



RACHEL BERTOLDO

***Aspergillus section Nigri* EM BULBOS DE CEBOLA -
OCORRÊNCIA, IDENTIFICAÇÃO E PRODUÇÃO DE
FUMONISINA B₂ E OCRATOXINA A**

CAMPINAS

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

RACHEL BERTOLDO

***Aspergillus section Nigri* EM BULBOS DE CEBOLA – OCORRÊNCIA,
IDENTIFICAÇÃO E PRODUÇÃO DE FUMONISINA B₂ E OCRATOXINA A.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestra em Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Anderson de Souza Sant'Ana

Co-orientadora: Dra. Beatriz Thie Iamanaka

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Rachel Bertoldo e orientada pela Prof. Dr. Anderson de Souza Sant'Ana.

A handwritten signature in blue ink, reading "Anderson de Souza Sant'Ana", is written over a horizontal line.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2015

iii

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Márcia Regina Garbelini Sevillano - CRB 8/3647

B462a Bertoldo, Rachel, 1986-
Aspergillus section *Nigri* em bulbos de cebola - ocorrência, identificação e produção de fumonisina B₂ e ocratoxina A / Rachel Bertoldo. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Anderson de Souza Sant'Ana.
Coorientador: Beatriz Thie Iamanaka.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Cebola. 2. *Aspergillus* section *Nigri*. 3. Fumonisina B₂. 4. Ocratoxina A. I. Sant'Ana, Anderson de Souza. II. Iamanaka, Beatriz Thie. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: *Aspergillus* section *Nigri* em bulbos de cebola - ocorrência, identificação e produção de fumonisina B₂ e ocratoxina A

Palavras-chave em inglês:

Onion

Aspergillus section *Nigri*

Fumonisin B₂

Ochratoxin A

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Anderson de Souza Sant'Ana [Orientador]

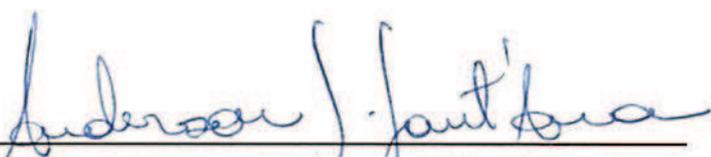
Hector Abel Palacios Cabrera

Marta Hiromi Taniwaki

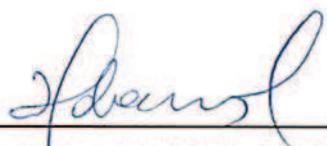
Data de defesa: 29-09-2015

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Anderson de Souza Sant'Ana (Orientador)
Universidade Estadual de Campinas



Dr. Hector Abel Palacios Cabrera
Instituto de Tecnologia de Alimentos - Titular



Dra. Marta Hiromi Taniwaki
Instituto de Tecnologia de Alimentos - Titular

Profa. Dra. Andrezza Maria Fernandes
Universidade de São Paulo - Suplente

Profa. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte
Universidade Estadual de Campinas - Suplente

Resumo

A cebola é atacada por várias doenças fúngicas no campo e pós-colheita, podendo persistir durante transporte, armazenamento e comercialização. No Brasil, as perdas anuais podem chegar a 50 %. Uma das doenças é a do mofo preto, relacionada com os *Aspergillus* negros. Estes são comumente encontrados em alimentos. Algumas espécies de *Aspergillus* section *Nigri* são capazes de produzir micotoxinas, tais como ocratoxina A (OTA) e fumonisina B₂ (FB₂). A OTA é considerada nefrotóxica, teratogênica e imunotóxica e a fumonisina pode causar edema pulmonar e hidrotórax em suínos, leucoencefalo-malácia em eqüinos e câncer de esôfago em humanos. Este trabalho teve como objetivo isolar e identificar espécies de *Aspergillus* section *Nigri* produtores de OTA e FB₂ em cebola e solo proveniente da plantação de cebolas. Foram analisadas 82 amostras: 40 de pós-colheita, 23 de campo e 19 de solo. Para o isolamento dos fungos foi realizado o plaqueamento direto de 50 pedaços da cebola e casca, em ágar Dicloran 18 % Glicerol (DG18), após desinfecção com hipoclorito de sódio 0,4 %. Para as amostras de solo foi realizada diluição e plaqueamento em superfície em meio DG18. O potencial de produção de OTA pelas espécies foi avaliado em meio Extrato de Levedura Sacarose (YESA), a extração da toxina pela técnica do Ágar Plug e detecção por Cromatografia de Camada Delgada (CCD). A avaliação da produção de FB₂ pelas espécies foi testada em meio ágar Czapek Extrato de levedura 20 % de sacarose (CY20S), retirando-se plugs e extraindo-se a toxina com metanol. A OTA nas amostras de bulbo de cebola foi extraída com metanol e a FB₂ extraída com metanol: acetonitrila: água, ambas foram submetidas à etapa de limpeza em coluna de imunoafinidade. A avaliação do potencial para a produção de FB₂ e a presença de FB₂ nas amostras de bulbos de cebola foram realizadas após derivatização com o-phthaldialdehydo (OPA). A detecção e quantificação de OTA e FB₂ nas amostras e a produção de FB₂ pelos isolados foram realizados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector de fluorescência. Nos bulbos de cebola a média de infecção por *Aspergillus* section *Nigri* foi de 42 %, variando de 0 % a 100 %, resultando em um

total de 1.337 isolados. Apenas 21 isolados (2 %) foram capazes de produzir OTA em meio de cultura. Foram testados 360 isolados para produção de FB₂, e 53 % (169) das cepas foram produtoras desta micotoxina. Os bulbos de cebola não apresentaram contaminação por OTA e FB₂, porém apresentaram elevada contaminação fúngica por *Aspergillus* section *Nigri*. Alguns dos isolados de *Aspergillus* section *Nigri* foram capazes de produzir OTA e FB₂ em meio de cultura.

Palavras chaves: Cebola, *Aspergillus* section *Nigri*, Fumonisina B₂, Ocratoxina A.

Abstract

Onions are attacked by various fungal diseases in the field and post-harvest, and may persist for transportation, storage and marketing. In Brazil, annual losses can reach 50%. One of the diseases is black mold, related to the black *Aspergillus*. These are commonly found in foods. Some species of *Aspergillus section Nigri* are able to produce mycotoxins such as ochratoxin A and fumonisin B₂. Ochratoxin A is considered nephrotoxic, teratogenic and immunotoxin and fumonisin may cause pulmonary edema and hydrothorax in swine, leucoencephalo-malacia in horses and esophageal cancer in humans. The aim of this study was to isolate and identify species of *Aspergillus section Nigri* producers of ochratoxin A and fumonisin B₂ in onion and soil from the onion plantation. Eighty-two samples were analyzed in total: 40 post-harvest, 23 from field and 19 from soil. For isolation of fungi, direct plating of 50 pieces of onion and peel were plated in agar Dichloran Glycerol 18 % (DG18), after disinfection with sodium hypochlorite 0,4 %. For soil samples, dilution and surface plating were conducted in DG18. The toxigenic potential to produce ochratoxin A species was tested in Sucrose Yeast Extract (YESA), extracting the toxin by the technique of Agar Plug and detection by Thin Layer Chromatography (TLC). The evaluation of fumonisin B₂ production species was tested on agar Czapek Yeast Extract 20 % sucrose (CY20S) withdrawing plugs and extracting the toxin with methanol. Ochratoxin A in onion bulb samples was extracted with methanol and the fumonisin B₂ extracted with methanol: acetonitrile: water, both were subjected to the cleaning step using an immunoaffinity column. The evaluation of toxigenic potential and the presence of the fumonisin B₂ in onion bulb samples were performed after derivatization of the sample with phthaldialdehyde o- (OPA). The detection and quantification of ochratoxin A and fumonisin B₂ in the samples and production of fumonisin FB₂ by the isolates, were performed by High Performance Liquid Chromatography with fluorescence detection. The average of *Aspergillus section Nigri* was 42 %, ranging from 0% to 100%, resulting in a total of 1.337 isolates. Only 21 isolates (2 %) was capable of producing ochratoxin A in culture medium. Three hundred and sixty isolates were

tested for fumonisin B₂ production and 53 % (169) of the strains were positive. The onion bulbs were not contaminated by OTA and FB₂, but showed high fungal contamination by *Aspergillus* section *Nigri*. Some of the isolates of *Aspergillus* section *Nigri* were able to produce OTA and FB₂ in culture medium.

