aumento percentual da concentração de vanádio após adição dos sais de vanádio à água do choque térmico.

Média da concentração de V nos cogumelos ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Concentração após adição de V ⁴⁺ (VOSO ₄)		Aumento percentual	Concentração após adição de V ⁵⁺ (NaVO ₃)		Aumento percentual
	0,5 mg L ⁻¹	1 mg L ⁻¹		0,5 mg L ⁻¹	1 mg L ⁻¹	
SHIITAKE 91		97 – 101			303 – 287	
		132 – 141			217 – 205	
		124 – 119			441 – 400	
		Média	29 – 32		Média	252 – 223
SHIMEJI 123		151 – 150			247 – 235	
		140 – 147			297 – 247	
		117 – 108			402 – 415	
		Média	10,6 – 9,8		Média	156 – 143
CARDONCELLO 206		246 – 205			578 – 550	
		213 – 241			606 – 542	
		257 – 198			394 – 421	
		Média	15,9 – 4,2		Média	155 – 145

TABELA 46 – Aumento percentual da concentração de Cr e Pb após adição dos sais de cromo e chumbo à água do choque térmico.

Média da concentração de Cr nos cogumelos ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Concentração após adição de Cr^{3+} (CrCl_3)	Aumento percentual	Média da concentração de Pb nos cogumelos ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Concentração após adição de Pb^{4+} (PbCl_4)	Aumento percentual
	687	8,2		260	-1,5
SHIITAKE 635	745	17,3	SHIITAKE 264	258	-2,3
	757	19,2		275	4,2
	Média	14,9		Média	0,1
	889	18,1		175	2,9
SHIMEJI 753	924	22,7	SHIMEJI 170	180	5,9
	905	20,2		170	0,0
	Média	20,3		Média	2,9
	28	12,0		182	-1,1
CARDONCELLO 25	29	16,0	CARDONCELLO 184	181	-1,6
	28	12,0		185	0,5
	Média	13,3		Média	-0,7

TABELA 47 – Aumento percentual da concentração de Cr e V após a aplicação da solução de sais de cromo e vanádio no substrato.

Média da conc. de Cr nos cogumelos (mg kg^{-1})	Conc. após adição de Cr^{3+} (CrCl_3)	Aumento percentual	Média da conc. de V^{5+} nos cogumelos (mg kg^{-1})	Concentração após adição de V^{5+} (NaVO_3)	Aumento percentual
SHIMEJI 753	889		SHIMEJI 123	265	
	924			278	
	Média	20		Média	121
CARDONCELLO 25	32		CARDONCELLO 206	401	
	26			381	
	Média	16		Média	90

Com base nos resultados obtidos nesse trabalho e em outros estudos, ainda que em outras espécies, é possível fazer algumas comparações. Por exemplo, no estudo realizado por RÁCZ et al. (1998) no qual após a adição de Mn^{2+} (MnCl_2) ao composto, como forma de aumentar a produtividade, foi observada para o *Agaricus*

bisphorus uma concentração de 170 mg kg⁻¹ de Mn no substrato, enquanto a concentração no cogumelo ficou entre 3,5 e 5,5 mg kg⁻¹.

O cádmio, utilizado no estudo como elemento controle, gerou resultados semelhantes com outros estudos, tanto nos fatores de bioacumulação encontrados, quanto na diminuição da produtividade e modificações morfológicas, como o adensamento do micélio, fatos já descrito por HATVANI e MÉCS (2003) em estudo com o Shiitake. Inclusive, de acordo com esses autores, a concentração de 5,6 mg L⁻¹ de Cd deveria inibir completamente o crescimento do micélio, fato que não ocorreu mesmo estando a concentração na água do choque térmico em 5 mg L⁻¹.

Para o Pb, segundo BOSSO e ENZWEILER (2008), a composição mineralógica dos materiais contaminados controla a sua biodisponibilidade, porém, os elementos adicionados na água do choque térmico e diretamente no substrato, o foram na forma de sais solúveis Sulfato de vanadila e Metavanadato de sódio. Mesmo assim, efeitos matriciais sobre a bioacessibilidade destes elementos devem ser considerados.

É fato que a bioacessibilidade, ou seja, a fração solúvel de um determinado elemento disponível para absorção, na sua forma livre ou combinado a ligantes orgânicos, irá ser influenciada por diversos fatores já expostos: o conteúdo de matéria orgânica no substrato, o seu pH e a composição bioquímica de cada espécie (HUGHES, 1975; KALAČ e SVOBODA, 2000).

Dentre os resultados obtidos, além de terem sido medidos diversos fatores de bioacumulação, hipóteses relativas ao processo podem ser levantadas corroborando com fatos já comprovados por outros trabalhos. Por exemplo, HANSEN (2007) discorre sobre a presença, tanto de metalotioneínas em alguns cogumelos, quanto de fitoquelatinas na espécie *Boletus edulis*.

As fitoquelatinas e as metalotioneínas exibem uma importante similaridade que é o conteúdo de cisteína, um aminoácido que contém enxofre capaz de formar ligações estáveis com alguns elementos, como por exemplo, Cd.

Outros grupos funcionais presentes em moléculas que fazem parte da constituição dos cogumelos, como, carboxila, hidroxila, amino, ou proteínas também podem ser responsáveis pela absorção dos elementos estudados no projeto. BYRNE et al (1991) demonstraram que o As apresenta-se como dimetilarsênio na espécie *Laccaria amethystina* e JACKL et al. (1987) identificaram uma proteína contendo Cd na espécie *Agaricus arvensis*.

6.5 DISTRIBUIÇÃO DOS ELEMENTOS ENTRE DUAS ESTRUTURAS MORFOLÓGICAS – CHAPÉU E PÉ

Um último experimento foi realizado a fim de comparar a concentração dos elementos em duas diferentes estruturas morfológicas do cogumelo, o chapéu e o pé. De acordo com trabalhos já efetuados (BALDRIAN, 2003; DEMIRBAŞ, 2002), o que se esperava seria a confirmação de que a maior concentração de elementos estaria no chapéu, porém, como pode ser visualizado abaixo (TABELA 48), as concentrações de Al, Na, K e Zn nas duas estruturas indicam que esses elementos encontram-se igualmente distribuídos ao longo do corpo de frutificação.

TABELA 48 – Distribuição de elementos inorgânicos entre as estruturas morfológicas, chapéu e pé.