Key words: Onion, *Aspergillus* section *Nigri*, Fumonisin B₂, Ochratoxin A.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Cebola.....	3
2.2 Gênero <i>Aspergillus</i>	7
2.2.1 <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	8
2.2.2 <i>Aspergillus niger</i>	10
2.3 Micotoxinas	12
2.3.1 Ocratoxina A	14
2.3.2 Fumonisina B ₂	16
2.4 Legislação.....	17
3. OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo Geral	20
3.2 Objetivos Específicos.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1 Amostras.....	21
4.2 Análise da atividade de água	24
4.3 Isolamento dos fungos e caracterização morfológica	24
4.3.1 Plaqueamento dos bulbos e cascas	24
4.3.2 Plaqueamento do solo	25
4.3.2 Caracterização dos fungos – Morfologia e Fisiologia.....	26
4.4 Avaliação do potencial de produção de ocratoxina A pelos <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> isolados	26
4.5 Análise de ocratoxina A na cebola	27
4.5.1 Preparo das amostras.....	27
4.5.2 Condições cromatográficas	28
4.5.3 Otimização da metodologia de quantificação de ocratoxina A.....	28

4.6 Avaliação do potencial de produção de fumonisina B ₂ pelos isolados de <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	29
4.6.1 Preparo das cepas	30
4.6.2 Condições cromatográficas	30
4.7 Análise de fumonisina B ₂ nas amostras de cebola	31
4.7.1 Preparo de amostras	31
4.7.2 Condições cromatográficas	32
4.7.3 Otimização da metodologia para fumonisina B ₂	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.2 Análise de atividade de água nos bulbos e casca de cebola	34
5.3 Avaliação da microbiota	36
5.3.1 Avaliação fúngica dos bulbos de cebola	36
5.3.2 Infecção fúngica das cascas de cebola	40
5.3.3 Contagem de bolores e leveduras nas amostras de solo	48
5.4 Caracterização morfológica dos <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	51
5.5 Avaliação do potencial de produção de ocratoxina A pelos <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> isolados	54
5.6 Otimização da análise de ocratoxina A na cebola.....	55
5.7 Análise de fumonisina B ₂ pelos isolados de <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	57
5.8 Otimização da metodologia de quantificação de fumonisina B ₂ em cebola .	61
6. CONCLUSÕES	63
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

Dedico este trabalho ao meus pais Jorge e Maria Inêz, pelo grande apoio e incentivo e ao meu noivo Alberto por sempre estar ao meu lado.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus por me dar força para superar todas as dificuldades.

Ao Prof. Dr. Anderson de Souza Sant'Ana, pela oportunidade e orientação.

À Dra. Beatriz Thie Iamanaka, pela oportunidade, orientação, competência, dedicação, paciência nos ensinamentos, pela confiança e amizade.

À Dra. Marta Hiromi Taniwaki, por me aceitar e confiar.

Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), pelo grande apoio para realização da minha pesquisa e aos pesquisadores, funcionários e colegas Margarete, Abel, Neliane, Neusely, Valéria, Adelaide, Luciara, Cirene, Ligia, Larissa, Cristina, Alexandre, Josi e em especial às queridas técnicas, Gabriela, Silvia, Fabiana e Heloisa pela grande ajuda diária e pela amizade.

Às minhas amigas Aline, Camila e Júlia pelo grande incentivo, companheirismo e por sempre estarem prestes para ajudar.

Ao LMQA - Unicamp e todos os colegas que me auxiliaram na realização deste trabalho.

À minha família, meus irmãos, sobrinhos, avós e em especial aos meus pais, pelo grande amor e me apoiar em todos os momentos.

Ao meu noivo Alberto, pelo carinho, paciência, pelo grande apoio, incentivo, motivação e por sempre me mostrar que tudo é possível quando se tem um objetivo.

À FAPESP, pelo incentivo financeiro para a realização da pesquisa.

Ao CNPq, através do Programa de bolsas, pelo apoio financeiro.

À todos vocês o meu sincero agradecimento!

Lista de Ilustrações

Figura 1. Estrutura da cebola.	3
Figura 2. <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> em bulbo de cebola.	7
Figura 3. Morfologia de <i>A. niger</i>	11
Figura 4. <i>A. niger</i> em CYA, após 7 dias a 25 °C.	12
Figura 5. Estrutura química da ocratoxina A.	14
Figura 6. Estrutura química das principais fumonisinas.	16
Figura 7. Amostras estocadas no centro varejista do Ceasa Campinas/SP.	22
Figura 8. Plantação e colheita de cebola no interior do estado de São Paulo.	22
Figura 9. Regiões de coleta de amostras de cebola e solo no interior do estado de São Paulo.	23
Figura 10. Plaqueamento do bulbo em meio DG18.	25
Figura 11. Plaqueamento em superfície das amostras do solo em meio DG18. ...	25
Figura 12. Infecção fúngica das amostras de cebola (bulbo e casca) e solo. Plaqueamento direto e diluição em DG18. A e B: Bulbo ; C: Casca e D: Solo.	37
Figura 13. Porcentagem de infecção fúngica no total de amostras analisadas. ...	37
Figura 14. Porcentagem média de infecção fúngica pelos isolados das amostras de bulbos de cebola provenientes da pós-colheita.	38
Figura 15. Porcentagem média de infecção fúngica pelos isolados de amostras de bulbos de cebola provenientes do campo.	39
Figura 17. Porcentagem média de infecção fúngica na casca de cebola provenientes da pós-colheita.	42
Figura 18. Porcentagem média de infecção fúngica da casca de cebola provenientes do campo.	45
Figura 19. Porcentagem média de infecção fúngica de casca da cebola de pós-colheita e campo.	46
Figura 20. <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> em CYA a 25 °C por 7 dias.	51

Figura 21. <i>Aspergillus section Nigri</i> em A: CYA a 25 °C; B: CYA a 37°C; C: MEA a 25 °C; D: CREA a 25°C.....	52
Figura 22. <i>A. section Nigri</i> (A: 400x e B: 1000x).....	53
Figura 23. Produção de ocratoxina A pelos isolados de <i>A. section Nigri</i>	54
Figura 24. Curva padrão de ocratoxina A.....	57
Figura 25. Curva padrão de fumonisina B ₂	58

Lista de Tabelas

Tabela 1. Valor nutricional da cebola.....	5
Tabela 2. Limites máximos tolerados de ocratoxina A e fumonisina B ₁ + B ₂ em diferentes alimentos (Fonte: ANVISA, 2011).....	18
Tabela 3. Origem e coloração das amostras.	23
Tabela 4. Atividade de água nas amostras de cebola (bulbo e casca).....	35
Tabela 5. Atividade de água nas amostras de cebola de diferentes colorações...	36
Tabela 6. Infecção fúngica total e pelos isolados de <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> nos bulbos e cascas de cebola com diferentes colorações.	44
Tabela 7. Infecção fúngica total e pelos isolados de <i>A.</i> section <i>Nigri</i> nos bulbos e cascas de cebola de diferentes nacionalidades.	47
Tabela 8. Contagem de bolores e leveduras nas amostras de solo.	49
Tabela 9. Valores de recuperação de OTA em bulbos de cebola.....	56
Tabela 10. Produção de FB ₂ pelas cepas de <i>A.</i> section <i>Nigri</i> isoladas dos bulbos de cebola da pós-colheita, campo ^(c) e solo ^(s)	59
Tabela 11. Valores de recuperação de fumonisina B ₂ em bulbos de cebola.	61

1. INTRODUÇÃO

O Brasil produz vários alimentos que são exportados para todo o mundo. A cebola é a terceira hortaliça mais produzida no Brasil, depois da batata e do tomate. O Brasil é considerado o 8º produtor mundial de cebola (MAPA, 2008/2009; LEITE, 2014). As cebolas são altamente valorizadas tanto pelo seu sabor, quanto pelo seu valor nutricional (FAO, 2003).

O gênero *Aspergillus* possui um grande impacto em diversas áreas e são encontrados em diversos tipos de ambientes (PITT; HOCKING, 2009; PITT; SAMSON, 2007). *Aspergillus* section *Nigri* representa um dos mais importantes grupos em micologia de alimentos (SAMSON *et al.*, 2007; RAPER; FENNEL, 1965; KLICH, 2002b). Os *Aspergillus* negros estão distribuídos em diferentes habitats e já foram isolados de vários alimentos, como uva, café, cacau, castanhas, pimenta em pó, milho, cebola, entre outros (NOOMIN *et al.*, 2008; PITT; HOCKING, 2009; SANTOS *et al.*, 2011).

Aspergillus niger é considerado um dos mais importantes micro-organismos utilizados em biotecnologia, pois possui o status GRAS (*Generally Regarded as Safe*), estabelecido pelo FDA (*US Food and Drugs Administration*), sendo utilizado na indústria de fermentação para produzir enzimas hidrolíticas, como amilases ou lipases, e ácidos orgânicos, como ácido cítrico e ácido glucônico (SAMSON *et al.*, 2007; SAMSON; VARGAS, 2009; VARGA *et al.*, 2000; SCHUSTER *et al.*, 2002).

Algumas espécies do grupo *Aspergillus* section *Nigri* são capazes de produzir micotoxinas. As micotoxinas são produzidas pelo metabolismo secundário de alguns fungos filamentosos e podem provocar doenças ou morte quando ingeridas por animais ou homem (BENNETT; KLICH, 2003; SAMSON *et al.*, 2004;

PITT; HOCKING, 2009; SAMSON *et al.*, 2010). A maioria das micotoxinas são imunossupressoras e algumas são cancerígenas, hepatotóxicas, nefrotóxicas e neurotóxicas (MARROQUÍN-CARDONA *et al.*, 2014).

A descoberta de que *A. niger* é capaz de produzir a ocratoxina A (OTA) ocorreu em 1994 (ABARCA *et al.*, 1994), e até recentemente esta foi considerada a principal micotoxina produzida por *A. niger*. Ocratoxina A é considerada nefrotóxica, imunossupressora, teratogênica, mutagênica, carcinogênica e possivelmente genotóxica em experimentação animal (FAO/WHO, 2001; IARC, 1993). A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 2002), classificou a ocratoxina A como um possível carcinógeno para seres humanos, pertencendo ao grupo 2B.

Em 2007, Frisvad e colaboradores relataram a capacidade de *A. niger* produzir uma segunda micotoxina: a fumonisina B₂. As fumonisinas são carcinogênicas, hepatotóxicas e nefrotóxicas, causadoras de leucoencefalomalácia (relacionadas com lesões necróticas no cérebro) em equinos e edema pulmonar em suínos.

Em cebolas, alguns trabalhos relatam a presença de *A. section Nigri*, principalmente *A. niger*, mas como causadores da podridão preta, uma doença que ocorre principalmente na pós-colheita (KAMAL *et al.*, 2012). Contudo, o estudo sobre a deterioração e produção de micotoxinas em cebolas por *A. section Nigri* ainda é escasso. Considerando-se a importância comercial e o consumo da cebola, justifica-se a importância do presente trabalho e a pesquisa sobre o assunto é importante e necessária.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cebola

Acredita-se que a cebola (*Allium cepa* L.) seja originária do Oriente Médio. A cebola é uma planta herbácea, podendo ter ou não folhas cerosas e apresentam uma disposição alternada, formando duas fileiras ao longo do pseudocaule. As bainhas foliares, onde as folhas se inserem, crescem para cima do solo formando uma estrutura firme chamada de pseudocaule. O caule está localizado abaixo da superfície do solo e é composto por um disco achatado, conhecido como prato, de onde se projetam as raízes fasciculadas. A parte comercial da cebola é conhecida como bulbo tunicado, que apresenta variação na cor, formato, tamanho e pungência. A Figura 1 apresenta a estrutura da cebola (EMBRAPA SEMI-ÁRIDO, 2007).

O período de cultivo da cebola, desde a sementeira até a colheita, varia muito com o clima, geralmente entre 130 - 175 dias. O cultivo da cebola pode ser feito em diferentes tipos de solo, mais os ideais são os com textura média, com pH ótimo de 6 a 7 (FAO, 2013).

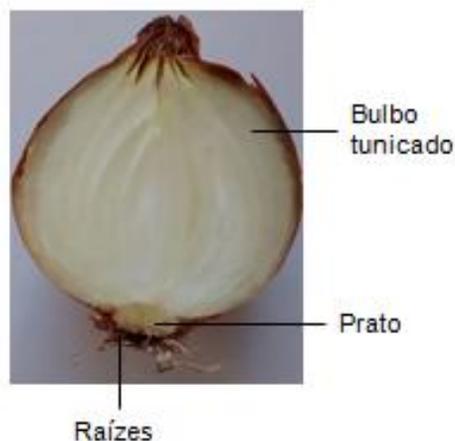


Figura 1. Estrutura da cebola.

O cultivo da cebola pode ser feito por sementeira direta, na qual é realizada com auxílio de máquinas e as sementes são semeadas em linhas simples ou duplas. No Brasil, o mais comum é o plantio por transplante de mudas, pois permite a seleção de mudas mais saudáveis e vigorosas. Outra forma de cultivo é o sistema de plantio com pequenos bulbinhos, no qual se obtém a colheita precoce, constituindo em duas etapas: formação dos bulbinhos em uma época e o plantio para a produção comercial em outra (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2015; HORTAS, 2015).

Segundo Ferreira (2000), a colheita da cebola se inicia quando 50 - 60 % das plantas apresentam murchamento da rama (região do pescoço acima do bulbo tomba). A colheita pode ser realizada de forma mecanizada ou manual, sendo que no Brasil a colheita manual é mais comum. Após a colheita, ocorre a etapa de cura, podendo ser natural ou artificial. A natural ocorre no campo, quando após a colheita as cebolas ficam expostas no solo até as cascas ficarem secas e quebradiças e apresentarem uma coloração intensa. Este processo demora de 10 - 15 dias após a colheita. A cura artificial ocorre em galpões e são utilizados ventiladores com ar natural, secadores ou com radiação infravermelha. A finalidade da cura é diminuir a umidade, secar as películas externas do bulbo, promover a coloração intensa das cascas do bulbo e reduzir a podridão. (EMBRAPA, 2015).