	Concentração nos Cogumelos - mg kg ⁻¹													
	Al	Ba	Ca	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Rb	Sr	V	Zn
Shiitake	82,3	1,35	47,1	0,64	6,5	524,0	15000	4560,2	41,3	101,1	48,4	0,31	0,091	112,1
Shimeji	83,4	1,90	55,4	0,75	21,0	765,0	24585	2410,1	24,0	50,3	88,2	0,39	0,116	65,3
Cardoncello	93,0	1,83	59,2	0,0	9,1	1019,0	17450	2483,4	22,1	65,4	94,1	0,013	0,058	99,4

	Concentração no CHAPÉU - mg kg ⁻¹													
	Al	Ba	Ca	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Rb	Sr	V	Zn
Shiitake	95,1	1,30	56,1	0,61	10,5	651,3	15520	4712,2	45,2	152,3	53,2	0,12	0,095	121,3
Shimeji	86,2	1,79	54,1	0,71	11,2	701,2	28412	2841,3	58,1	59,3	101,2	0,09	0,119	72,3
Cardoncello	91,1	1,71	55,4	0,029	13,2	1152,1	18651	2444,3	31,0	69,8	102,3	0,004	0,062	100,5

	Concentração no PÉ - mg kg ⁻¹													
	Al	Ba	Ca	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Rb	Sr	V	Zn
Shiitake	85,3	0,95	39,1	0,51	5,1	492,3	16003	3875,3	39,0	132,2	39,7	0,09	0,051	109,5
Shimeji	82,4	0,78	31,3	0,45	3,2	741,2	25651	2000,1	14,1	56,4	77,5	0,05	0,052	67,5
Cardoncello	87,3	0,99	41,4	0,018	3,3	951,2	18547	1857,3	18,0	70,6	56,2	0,002	0,028	101,2

7 CONCLUSÕES

7.1 Perfil mineral e avaliação nutricional

A comparação do perfil mineral entre as três espécies de cogumelos estudadas exibiu uma diferença estatística significativa para todos os elementos determinados, com exceção do Al e do Pb, no entanto, esses dois elementos apresentaram uma maior dispersão das concentrações entre as quatro coletas. Na comparação entre os dois cogumelos do gênero *Pleurotus* os elementos Ba, Cd, Li, Pb, Rb e Se, possuem concentrações semelhantes.

Na avaliação nutricional, todos os cogumelos estudados podem ser considerados alimentos com alto teor de Fe, Mg, Mn, Mo e Zn, se consumidos secos ou como fonte de Fe e Mo quando consumidos *in natura*. São excelentes alimentos para hipertensos pela baixa razão sódio/potássio, mas também pelo elevado teor de potássio que, junto com cálcio e magnésio exercem efeito anti-hipertensivo e têm uma ação protetora contra danos cardiovasculares.

Com relação aos elementos considerados contaminantes, as amostras dos cogumelos estudados não apresentam risco à saúde, com teores de Pb, Cd e As bem abaixo dos valores máximos permitidos pela legislação em vigor.

Especificamente sobre o Al, desde 1996 que a comissão do Codex Alimentarius, formada pela Organização Mundial de Saúde e a Organização de Alimentos e Agricultura das Nações Unidas, constatou que, apesar de existirem um número moderado de dados sobre a concentração de alumínio em alimentos, este metal não está inserido em nenhum programa de monitoramento regular (CODEX ALIMENTARIUS - 1996), fato que denota a importância da elaboração de um programa desse tipo.

7.2 MRC – Estudo colaborativo

O procedimento de homogeneização foi efetivo para a maioria dos elementos e os dois materiais continuam estáveis até a presente data, passados 420 dias.

Dezesseis elementos foram selecionados para fazerem parte do EC, porém, somente nove elementos foram determinados por um número de laboratórios suficientes, para serem avaliados estatisticamente. Todos os nove elementos tiveram seus valores de propriedades determinados.

Os laboratórios participantes apresentaram desempenho satisfatório na determinação dos nove elementos.

Os dois cogumelos, Shiitake e Cardoncello, demonstraram ser boas matrizes para a produção de material de referência certificado.

7.3 Estudos de bioacumulação

Em relação aos processos de bioacumulação e bioexclusão, o que se pode concluir após os primeiros estudos é que o fator determinante é a espécie e não somente a concentração no substrato, como apontam alguns trabalhos na literatura.

Nos experimentos em que foi adicionado à água do choque térmico soluções de Cr e V, em duas faixas de concentração, não houve aumento proporcional da concentração no cogumelo, corroborando a afirmação do parágrafo acima. Os dois cogumelos acumularam V^{5+} em concentrações bem mais elevadas do que o V^{3+} , suscitando estudos futuros que levem a elucidção desse problema.

O chumbo, como um metal bioexcluído por algumas espécies de cogumelos já estudadas, exibiu essa mesma tendência de comportamento para os cogumelos do estudo, Shiitake, o Shimeji e o Cardoncello, e não teve a concentração aumentada.

A fortificação com o cádmio obteve resultados semelhantes a outros estudos, tanto nos fatores de bioacumulação encontrados, quanto na diminuição da produtividade e modificações morfológicas, como, por exemplo, no adensamento do micélio para o Shiitake.

Com relação à localização dos metais nos cogumelos quando da avaliação da concentração entre as duas estruturas morfológicas, o chapéu e o pé, a maior concentração dos elementos inorgânicos foi encontrada no chapéu. No entanto, as concentrações de Al, K, Na e Zn apresentaram concentrações equivalentes nas duas estruturas morfológicas, evidenciando uma possível contaminação de todo o cogumelo por um metal não essencial, o Al, e a distribuição homogênea ao longo do cogumelo pela utilização biológica dos outros elementos.

8 REFERÊNCIAS

ABNT ISO GUIA 30:2000. **Termos e definições relacionadas com materiais de referência.**

AOAC. Peer-Verified Methods Program, Manual on policies and procedures, Arlington, Va., USA (1998).

<http://www.aoac.org/ISPAM/pdf/3.5%20SMMPR%20Guideline%20v12.1.pdf>. Acessado em 16 de novembro de 2012.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA) e SENAI (SERVIÇO NACIONAL DE APRENDIZAGEM INDUSTRIAL). Séries Temáticas – Laboratório. Série Habilitação. **Guia para Qualidade em Química Analítica – Uma Assistência à Habilitação.** Brasília, 2005.

AKYÜZ, M.; KIRBAĞ, S. **Element Contents of Pleurotus eryngii (DC. ex Fr.) Quel. var. eryngii Grown on Some Various Agrowastes.** Ekoloji, v.19(74), p.10-14, 2010.

ARUNACHALAM, J.; BLEISE, A.; MAHWAR, R.S.; RAMADEVI, P.; IYENGAR, G.V. **The natural matrix reference material database of the International Atomic Energy Agency: Reference materials in support of dietary investigations.** Journal of Food Analysis, v.19, p. 241-249, 2006.

BALDRIAN, P. **Interactions of heavy metals with white-rot fungi.** Enzyme and Microbial Technology, v.32, p.78–91, 2003.

BARGAGLI, R. e BALDI, F. **Mercury and methyl mercury in higher fungi and their relation with the substrata in a cinnabar mining área.** Chemos, v.13, p. 1059-1071, 1984.

BARROS, A.J.M. **Estudo da formação de complexos pelo processo de biossorção.** Tese de Doutorado. Universidade federal da Paraíba, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Departamento de Química, 2006.