De acordo com o Compêndio de Pós-colheita (FAO, 2003), as cebolas são altamente valorizadas tanto pelo seu sabor, quanto pelo seu valor nutricional, podendo ser consumidas cruas, fritas ou cozidas, e usadas em sopas e ensopados. Elas também são preservadas na forma de picles. A Tabela 1 apresenta a composição nutricional da cebola.

Tabela 1. Valor nutricional da cebola.

Informação nutricional	Porção de 100 g
Água	87%
Calorias	48
Proteína	1,5 g
Gordura	Traços
Carboidratos	11 g
Fibra	0,5 g
Cálcio	30 mg
Fósforo	-
Ferro	0,5 mg
β - caroteno	Traços
Tiamina	0,04 mg
Riboflavina	0,02 mg
Niacina	0,3 mg
Ácido Ascórbico	10 mg

Fonte: *Platt¹, 1962; FAO, 1972² apud Compêndio de Pós-colheita (FAO, 2003)

A cebola é a terceira hortaliça mais produzida no mundo. No Brasil destaca-se ao lado da batata e do tomate como as olerícolas economicamente mais importantes, tanto pelo volume produzido, quanto pela renda gerada (LEITE, 2014). O Brasil é o 8º produtor de cebola no mundo, participa com cerca de 2 % da oferta mundial e responde por 36 % da produção sul-americana. Brasil, Argentina e Peru produzem 73 % da cebola da América do Sul (JORNAL A COMARCA, 2012). Segundo o IBGE (2013) a produção de cebolas em 2012 no Brasil foi de 1.356,706 toneladas. Os principais produtores localizam-se nas

Platt¹, B.S. 1962. Table of representative values of food commonly used in tropical countries. Medical Research Council, Spec. Rep. Series No. 302, HMSO, London.

FAO². 1972. Food composition table for use in East Asia. FAO, Rome

regiões Sul (53,23 %), Sudeste (23,66 %) e Nordeste (23,10%), representados principalmente pelos estados de Santa Catarina, São Paulo e Bahia, respectivamente.

A cebola é atacada por várias doenças fúngicas, bacterianas, virais e nematológicas, podendo ocorrer tanto no campo como na pós-colheita, durante o transporte, armazenamento e comercialização. Destas, as doenças fúngicas são as mais destrutivas (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2015).

No campo, as doenças fúngicas mais comuns são mancha púrpura causada pela *Alternaria porri*; antracnose (mal de sete voltas e antracnose da folha) causado por *Colletotrichum gloeosporioides f. sp. cepae*; antracnose da cebola branca causado por *C. circinans*; míldio causado pelo oomiceto *Peronospora destructor*; ferrugem pelo fungo *Puccinia allii*; queima das pontas causado pelo fungo *Botrytis squamosa*; raízes rosadas causado pelo fungo de solo *Pyrenochaeta terrestris*; podridão branca pelo fungo *Sclerotium cepivorum*; podridão basal pelo *Fusarium oxysporum f. sp. cepae*; queima e podridão de *Phytophthora* causada por *Phytophthora sp.* Já na pós-colheita as doenças mais comuns são mofo preto causado pelo *Aspergillus niger*; mofo verde pelo fungo *Penicillium spp.*; antracnose da cebola branca causado por *C. circinans*; podridão basal pelo *F. oxysporum f. sp. cepae*; podridão aquosa pelo fungo *Botrytis allii*; podridão-mole por *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovora*; podridão da escama por *Burkholderia cepacia* e podridão da escama causada pelo fungo *Pseudomonas viridiflava*. (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2015; ONION IPMPIPE DIAGNOSTIC POCKET SERIES, 2011).

Em cebolas, os fungos das espécies de *Aspergillus* section *Nigri* (Figura 2) penetra pelo pescoço do bulbo nas cebolas íntegras ou através do rompimento da película e desenvolve-se nas escamas internas do bulbo, abaixo da película (WORDELL FILHO, *et al.*, 2006; VARGA *et al.*, 2012). O crescimento de

Aspergillus niger na cebola é uma das principais doenças causadas na pós-colheita que podem provocar perdas qualitativas e quantitativas (KAMAL *et al.*, 2012).



Figura 2. *Aspergillus section Nigri* em bulbo de cebola.

O controle das doenças de pós-colheita está relacionado com o sistema de cura, armazenamento e comercialização da cebola. O processo de cura dos bulbos é eficiente para prevenir doenças uma vez que é realizada a desidratação das camadas externas da cebola. A perda de água é evitada e com isso impede a penetração de fungos. É também necessário evitar ambientes muito quentes e úmidos, com temperaturas acima de 24 °C, que favorecem a multiplicação de fungos e bactérias (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2015; ONION IPMPIPE DIAGNOSTIC POCKET SERIES, 2011).

2.2 Gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* é um dos mais estudados no reino dos fungos (PITT; SAMSON, 2007). Atualmente, o gênero *Aspergillus* compreende cerca de 339 espécies aceitas (SAMSON *et al.*, 2014), sendo que é um gênero estudado desde 1729 e a sistemática está em constante fluxo (SAMSON; VARGA, 2009).

O gênero *Aspergillus* pertence à classe dos hifomicetos, apresentam colônias em diferentes colorações (tons de verde, amarelo, marrom, branco, preto e cinza) (KLICH, 2002). Os conidióforos geralmente são formados a partir de grandes hifas com paredes espessas, terminam na forma de vesículas. As vesículas são geralmente esféricas e é onde se inicia o crescimento das métulas e/ou fiálides, local onde originam os conídios (esporos) (KLICH; PITT, 1988; PITT; HOCKING, 2009). Além das características morfológicas os isolados podem ser caracterizados pelos perfis de metabólitos secundários, taxa de crescimento em determinadas temperaturas e atividade de água, coloração dos conídios e pelo seu crescimento em meio de cultura Creatine-Sucrose Agar (CREA) (SAMSON; VARGA, 2009).

Os *Aspergillus* são encontrados em diversos tipos de ambientes, principalmente os quentes e temperados. Este gênero pode se desenvolver em condições de altas temperaturas e baixa atividade de água, o que os torna adaptáveis em frutas secas e cereais (PITT; HOCKING, 2009).

As espécies de *Aspergillus* estão entre os fungos economicamente mais importantes, devido a sua ampla utilização para a síntese de produtos químicos, para transformações biossintéticas e produção de enzima, além de grande importância na deterioração dos alimentos, produzindo as principais e mais importantes micotoxinas (PITT; HOCKING, 2009).

2.2.1 *Aspergillus section Nigri*

Os *Aspergillus section Nigri* englobam várias espécies importantes em micologia de alimentos, micologia médica e biotecnologia (SAMSON *et al.*, 2007). Muitas espécies deste gênero podem causar deterioração dos alimentos, contudo, são amplamente utilizados na indústria de fermentação para produzir enzimas

hidrolíticas, como amilases ou lipases, e ácidos orgânicos, como ácido cítrico e ácido glucônico (VARGA *et al.*, 2000).

As espécies de *Aspergillus* section *Nigri* são consideradas umas das mais complexas, pois as diferenças entre elas são muito sutis (RAPER; FENNEL, 1965; KLICH, 2002b). As diferenças morfológicas entre as espécies são basicamente a coloração dos conídios que podem variar do marrom escuro a preto, os conidióforos que podem ser unisseriados ou bisseriados e vesículas esféricas (KLICH, 2002; PERRONE *et al.*, 2007).

Os *Aspergillus* section *Nigri* são comumente encontrados no ambiente, e seu principal habitat é o solo, mas também podem ser encontrados no ar, água e alimentos, como figo seco, grãos de café, uva, uva passa, pimenta em pó, amêndoa de cacau, entre outros (KOZAKIEWICZ, 1989; NOOMIN *et al.*, 2008; MOGENSEN *et al.*; 2010, SANTOS *et al.*; 2011; BISBAL *et al.*, 2009). *Aspergillus* section *Nigri* é considerado um grupo frequente em castanhas, especialmente em amendoim e nozes (PITT; HOCKING, 2009). Algumas espécies de *Aspergillus* section *Nigri* são capazes de produzir micotoxinas, como ocratoxinas e fumonisinas (HOCKING *et al.*, 2007; FRISVAD *et al.*, 2007).

Samson *et al.* (2007) observaram características dos *Aspergillus* section *Nigri* e aceitaram 19 espécies neste grupo. Foram analisadas características de coloração e diâmetro da colônia, fisiologia, produção de metabólitos secundários e métodos moleculares. Os autores dividiram as espécies em dois grupos: i) espécies unisseriadas: *A. aculeatus*, *A. aculeatinus*, *A. japonicus*, *A. uvarum* e ii) espécies bisseriadas: *A. brasiliensis*, *A. carbonarius*, *A. costaricensis*, *A. ellipticus*, *A. foetidus*, *A. heteromorphus*, *A. homomorphus*, *A. ibericus*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. lacticoffeatus*, *A. piperis*, *A. sclerotioniger*, *A. sclerotii carbonarius* e *A. vadensis*.

Recentemente foram descritas mais oito novas espécies. Varga *et al.* (2011) estudaram a morfologia, fisiologia e utilizaram métodos moleculares e descreveram *A. acidus*, *A. eucalypticola*, *A. fijiensis*, *A. indologenus*, *A. neoniger*, *A. violaceofuscus*, *A. coreanus*, *A. saccharolyticus*, totalizando 26 espécies aceitas. Estudos realizados por Jurjevic *et al.* (2012) descreveram mais duas novas espécies unisseriadas não produtoras de ocratoxina A, *A. floridensis* e *A. trinidadensis*, que foram isoladas de amostras de ar.

Segundo Vries *et al.* (2005) somente quatro espécies foram confirmadas como produtoras de ocratoxina A: *A. carbonarius*, *A. niger sensu stricto*, *A. lacticoffeatus* e *A. sclerotioniger*. E somente uma espécie confirmada como produtora de Fumonisina B₂: *A. niger* (FRISVAD *et al.*, 2007).

Gherbawy e colaboradores (2015) estudaram 40 amostras de cebola provenientes da região Taif da Arábia Saudita, e isolaram sessenta fungos pertencentes a 10 gêneros. Sessenta e seis por cento dos isolados foram classificados como *Aspergillus* section *Nigri* e identificados como *A. welwitschiae*. Destes isolados, 18 foram capazes de produzir fumonisina B₂ e 37,5 % das amostras de cebola analisadas apresentaram contaminação com fumonisina B₂ e nenhuma amostra apresentou contaminação com ocratoxina A. Varga *et al.* (2012) analisaram amostras de bulbos de cebola previamente contaminados com fungos provenientes de estabelecimentos comerciais da Hungria e isolaram 35 *Aspergillus* section *Nigri*. Através da análise molecular estes foram identificados como *A. awamori*. Duas amostras de cebola analisadas foram capazes de produzir fumonisina.

2.2.2 *Aspergillus niger*

Aspergillus niger é um dos micro-organismos mais importantes utilizados em biotecnologia (SCHUSTER *et al.*, 2002). O fungo possui o status GRAS

(*Generally Regarded as Safe*) estabelecido pelo FDA (*US Food and Drugs Administration*) e é utilizado em indústrias na produção de várias enzimas e ácidos orgânicos (SAMSON *et al.*, 2007; SAMSON; VARGAS, 2009).

Microscopicamente os *A. niger* são bisseriados, apresentando métulas e fiálides, como mostra a Figura 3. Os conidióforos possuem paredes lisas, com largura variando entre 1,0 a 3,0 μm . As vesículas são esféricas, medindo entre 50 a 75 μm de diâmetro, as métulas e as fiálides cobrem toda a vesícula. As métulas possuem comprimento de 10 a 15 μm e as fiálides variam entre 7 a 10 μm de comprimento. Os conídios são esféricos, possuindo diâmetro de 4 a 5 μm , suas paredes ásperas ou estriadas (PITT; HOCKING, 2009).

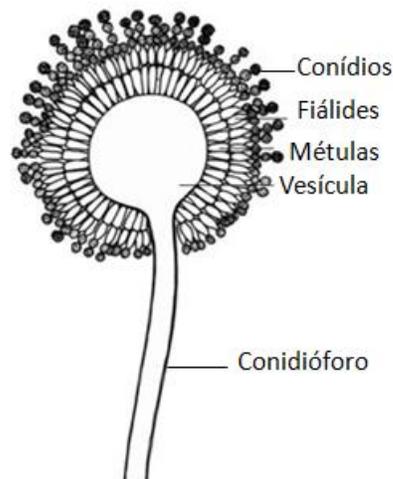


Figura 3. Morfologia de *A. niger*.

(Fonte: <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/images/plisne/perokresby/Aspergillus%20niger%20nakres.jpg>, 2015).

As espécies de *A. niger* possuem colônias com crescimento em meio CYA, que medem cerca de 60 mm de diâmetro, são planas e aveludadas, como apresentado na Figura 4. Podem crescer em uma faixa de temperatura entre 6 a 47 °C, apresentando temperatura ótima entre 35 - 37 °C e podem crescer em

atividade de água de 0,88. São capazes ainda de crescer em uma ampla faixa de pH, pH entre 1,4 - 9,8. Possuem conídios pretos que são muito resistentes à radiação e, portanto, muitas vezes são encontrados em produtos secos ao sol (SCHUSTER *et al.*, 2002; PITT; HOCKING, 2009; SAMSON *et al.*, 2010).

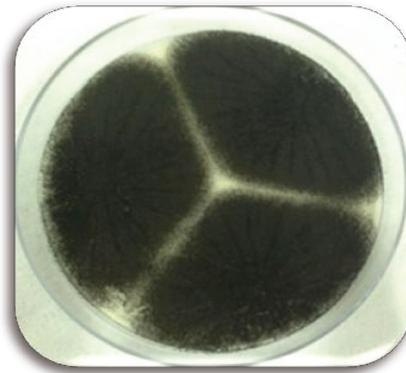


Figura 4. *A. niger* em CYA, após 7 dias a 25 °C.

A. niger é um fungo comum, isolado em todo o mundo, mas principalmente de alimentos como uvas, café, milho, cebola, cacau, frutas secas, diversas frutas e legumes e outros tipos de alimentos, incluindo o ar e o solo (SAMSON *et al.*, 2010; VARGA *et al.*, 2012; COPETTI *et al.*, 2010; IAMANAKA *et al.*, 2005; VARGA *et al.*, 2008).

2.3 Micotoxinas

As micotoxinas são metabólitos secundários, de baixo peso molecular, produzidos por fungos filamentosos que podem provocar doenças ou morte quando ingeridas por animais ou homem (BENNETT; KLICH, 2003; SAMSON *et al.*, 2004; PITT; HOCKING, 2009; SAMSON *et al.*, 2010).

Quando ingeridas as micotoxinas, podem ser tóxicas para humanos e animais (FLORES-FLORES *et al.*, 2015). Elas representam um grande problema no setor de cereais, como arroz, milho e trigo. A Organização para a Alimentação

e Agricultura das Nações Unidas (FAO) 2002, estimou que aproximadamente 25% das culturas alimentares produzidos no mundo podem estar contaminados por micotoxinas.