BERRY, R.E. et al. **Investigations of Amavadin.** Journal of Inorganic Biochemistry, 80 (1–2), 17-20, 2000.

BERVOETS, L. et al. **Use of transplantes zebra mussels to assess bioavailability of microcontaminants in flemish surface Waters.** Environ. Sci. Technol. 39, 2005.

BRAGA, A.D.A. **Alimento Funcional: Uma Nova Abordagem Terapêutica das Dislipidemias como Prevenção da Doença Aterosclerótica.** <http://pt.scribd.com/doc/28856747/Alimento-Funcional-Uma-Nova-Abordagem-Terapeutica-Das-Dislipidemias>. Acessado em 15 de março de 2012.

BONONI, V.L.R. **O cultivo de *Agaricus bisporus* no Brasil.** Anais do 1º Simpósio Internacional sobre cogumelos, alimentação, saúde, tecnologia e meio ambiente no Brasil. Brasília, Embrapa; 2003: 24-31.

BYRNE, A.R. et al. **Studies of uptake and binding of tracemetals in fungi. Part II: Arsenic compounds in *Laccaria amethystine*.** Appl. Organomet. Chem, v. 5, p. 25-32, 1991.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria n º 27 de janeiro de 1998.** Declarações relacionadas ao conteúdo de nutrientes.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria n º 33 de 13 de janeiro de 1998.** Ingestão Diária Recomendada (IDR) de vitaminas, minerais e proteínas.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº21 de 26 de janeiro de 2001.**

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 269 de 22 de setembro de 2005**. Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Decreto nº 55871 de 26 de março de 1965**. Normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 272, de 22 de setembro de 2005 ementa não oficial: Aprova o **Regulamento Técnico para produtos de vegetais, produtos de frutas e cogumelos**.

BOSSO, S.T.; ENZWEILER, J. **Ensaio para determinar a (Bio)disponibilidade de chumbo em solos contaminados:revisão**. Química Nova, v. 31(3), p. 394-400, 2008.

BUSWELL, J.A.; CHANG, S.T. **Edible Mushrooms: attributes and applications**. In: **Genetics and Breeding of Edible Mushroom**. Amsterdam: Gordon & Breach Science Publishers, p. 297–306, 1993.

ÇAĞLARIRMAK, N. **The nutrients of exotic mushrooms (*Lentinula edodes* and *Pleurotus species*) and an estimated approach to the volatile compounds**. Food Chemistry. 2007; 105: 1188-1194.

CARVALHO, A.I., **O Sistema Único de Saúde e sua relação com o judiciário. Palestra proferida in Direito, Saúde e Meio Ambiente**. 27/10/2006. Fórum Permanente de Debates sobre o Direito Ambiental. Emerj/Fiocruz [comunicação oral].

CODEX ALIMENTARIUS **General Standard for Contaminants and Toxins in Foods - Revised annexes IV and V** twenty-eight Session, 18-22 march 1996, Manilla, The Philippines.

COSTA, E.A.; ROZENFELD,S. **Constituição da Vigilância Sanitária no Brasil In: Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro. Editora Fiocruz, 2000.

COSTA-SILVA et al. **Selenium contents of Portuguese commercial and wild edible mushrooms**. Food Chemistry, v. 126, p. 91-96, 2011.

COUGHLAN, M. P. **The role of molybdenum in human biology**. Journal of Inherited Metabolic Disease. 1983; 6: 70-77.

DDT – DRUG DISCOVERY TODAY. **Harssening chromium in the fight against diabetes**. v.8 (21), 2003. www.drugdiscoverytoday.com. Acessado em 16 de abril de 2012.

DEMIRBAŞ, A. **Concentrations of 21 elements in 18 species of mushrooms growing in the East Black Sea Region**. Food Chemistry. 2001; 75: 453-457.

DEMIRBAŞ, A. **Metal ion uptake by mushroom from natural and artificially enriched soils**. Food Chemistry. v.78, p.89-93, 2002.

DE PAULI, P.A. **Avaliação da composição química, compostos bioativos e atividade antioxidante em cogumelos comestíveis**. Dissertação de mestrado. Araraquara, São Paulo. 2010.

D'ILIO, S.; VIOLANTE, N.; MAJORANI, C.; PETRUCCI, F. **Dynamic reaction cell ICP-MS for determination of total As, Cr, Se and V in complex matrices: still a challenge? A review**. Anal. Chim. Acta. v. 698, p. 6-13, 2011.

Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. 5º encontro. São Paulo, 2006. http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/v_diretrizes_brasileira_hipertensao_arterial_2006.pdf. Acessado em 28/08/2012.

DOQ-CGCRE-016. Orientações para a seleção e uso de matérias de referência. Revisão 00 – Dezembro, 2005.

DURŞUN, N. et al. **Mineral contents of 34 species of edible mushrooms growing wild in Turkey.** Journal of Science of Food and Agriculture, v. 86, p. 1087-1094, 2006.

EMONS, H.; LINSINGER, T.P.J.; GAWLIK, B.M. **Reference materials: terminology and use. Can't one see the forest for the trees?** Trends in Analytical Chemistry, v.23, (6), p.442-449, 2004

FAEMG – Federação da Agricultura e Pecuária do Estado de Minas Gerais. **Cogumelos: Mercado e comercialização** – em:
<http://www.faemg.org.br/Content.aspx?Code=353&ParentCode=13&ParentPath=None;13&ContentVersion=C>. Acessado em 04 de dezembro de 2011.

FAEMG – Federação da Agricultura e Pecuária do Estado de Minas Gerais. **Cogumelos – Mercado crescente.** <http://www.faemg.org.br/News.asp?Code=6461&Parent=17>, 2005. Acessado em 02 de abril de 2012.

FAVERO, N.; COSTA, P.; MASSIMINO, M.L. **In vitro uptake of cadmium by basidiomycete Pleurotus ostreatus.** Biotechnol Lett, v.10, p.701–704, 1991.

FEARN, T. and THOMPSON, M. **A new test for 'sufficient homogeneity'.** Analyst, v.126, p. 1414-1417, 2001.

FIGUEIRÓ, G.G; GRACIOLLI, L.A. **Influência da Composição Química do Substrato no Cultivo de Pleurotus florida.** Ciências. Agrotécnicas, Lavras. 2011; 35 (5): 924-930.

FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION -FDA Title 21 CFR (Code of Federal Regulation) parte 101.9. 1996. **Daily Reference Value for a 2000 calories diet (adults and children four or more years of age).**

FRAÚSTO, J.J.R. **Vanadium in biology.** Ed. Fundação Calouste Gulbenkian. Portugal, 1991.
 FURLANI, R.P.Z.; GODOY, H.T. **Valor nutricional de cogumelos comestíveis. Ciência e Tecnologia de Alimentos.** Campinas, 27(1):154-57, 2007.

GARCÍA, M.A.; ALONSO, J.; MELGAR, M.J.. **Lead in edible mushrooms. Levels and bioaccumulation factors.** Journal of Hazardous Materials, v.167, p.777–783, 2009.

GENÇCLEP, H. et al. **Determination of mineral contents of wild-grow edible mushrooms.** Food Chemistry. 2009; 113: 1033-1036.

GOMES, M.V.T.; SATO, Y. **Avaliação da contaminação por metais pesados em peixes do Rio São Francisco à jusante da Represa de Três Marias, Minas Gerais, Brasil.** Saúde e Ambiente em Revista, v.6 (1), p. 24-30, 2011.

HATVANI, N.; MÉCS, I. **Effects of certain heavy metals on the growth, dye decolorization and enzyme activity of Lentinula edodes.** Ecotoxicology and Environmental Safety, 55, p. 199-203, 2003.

HERRERA, O.M. **Produção, economicidade e parâmetros energéticos do cogumelo Agaricus blazeiVm enfoque de cadeia produtiva 2001.**Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Agrônomicas da Unesp. São Paulo.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO/IEC 17025. **General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.** Genebra, first edition, 2001.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO GUIDE 35. **Reference materials – General and statistics principle for certification.** 2006.

ISILDAK, O. et al. **Analysis of heavy metals in some wild-grow edible mushrooms from the middle black sea region, Turkey.** Food Chemistry, v. 86, p. 547-552, 2004.

JACKL, G.A; REIDEL, G.; KOLLMER, W.E. **Identification of the cadmium binding compounds in *Agaricus arvensis* hyphae using ¹⁰⁹Cd**. Appl. Radiat. Isot., v. 38, p. 431-435, 1987.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Report TRS 683-JECFA 26/32 (**Zinco**), 1982.

_____. Report TRS 683-JECFA 26/31 (**Cobre**), 1982.

_____. Report TRS 696-JECFA 27/29 (**Ferro**), 1983.

_____. Report TRS 896-JECFA 53/81 (**Chumbo**), 1999.

_____. Report TRS 930-JECFA 64/26 (**Cádmio**), 2005.

_____. Report TRS 930-JECFA 64/40 (**Estanho**), 2005.

_____. Report TRS 940-JECFA 67/35 (**Alumínio**), 2006.

_____. Report TRS 959-JECFA 72 (**Arsênio**), 2010.

KALAČ, P. , SVOBODA, L. **A review of trace elements concentrations in edible mushrooms**. Food Chemistry, v.69, p.273-281, 2000.

KIRK, P.M. et al. **Dictionary of the fungi**. 10 ed. CAB International, Wallingford. 2008.

KRUMMEL D. **Nutrição na Hipertensão**. IN: Mahan L.K. Escott-Stump Alimentos, nutrição e dietoterapia. 9th rev. Ed. São Paulo: Roca, 1998: 569-582.

LAAKSOVIRTA, K.; ALAKUIJALA, P. **Lead, cadmium and zinc contents of fungi in the parks of Helsinki**. Ann. Bot. Fenn., v.15, p.253-257, 1978

LEE et al. Lee. **Dietary exposure of the Korean population to arsenic, cadmium, lead and mercury**. Journal of Food Composition and Analysis, v.19, p. 31-37, 2006.

LEWINSOHN, D. et al. **The Pleurotus eryngii species complex in Israel: distribution and morphological description of a new taxon**. Mycotaxon, v.81, p.51-67, 2002.

LI, C. OBERLIES, N.H. **The most widely recognized mushroom: Chemistry of the genus Amanita**. Life Sci. v.78, 2005.

LLOBET, J.M.; FALCÓ, G.; CASAS, C.; TEIXIDÓ, A.; DOMING, J.L. **Concentration of arsenic, cadmium mercury and lead in common food and estimated daily intake by children, adolescents, adults and seniors of Catalonia, Spain**. J. Agric. Food Chem. v.51, p. 830-842, 2003.

MANDEL, J. **The Statistical Analysis of Experimental Data**. Interscience Publ. J. Wiley & Sons New York, 1964.

MANZI, P. et al. **Nutrientes in edible mushrooms: an inter-species comparative study**. Food Chemistry. 1999; 65: 477-482.

MATTILA, P. et al. **Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms**. Journal of Agriculture Food and Chemistry. 2001; 49: 2343-2348.

MILLER, J.C.; MILLER, J.N. **Statistics for Analytical Chemistry**. Ellis Horwood Limited, England, 1989.

MOHSEN N. et al. **Nail Molybdenum and Zinc Contents in Populations with Low and Moderate Incidence of Esophageal Cancer**. Archives of Iranian Medicine. 2008; 11: 392.

MOURA P.L.C. **Determinação de elementos essenciais e tóxicos em cogumelos comestíveis por análise por ativação com nêutrons**. Dissertação de Mestrado. 2008. São Paulo

MOURA, A. **Perspectivas do IAL enquanto Laboratório de Saúde Pública. Prefácio In: Instituto Adolfo Lutz – 100 anos de Laboratório de Saúde**. São Paulo: Editora Letras & Letras, 1992.

NOVAES M.R.C.G. et al. **Avaliação da toxicidade aguda do cogumelo *Agaricus sylvaticus***. Com. Ciências Saúde. v.18 (3), p.227-236, 2007

OLIVARES, I. R. B. **Gestão de qualidade em laboratórios**. Campinas, SP: Editora Átomo, 2006.

OUZOUNI, P.K. et al. **Determination of metal content in wild edible mushroom species from regions of Greece**. Journal of Food Composition and Analysis, v. 20, p. 480-486, 2007.

PANICHEV, N et al. **Distribution of vanadium species between soil and plants in the vicinity of vanadium mine**. Journal of Harzadous Material, A137, p. 649-653, 2006.

PASCHOAL, V. **Alimentos para a saúde**. Revista Sadia Light. dez.São Paulo, 2001.

PHILIP, T. et al. **Prevention of Esophageal Cancer: The Nutrition Intervention Trials in Linxian, China**. Cancer Research. 1994; 54 (7 Suppl): 2029–2031.

PIVETTA, F. et al. **Perspectiva para a formulação de uma política nacional de segurança química no Brasil**. Série Fiocruz Eventos Científicos 4, p. 63 – 77, 2002.

PRANCE G.T. **Use of edible fungi by Amazonian Indians**. In: PRANCE, G.T.; KALLUNKI, J.A. (eds). Ethnobotany in the neotropics. Advances in Economic Botany 1: 127-139, 1984.

RÁCZ, L. et al. **Determination of essential and toxic metals in cultivated champignons by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry**. Microchemical Journal, v.59, p. 181-186, 1998.

RÁCZ, L.; PAPP, P; FODOS, P. **Migration analysis of elements from compost and casing material to the fruit bodies in cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus*)**. Acta alimentaria, v. 24, p. 161-166, 1995.