Após ingestão, as micotoxinas podem acumular-se em diferentes órgãos ou tecidos, entrando na cadeia alimentar através de carne, leite ou ovos (MARIN *et al.*, 2013). A maioria das micotoxinas possui atividade imunossupressora e algumas são cancerígenas, hepatotóxicas, nefrotóxicas, e neurotóxicas (MARROQUÍN-CARDONA *et al.*, 2014).

A produção de micotoxinas está diretamente relacionada com crescimento fúngico, sendo que esta pode ocorrer em qualquer época do crescimento, colheita, ou estocagem do alimento. Nem todos os fungos produzem toxinas e as micotoxinas podem estar presentes no alimento mesmo após a destruição do fungo (IAMANAKA *et al.*, 2010).

Segundo Hussein & Brassel (2001) uma única espécie de fungo pode produzir mais de um tipo de micotoxina e diferentes espécies de fungos podem produzir um mesmo tipo de micotoxina. Os três principais gêneros produtores de micotoxinas em alimentos são: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (MURPHY *et al.*, 2006).

De acordo com Binder e colaboradores (2007) já foram descritas cerca de 300 micotoxinas, mas apenas seis possuem limites máximos na legislação brasileira (RDC nº 7 de 18 de Fevereiro de 2011) que são as aflatoxinas, desoxinivalenol, ocratoxina A, fumonisina, zearalenona e patulina (ANVISA, 2011).

2.3.1 Ocratoxina A

A ocratoxina A foi isolada pela primeira vez em 1965, a partir de cultura de *Aspergillus ochraceus* (VAN DER MERWE *et al.*, 1965). Esta micotoxina é produzida por diversas espécies de *Penicillium* e *Aspergillus*, que contaminam naturalmente diversos alimentos, incluindo frutas, vegetais, frutas secas, cereais, especiarias e produtos de origem animal (EFSA, 2006; NOGUEIRA; OLIVEIRA, 2006; BARKAI-GOLAN, 2011; DURAND *et al.*, 2013).

Ocratoxina A é considerada o composto mais presente e mais tóxico dentre as outras duas existentes (ocratoxina B e ocratoxina C), está presente em uma grande variedade de alimentos e a presença de cloro na sua estrutura, como mostra a Figura 5, faz com que ela se torne única (MURPHY *et al.*, 2006).

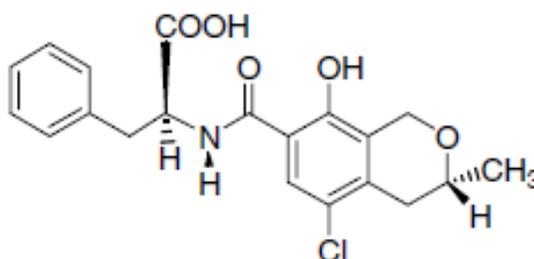


Figura 5. Estrutura química da ocratoxina A.

(Fonte: MURPHY *et al.*, 2006)

A ocratoxina A pode ser considerada nefrotóxica, imunossupressora, teratogênica, mutagênica, carcinogênica e possivelmente genotóxica em experimentação animal (FAO/WHO, 2001; IARC, 1993). A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 2002), classifica a ocratoxina A como um possível carcinógeno para seres humanos, pertencendo ao grupo 2B.

A ocratoxina A já foi relacionada à nefropatia endêmica dos Balcãs e também ao desenvolvimento de tumores no trato urinário na Tunísia e no Egito mas atualmente estes dados ainda não estão confirmados. A exposição humana a OTA, provavelmente se dá com o baixo nível de contaminação de diferentes alimentos ingeridos (CREPPY, 1999; PERAICA *et al.*, 1999).

Segundo Boudra *et al.* (1995), a ocratoxina A é um composto estável, não podendo ser destruída somente por aquecimento, sendo necessário temperaturas acima de 250 °C para reduzir a concentração da toxina. Diante do conhecimento dos danos que a ocratoxina A pode causar à saúde humana e animal, alguns países estabeleceram limites máximos de tolerância.

Frisvad e colaboradores 2004, descreveram dez espécies de *A. section Circumdati* produtoras de ocratoxina A: *A. cretensis*, *A. flocculosus*, *A. ochraceus*, *A. pseudoelegans*, *A. roseoglobulosus*, *A. sclerotiorum*, *A. steynii*, *A. sulphureus*, *A. westerdijkiae* e *Neopetromyces muricatus*. Algumas espécies de *Penicillium* são capazes de produzir OTA, sendo que *P. verrucosum* é a espécie que produz maior quantidade de ocratoxina A, espécie mais comum em países de climas temperados e frios. *P. nordicum* é outra espécie de *Penicillium* capaz de produzir OTA (IAMANAKA *et al.*, 2010).

A descoberta de que *A. niger* sensu stricto é capaz de produzir a ocratoxina A (OTA) ocorreu em 1994 (ABARCA *et al.*, 1994), e até recentemente esta foi considerada a principal micotoxina produzida por *A. niger*, sendo responsável pela contaminação de cereais, temperos, cerveja, frutas secas, café e cacau (SAMSON *et al.*, 2004; EFSA, 2006). Já foi relatada a produção de ocratoxina A por *Aspergillus* section *Nigri* em uvas e produtos de uva, como o vinho, suco de uva e uva passa, frutas secas, café em diferentes estágios de maturação, entre outros (HOCKING *et al.*, 2007; IAMANAKA *et al.*, 2005; URBANO *et al.*, 2001).

2.3.2 Fumonisina B₂

A fumonisina foi descrita pela primeira vez em 1988 na África do Sul, por espécies do gênero *Fusarium*, especificamente produzidas por *Fusarium verticillioides* (GELDERBLOM *et al.*, 1988). Após anos de estudo, outras espécies foram descritas como produtoras de fumonisina: *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. globosum*, e outras espécies de *Fusarium* spp., *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* e outras espécies do complexo *Gibberella fujikuroi* isoladas a partir do milho e seus derivados (SCOTT, 2012; DESJARDINS, 2006; RHEEDER *et al.*, 2002). Recentemente, Frisvad e colaboradores (2007) descreveram que *A. niger* é capaz de produzir fumonisina.

Existem pelo menos três fumonisinas FB₁, FB₂ e FB₃, encontradas na sua forma natural, sendo que a fumonisina B₁ ocorre em níveis maiores, seguida pela FB₂ e FB₃ (RHEEDER *et al.*, 2002; SEWRAM *et al.*, 2005; IAMANAKA *et al.*, 2010). A fumonisina B₁ é a mais estudada dentre este grupo de metabólitos, mas quando comparada à FB₂, esta última é mais citotóxica que a FB₁. A Figura 6 apresenta a estrutura química das fumonisinas (GUTLEB *et al.*, 2002). As fumonisinas são consideradas hidrofílicas, o que as torna de difícil estudo se comparadas a outras micotoxinas, que são solúveis em solventes orgânicos (BENNETT & KLICH, 2003).

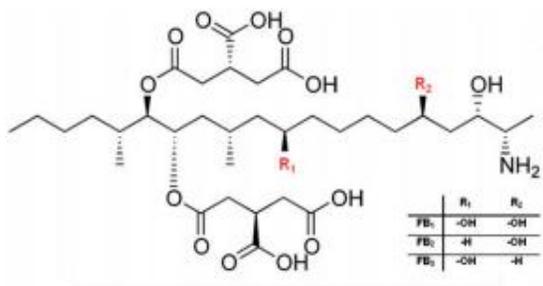


Figura 6. Estrutura química das principais fumonisinas.

(Fonte: SCOTT, 2012)

As fumonisinas são carcinogênicas, hepatotóxicas e nefrotóxicas, causadoras de leucoencefalo-malácia (relacionadas com lesões necróticas no cérebro) em equinos e edema pulmonar em suínos. O consumo de grãos contaminados por fumonisinas pode estar relacionado ao maior índice de câncer esofágico em humanos elevado em várias partes da África, América Central, Ásia, Charleston, Carolina do Sul, EUA (DESJARDINS, 2006; MURPHY *et al.*, 2006, ZAIN, 2011).