<http://www.rogersmushrooms.com/Recipes/default~GID~253.asp> Acessado em 04/01/2012.

RUEGGER, M.J.S. et al. **Cultivation of the edible mushroom *Oudemansiella canarii* (jungh.) höhn. in lignocellulosic substrates**. J. Microbiol. 32, 3: p.2. 2001.

SACKS F.M. et al. **Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) Sodium Collaborative Research Group**. N. Engl. J. Méd. 2001; 344:3-10.

SALGADO, J.M. **Alimentos inteligentes**. São Paulo: Prestígio, 2005.

SANGLIMSUWAN, S.; YOSHIDA, N.; MORINAGA, T.; MUROOKA, Y. **Resistance to and uptake of heavy metals in mushrooms**. *Journal of Fermentation and Bioengineering, Volume 75, Issue 2, 1993, Pages 112-114.*

SANTELLI, R.E. et al. **Multivariate technique for optimization of digestion procedure by focussed microwave system for determination of Mn, Zn and Fe in food samples using FAAS**. Talanta, v. 68, p. 1083-1088, 2006.

SCHWARZ, G.; MENDEL, R.R.; RIBBE, M.W. **Molybdenum cofactors, enzymes and pathways**. Nature. 2009; 460: 839-847.

SEBRAE. **Oportunidade de negócios**. http://www.sebrae-sc.com.br/novos_des_taquas/oportunidade/default.asp?materia=11442, 2006. Acessado em 02 de abril de 2012.

STAMETS, P.; CHILTON, J.S. **The Mushroom Cultivator: A Practical Guide to Growing Mushrooms at Home**. Ed. Sciences. New York. 1983

STURION, G.L. ; RANZANI, M.R.T.C. **Composição de minerais de cogumelos comestíveis cultivados no Brasil – *Pleurotus* spp e outras espécies desidratadas.** Archivos Latinoamericanos de Nutrición, v.50 (1), 2000.

THOMAS, R. **Practical Guide to ICP-MS: A Tutorial for Beginners.** CRC Press, 2nd edition, 2008.

TYLER, G. **Accumulation and exclusion of metals in *Collybia peronata* and *Amanita rubescens*.** Trans. Br. mycol. Soc., v.79(2), p.239-245, 1982.

TÜZEN, M. **Determination of heavy metals in soil, mushroom and plant samples by AAS.** Microchemical Journal, v.74, p.289-297, 2003.

URBEN, A.F.; SIQUEIRA, P. **Cogumelos e suas Delícias.** Brasília, D.F., EMBRAPA Informação Tecnológica, 2003.

URBEN A.F. **Produção de Cogumelos por Meio de Tecnologia Chinesa Modificada.** 2^a ed. Revista e Ampliada. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004.

VAN DER VEEN, A.; LINSINGER, T.P.J.; PAU- WELS, J. **Uncertainty calculations in the certification of reference materials. 2. Homogeneity study.** Accred. Qual. Assur. v.6, p.26-30, 2001.

VENELONOV, T.; SAHUQUILLO, A. **Optimizing the uses and the costs of reference materials in analytical laboratories.** Trends in Analytical Chemistry, v.25 (5), p.528-533, 2006.

WANG, D.; Sakoda A.; Suzuki,M. **Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain.** Bioresource Technology, v.78, p.293-300, 2001.

WIELAND, T. **Poisonous principles of mushrooms of the genus *Amanita*.** Science, v.159, 1968.

YAMAÇ, M. et al. **Heavy metals in some edible mushrooms from the Central Anatolia, Turkey.** Food Chemistry, v. 103, p. 263-267, 2007.

YANG et al. **Sodium and Potassium Intake and Mortality Among US Adults -Prospective Data From the Third National Health and Nutrition Examination Survey.** Arch Intern Med. 2011;171(13):1183-1191.

doi:10.1001/archinternmed.2011.257

<http://www.spiegel.de/wissenschaft/natur/0,1518,703531,00.html>. Acessado em 12 de março de 2012.

<http://pt.scribd.com/doc/41525306/tipos-de-cogumelos>. Acessado em 12 de março de 2012.

<http://www.funghieflora.com.br>. Acessado em 06 de março de 2012.

<http://www.rawstory.com/rs/2011/06/15/magic-mushrooms-positive-clinical-effects-lasting-over-a-year-say-researchers/>. Acessado em 12 de março de 2012.

IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. São Paulo: 2006. Disponível em: <http://www.sbn.com.Br> Acessado em 14 de setembro de 2011.

ANEXO A – Protocolo do Estudo Colaborativo (EC) para a determinação de elementos inorgânicos nos itens de ensaios preparados com a matriz alimentícia cogumelo.

Estudo Colaborativo

1 Estudo Colaborativo

Esse estudo faz parte do projeto de tese do doutorando Jaylei Monteiro Gonçalves (Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do INCQS) e tem a finalidade de certificar dois materiais de referência preparados com a matriz alimentícia cogumelo.

1.1 ORGANIZAÇÃO



Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS
Setor de Contaminantes Inorgânicos
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos – Rio de Janeiro – RJ – Brasil
CEP: 21040-900

RESPONSÁVEIS PELA ORGANIZAÇÃO

- Dra. Silvana Jacob
- Jaylei Monteiro Gonçalves

2 OBJETIVOS

- Determinação das concentrações de elementos inorgânicos (As, Na, Mg, Ca, K, Pb, Rb, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni, Cd, Sn, V e Zn) na matriz alimentícia cogumelo;
- Contribuir para a preparação de material de referência;
- Avaliar o desempenho de laboratórios para o ensaio proposto.

3 PARTICIPAÇÃO

Poderá participar deste ensaio de proficiência qualquer laboratório que quantifique algum dos elementos inorgânicos listados no item 2 (Objetivos).

Ao final deste Estudo Colaborativo serão fornecidas declarações de participação a todos os laboratórios que enviaram resultados.

4 ITEM DE ENSAIO

O cogumelo foi escolhido por ser uma matriz alimentícia de baixa complexidade, pela facilidade na obtenção e no preparo para análise e por ter um crescimento rápido.

Os itens de ensaio serão distribuídos aos participantes em sachês lacrados devidamente identificados com rótulo e contendo aproximadamente 8 g de amostra

em pó e com as seguintes informações: Código da amostra e tipo de cogumelo.