A recente descoberta da produção de fumonisina B₂ por *A. niger*, levanta preocupações sobre a presença desta micotoxina em diversos alimentos (MOGENSEN *et al.*, 2010). Diversos autores já relataram a produção de fumonisina B₂ por *Aspergillus section Nigri* em diversos alimentos, como por exemplo, em milho, figo seco, uva, vinho, uvas passas, café, entre outros (SUSCA *et al.*, 2014; SOMMA *et al.*, 2012; LOGRIECO *et al.*, 2011; MOGENSEN *et al.*, 2010; NOOMIN *et al.*, 2009).

2.4 Legislação

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os alimentos comercializados no Brasil deverão respeitar um limite máximo tolerado para a presença de micotoxinas. Estes foram publicados no Diário Oficial da União, na Resolução RDC Nº 7 de 18 de fevereiro de 2011. Foram estabelecidos limites para 14 categorias de alimentos, como leite e produtos lácteos, sucos de maçã e uva, café torrado (moído ou em grão) e solúvel, entre outros.

No Brasil, ainda não existem limites máximos tolerados para a presença de ocratoxina A e fumonisina B₂ para cebola. A Tabela 2 mostra os limites máximos tolerados para ocratoxina A e fumonisina B₁ + B₂ em diferentes alimentos (ANVISA, 2011).

Em 26 de dezembro de 2013 foi publicada no Diário Oficial da União uma Resolução - RDC Nº 59 que prorrogou os prazos até 1º de janeiro de 2017 para a adequação dos limites estabelecidos da Resolução RDC Nº 7 de 18 de fevereiro de 2011.

Tabela 2. Limites máximos tolerados de ocratoxina A e fumonisina B₁ + B₂ em diferentes alimentos (Fonte: ANVISA, 2011).

Aplicação 22 de Fevereiro de 2011

Micotoxinas	Alimento	LMT (µg/kg)
Ocratoxina A	Cereais e produtos de cereais, incluindo cevada malteada	10
	Feijão	10
	Café torrado (moído ou em grão) e café solúvel	10
	Vinho e seus derivados	2
	Suco de uva e polpa de uva	2
	Especiarias: Capsicum spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta de caiena e pimentão-doce) Piper spp. (o fruto, incluindo a pimenta branca e a pimenta preta) Myristica fragrans (noz-moscada) Zingiber officinale (gengibre) Curcuma longa (curcuma) Misturas de especiarias que contenham uma ou mais das especiarias acima indicadas	30
	Alimentos a base de cereais para	2

	alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	
	Produtos de cacau e chocolate	5,0
	Amêndoa de cacau	10
	Frutas secas e desidratadas	10
Fumonisin (B₁ + B₂)	Milho de pipoca	2000
	Alimentos a base de milho para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	200

Aplicação em janeiro de 2012

Micotoxinas	Alimento	LMT (µg/kg)
Fumonisin (B₁ + B₂)	Farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha	2500
	Amido de milho e outros produtos à base de milho	2000

Aplicação em janeiro de 2014

Micotoxinas	Alimento	LMT (µg/kg)
Ocratoxina A	Cereais para posterior processamento, incluindo grão de cevada	20
Fumonisin (B₁ + B₂)	Milho em grão para posterior processamento	5000

Aplicação em janeiro de 2016

Micotoxinas	Alimento	LMT ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Fumonisin (B ₁ + B ₂)	Farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha	1500
	Amido de milho e outros produtos a base de milho	1000

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a presença de *Aspergillus section Nigri* em cebola e verificar a contaminação por ocratoxina A e fumonisina B₂.

3.2 Objetivos Específicos

- Isolar *Aspergillus section Nigri* de bulbos de cebola, casca de cebola e solo provenientes de sua plantação;
- Caracterizar as espécies através da morfologia e fisiologia;
- Investigar a capacidade de produção de ocratoxina A e fumonisina B₂ pelos isolados;
- Otimizar a metodologia de análise de ocratoxina A e fumonisina B₂ nos bulbos de cebola;
- Avaliar a presença de ocratoxina A e fumonisina B₂ nos bulbos de cebola.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras

As amostras de cebola de pós-colheita foram coletadas em estabelecimentos comerciais na região de Campinas/SP e centro varejista (Ceasa) de Campinas e São Paulo/SP. As amostras de campo e solo da plantação foram coletadas em fazendas e sítios na região de São José do Rio Pardo/SP.

Foi coletado aproximadamente 1kg de cada amostra para a realização dos ensaios. As análises de fungos e atividade de água foram realizadas em até no máximo três dias da chegada ao laboratório. Em seguida, as amostras foram congeladas de -10 °C a -20 °C até o momento da análise de ocratoxina A e fumonisina B₂.

Nos supermercados e centros varejistas de Campinas/ SP (Figura 7) e São Paulo/SP foram coletadas 40 amostras, provenientes de regiões produtoras do estado de São Paulo, Santa Catarina, Paraná, além de cebolas importadas da Argentina, Chile, Espanha e Holanda.

No interior do estado de São Paulo foram adquiridas 42 amostras de campo, durante a colheita, como mostra a Figura 8, nas cidades de Casa Branca, São José do Rio Pardo e Vargem Grande do Sul (Figura 9), representando um total de 23 amostras de cebola e 19 amostras de solo. Para esta coleta foi realizada parceria com a Cooperbatata – Cooperativa dos Bataticultores da região de Vargem Grande do Sul. A Tabela 3 apresenta o número de amostras coletadas, origem e coloração.



Figura 7. Amostras estocadas no centro varejista do Ceasa Campinas/SP.



Figura 8. Plantação e colheita de cebola no interior do estado de São Paulo.



Figura 9. Regiões de coleta de amostras de cebola e solo no interior do estado de São Paulo.

(Fonte: <http://www.saojoseonline.com.br/info/info.htm>)

Tabela 3. Origem e coloração das amostras.

Amostras	Origem	Número de amostras coletadas	Coloração
Cebola pós-colheita	Estado de São Paulo	16	Amarela
	Estado do Paraná	2	1 Amarela e 1 Roxa
	Estado de Santa Catarina	10	8 Amarela e 2 Roxa
	Espanha	8	4 Amarela, 2 Branca e 2 Roxa
	Argentina	2	Amarela
	Holanda	1	Amarela
	Chile	1	Amarela
Cebola Campo	Estado de São Paulo	23	Amarela
Solo	Estado de São Paulo	19	-

4.2 Análise da atividade de água

As amostras foram descascadas, cortadas em pequenos pedaços para a avaliação da atividade de água no aparelho Aqualab, modelo 3T (Decagon, Pullman, WA, USA). As leituras foram realizadas em triplicata a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.3 Isolamento dos fungos e caracterização morfológica

4.3.1 Plaqueamento dos bulbos e cascas

Para o isolamento dos fungos presentes na cebola foi utilizada a técnica do plaqueamento direto proposto por Pitt e Hocking (2009). As cebolas foram descascadas e cortadas em 50 pedaços da primeira camada do bulbo e em seguida realizada a desinfecção superficial com solução de hipoclorito de sódio 0,4% por 2 min, sob agitação. Os 50 pedaços do bulbo e 50 pedaços da casca foram distribuídos em dez placas de petri contendo o meio de cultura Ágar Dicloran 18% Glicerol (DG18) (Figura 10). No início dos testes, foi realizado também o plaqueamento das amostras no meio Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC), que seria o recomendado para o isolamento dos fungos da cebola (atividade de água maior que 0,95). Contudo, o desempenho do DG18 foi melhor, uma vez que se verificou maior diversidade fúngica presente e melhor capacidade para isolamento das espécies estudadas. As placas foram incubadas a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 - 7 dias (PITT; HOCKING, 2009).