As concentrações dos elementos encontram-se nas seguintes faixas de concentração:

ELEMENTO	Concentração (mg kg ⁻¹)
Ca	50 - 200
Cu	5 - 15
Fe	50 - 200
K	15000 - 30000
Mg	1000 - 2000
Mn	5 - 20
Na	30 - 150
Ni	0,5 - 3
Rb	50 - 100
Zn	50 - 100
ELEMENTO	Concentração (µg kg ⁻¹)
As	50 - 100
Cd	50 - 300
Cr	100 - 1000
Pb	100 - 500
Sn	10 - 50
V	1 - 30

5 CRONOGRAMA

Entrega do protocolo do estudo e dos sachês contendo o cogumelo.	23/05/2012
Prazo final para o envio dos Resultados à Coordenação do Programa.	23/07/2012
Envio do Relatório Preliminar aos Participantes.	23/08/2012
Prazo final para o envio de considerações dos Laboratórios Participantes à Organização do EC sobre o Relatório Preliminar.	06/09/2012
Disponibilização do Relatório Final aos participantes por correio eletrônico e envio da Declaração de Participação no EC.	13/09/2012

6 REGISTRO DAS MEDIÇÕES E ENVIO DOS RESULTADOS

Os laboratórios deverão fazer os registros das medições em um arquivo Excel denominado "Resultados Cogumelos", o qual será enviado por correio eletrônico aos laboratórios participantes.

O arquivo, com a planilha preenchida, deverá ser enviado à coordenação do EC através do e-mail jaylei.goncalves@incqs.fiocruz.br até 23/07/2012.

7 VALOR DE REFERÊNCIA (VALOR DESIGNADO)

O valor designado será calculado através de estatística robusta segundo a Norma ISO 13528.

8 ANÁLISE DO DESEMPENHO DOS LABORATÓRIOS

Para os laboratórios que enviarem resultados quantitativos a análise do desempenho dos será baseada no Índice z, representando uma medida da distância relativa do laboratório em relação ao valor designado.

O Índice z é definido na equação abaixo.

$$z_{ij} = \frac{y_{ij} - \hat{Y}}{\hat{S}}$$

Onde:

- \hat{Y} representa o valor de referência;
- y_{ij} o resultado do laboratório i para a substância j ; e
- \hat{S} o desvio padrão.

O desvio padrão (\hat{S}) é uma estimativa, ou seja, uma medida de variabilidade que atende aos requisitos do estudo. No presente EC este será estabelecido a partir de uma das seguintes possibilidades:

- Modelo preditivo de Horwitz; ou Estatística robusta apresentada na Norma ISO 13528.

A interpretação do Índice z é apresentada a seguir:

$|z| \leq 2 \rightarrow$ Desempenho Satisfatório

$2 < |z| < 3 \rightarrow$ Desempenho Questionável

$|z| \geq 3 \rightarrow$ Desempenho Insatisfatório

9 TESTES DE HOMOGENEIDADE e ESTABILIDADE

A homogeneidade das amostras foi realizada utilizando como base a norma ISO 13528.

A avaliação da estabilidade vem sendo realizada através do estudo por medições isôcronicas e a estabilidade de transporte já foi efetuada à temperatura de 40°C com resultados satisfatórios.

10 RELATÓRIO

Os responsáveis pela organização do EC irão elaborar os relatórios preliminar e final.

Na data estipulada no cronograma, os laboratórios participantes receberão o relatório preliminar do ensaio e terão até 06/09/2012 para enviarem suas considerações (sugestões, dúvidas, etc.) aos organizadores deste ensaio por correio eletrônico, para o endereço: jaylei.goncalves@incqs.fiocruz.br. As considerações serão avaliadas pelos organizadores e, se consideradas pertinentes, serão incorporadas ao relatório final.

11 INFORMAÇÕES ADICIONAIS

Informações adicionais a respeito do estudo colaborativo podem ser obtidas através do endereço eletrônico: jaylei.goncalves@incqs.fiocruz.br ou do telefone 21 3865-5258.

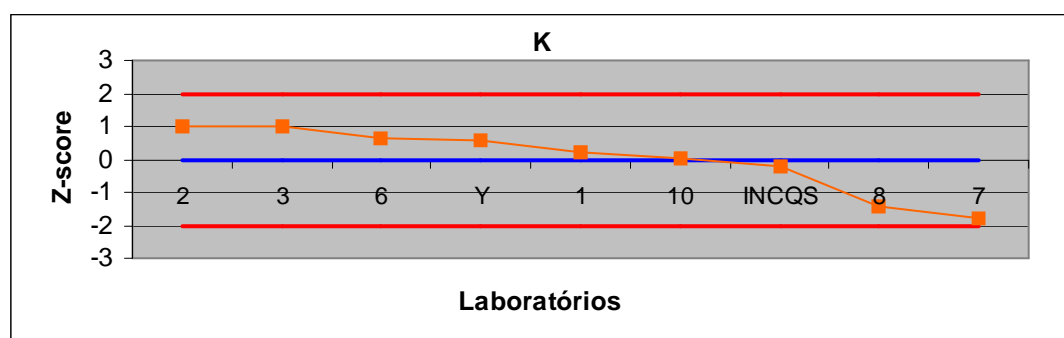
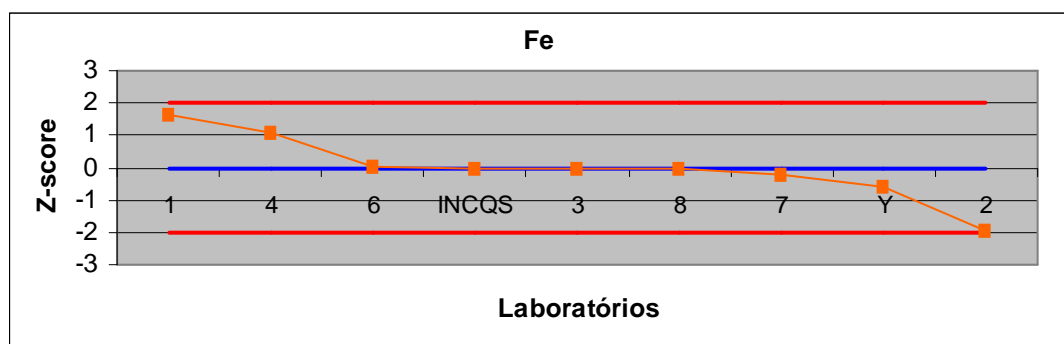
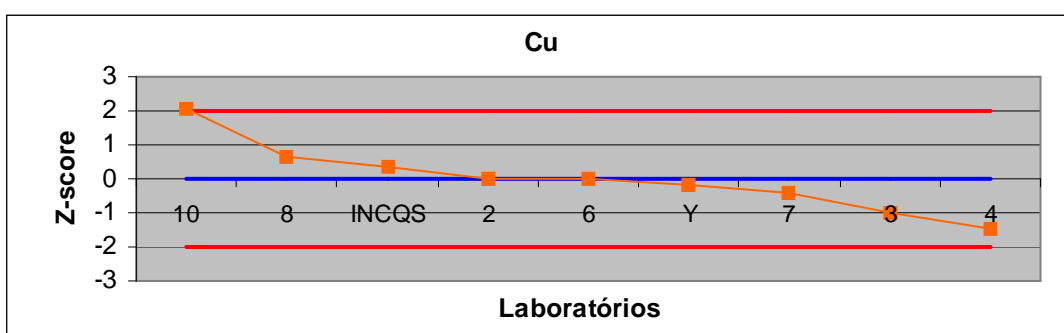
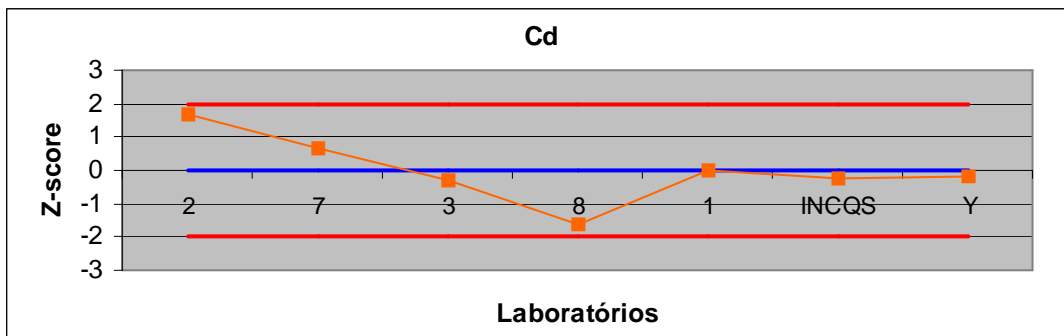
ANEXO B – Planilha para registro da metodologia analítica, dos resultados das duas determinações dos elementos quantificados pelos laboratórios participantes e demais informações pertinentes ao EC.

<i>Estudo Colaborativo para Determinação de Elementos Inorgânicos em Cogumelo</i>	
Código de Identificação do Laboratório: <input type="text"/>	Data da Análise: <input type="text"/>
Metodologia Analítica: (Informar quantidade e tratamento da amostra; técnica de detecção) <input type="text"/>	
Referência Bibliográfica: <input type="text"/>	
<i>Informações sobre o ensaio:</i>	
Metodologia Validada?	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Qual a diretriz?	<input type="text"/>
Metodologia usada na rotina ou esporadicamente?	Rotina <input type="checkbox"/> Esporadicamente <input type="checkbox"/>
São usadas amostras de controle de qualidade (CQ)?	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Quais (material de referência, amostra fortificada, etc...)?	<input type="text"/>
Participou anteriormente de outros ensaios de proficiência?	Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Quais?	<input type="text"/>

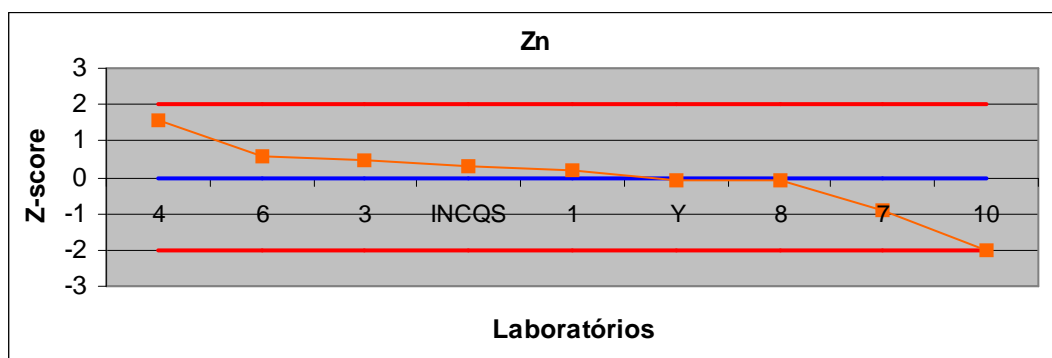
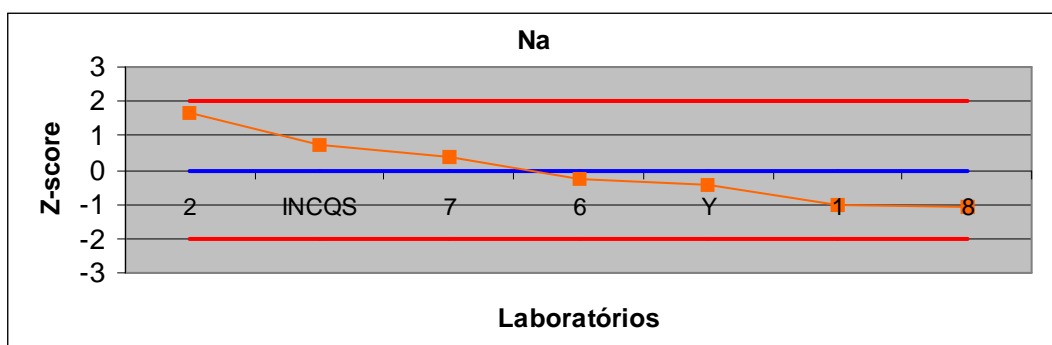
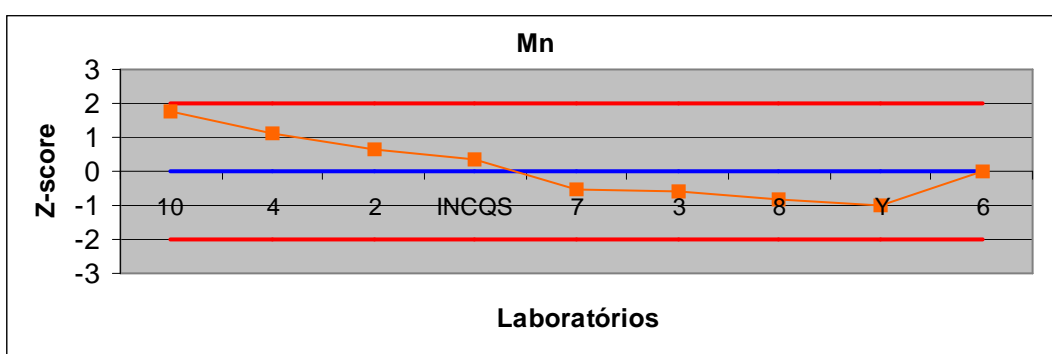
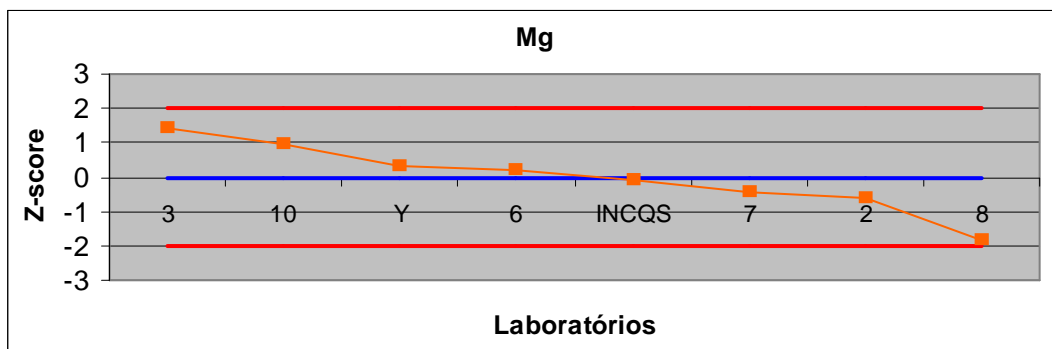
ANEXO B – Planilha para registro da metodologia analítica, dos resultados das duas determinações dos elementos quantificados pelos laboratórios participantes e demais informações pertinentes ao EC.

Quantificação dos Elementos Inorgânicos Presentes nas Amostras -											
COGUMELO 1	As		Ca		Cd		Cr		Cu		
Resultado (mg/kg)											
LOQ (mg/kg) ?											
LOQ (mg/kg) ?											
Repetitividade (%)?											
COGUMELO 1	Fe		K		Mg		Mn		Na		
Resultado (mg/kg)											
LOQ (mg/kg) ?											
LOQ (mg/kg) ?											
Repetitividade (%)?											
COGUMELO 1	Ni		Pb		Rb		Sn		V		
Resultado (mg/kg)											
LOQ (mg/kg) ?											
LOQ (mg/kg) ?											
Repetitividade (%)?											
COGUMELO 1	Zn										
Resultado (mg/kg)											
LOQ (mg/kg) ?											
LOQ (mg/kg) ?											
Repetitividade (%)?											
COGUMELO 1		Umidade (%)									
OBS: Os Resultados devem ser expressos com o valor corrigido para peso seco.											
Comentários adicionais											

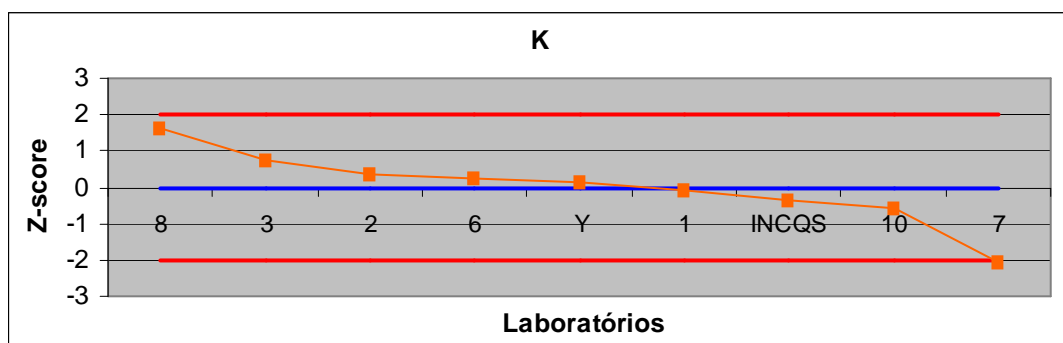
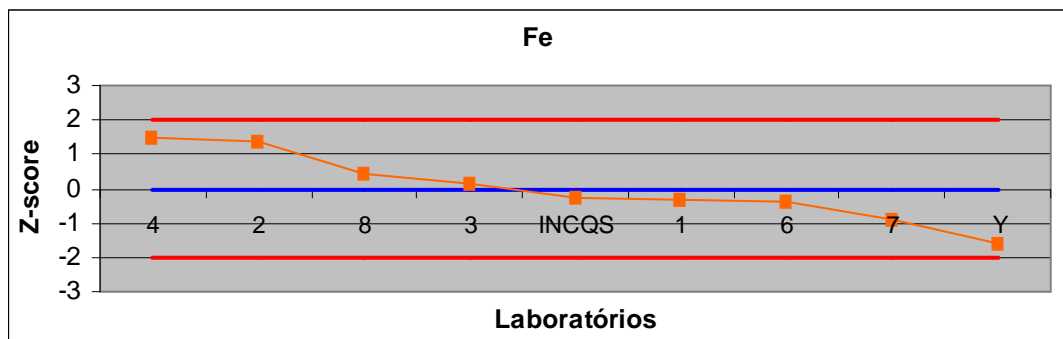
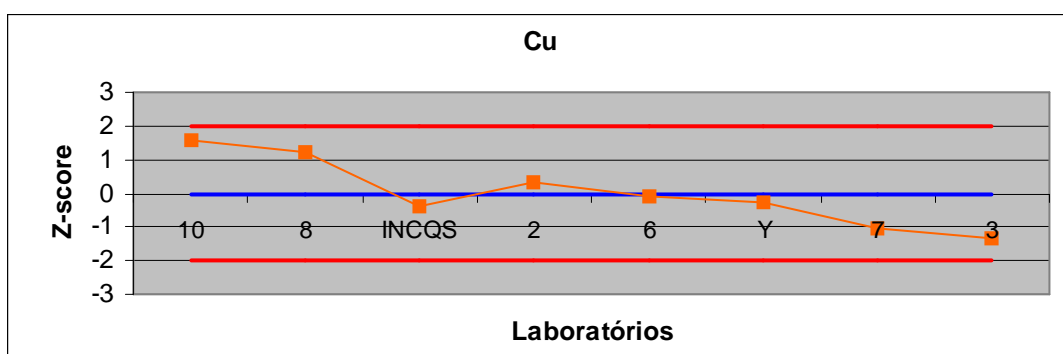
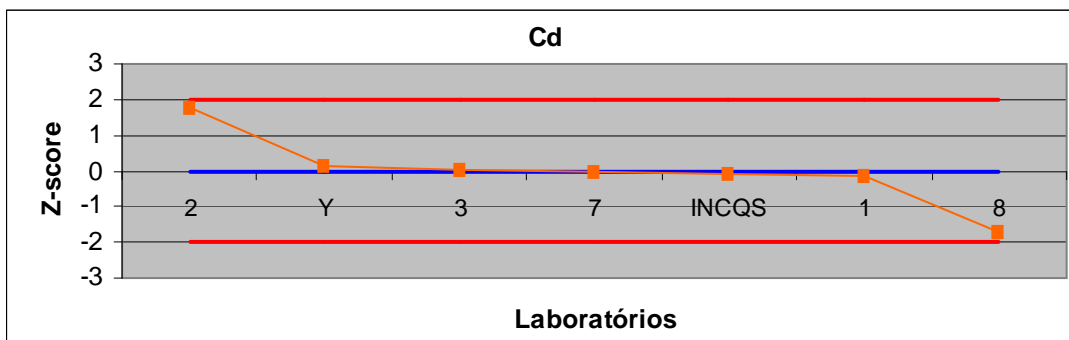
ANEXO C – Gráficos de z-score dos elementos avaliados no EC para o Cardoncello.



ANEXO C – Gráficos de z-score dos elementos avaliados no EC para o Cardoncello.



ANEXO D – Gráficos de z-score dos elementos avaliados no EC para o Shiitake.



ANEXO D – Gráficos de z-score dos elementos avaliados no EC para o Shiitake.