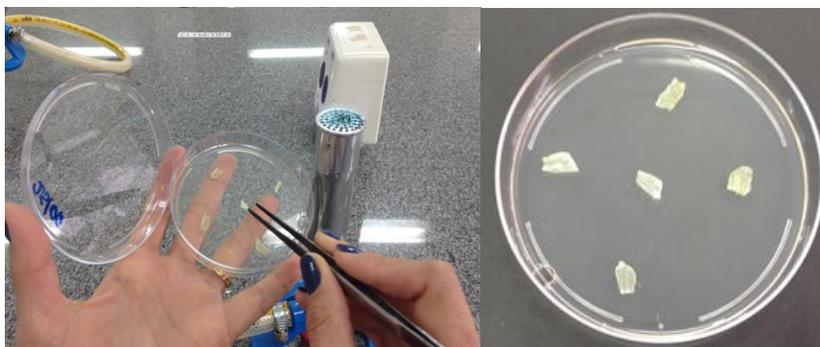


Figura 10. Plaqueamento do bulbo em meio DG18.

4.3.2 Plaqueamento do solo

Para as amostras de solo foi realizada diluição decimal em série e plaqueamento em superfície. Vinte e cinco gramas da amostra foram pesadas em bolsa estéril e adicionado de 225 mL de água peptonada 0,1%. Foi realizada a homogeneização da bolsa em Stomacher por 30 seg, seguindo a diluição decimal seriada até 10^{-6} . Após a diluição foi realizado o plaqueamento em superfície (0,1mL) com auxílio de alça de Drigalski em meio de cultura Ágar Dicloran 18% Glicerol (DG18) (Figura 11). As placas foram incubadas a 25 °C por 5 - 7 dias (PITT; HOCKING, 2009).

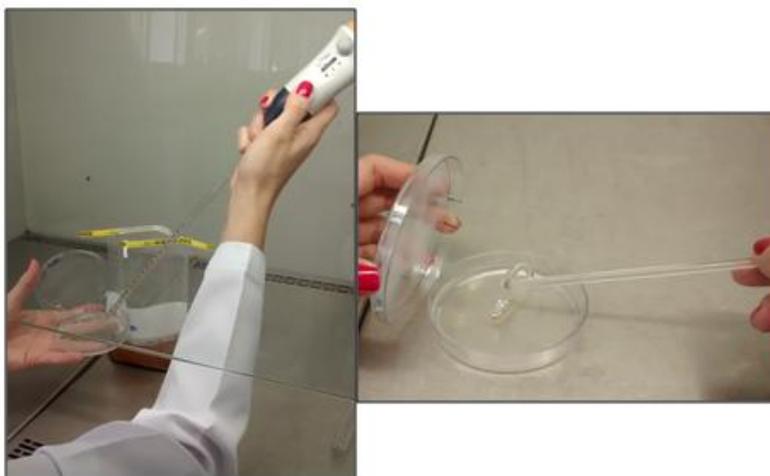


Figura 11. Plaqueamento em superfície das amostras do solo em meio DG18.

4.3.2 Caracterização dos fungos – Morfologia e Fisiologia

Todos os isolados obtidos através do plaqueamento da cebola e solo de *A. section Nigri*, e demais representantes de outras espécies foram repicados em meio ágar Czapek Extrato de Levedura (CYA) e incubadas a 25 °C por 5 dias para isolamento e purificação das espécies. Após o período de incubação, os isolados de *A. section Nigri* foram repicados novamente em três pontos equidistantes em meio CYA e incubados a 5 °C, 25 °C e 37 °C por 7 dias, em meio Ágar Extrato de Malte (MEA) e no meio ágar Creatina Sacarose (CREA) a 25 °C por 7 dias.

Foram analisadas as características macroscópicas (diâmetro e cor da colônia) em todas as temperaturas testadas, e microscópicas (tamanho, rugosidade e coloração de conídios e conidióforos) das espécies de *Aspergillus section Nigri*, de acordo com as chaves de classificação de Samson *et al.* (2010), Klich & Pitt (1988), Pitt & Hocking (2009), Samson *et al.* (2007) e demais espécies (PITT & HOCKING, 2009, SAMSON *et al.*, 2010)

4.4 Avaliação do potencial de produção de ocratoxina A pelos *Aspergillus section Nigri* isolados

Os isolados de *Aspergillus section Nigri* foram inoculados em meio ágar Extrato de Levedura Sacarose (YESA) e as placas incubadas a 25 °C por 7 dias, para a avaliação do potencial de produção de ocratoxina A. Logo após foi realizada a extração da ocratoxina A pela técnica de Ágar Plug associada à Cromatografia em Camada Delgada (CCD) (FILTENBORG *et al.*, 1983). Foi cortado um pequeno pedaço do centro da colônia (plug) e adicionadas três gotas da solução Clorofórmio: Metanol (1:1) para a extração da toxina. O plug foi pressionado na placa de cromatografia de sílica gel-G (Merck, Alemanha) de 500 µm de espessura. Na mesma placa foi aplicado 4 µL do padrão de ocratoxina A (Sigma, St Louis, EUA). A placa foi levada até a cuba contendo a fase móvel, com

os seguintes solventes: Tolueno: Acetato de Etila: Ácido Fórmico 90 %: Clorofórmio (7:5:2:5 v/v/v/v). Após o término da corrida e a placa ser totalmente seca foi realizada a leitura em câmara UV (Cole Parmer, Illinois, EUA) utilizando os comprimentos de onda de 365nm e 254nm. Os resultados obtidos foram comparados com o padrão de ocratoxina A.

4.5 Análise de ocratoxina A na cebola

4.5.1 Preparo das amostras

Para análise de ocratoxina A, aproximadamente 500 g de bulbos de cebola foram triturados em liquidificador (Oster classic) e a quantidade de 25 g foi utilizada para análise. No momento da extração foram adicionados 200 mL da solução de Metanol: Bicarbonato de sódio 3% (1:1, v/v) homogeneizados em shaker (New Brunswick Scientific Company) por 30 min. A solução foi primeiramente filtrada utilizando filtro quantitativo - faixa preta (Nalgon) seguido do filtro de fibra de vidro (Vicam). Após filtragem foram coletados 4 mL do filtrado e acrescentados 96 mL de solução tampão fosfato PBS. Toda solução foi passada pela coluna de imunoafinidade para ocratoxina A (OchraTest™ WB -Vicam) com fluxo de 1-2 mL/min. Após a passagem de toda solução, a coluna foi lavada com 30 mL de água destilada. A eluição da ocratoxina A foi realizada com 4 mL de metanol coletado em frasco âmbar, seguido da secagem em fluxo de nitrogênio a 40 °C.

Foi realizado o controle positivo diário, fortificando uma amostra com padrão de ocratoxina A (Sigma, St Louis, EUA).

No momento da injeção, o extrato foi ressuspendido com 300 µL de Fase Móvel (Metanol: Acetonitrila: Água: Ác. acético (35:35:29:01, v/v/v/v) e seguido de

filtração em membrana de 0,45 µm (Analítica). Foi injetado o volume de 20 µL. A metodologia utilizada foi baseada em Vargas *et al.* (2005). As extrações foram realizadas somente nos bulbos.

4.5.2 Condições cromatográficas

A detecção e quantificação da ocratoxina A foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com detector de fluorescência. O sistema utilizado foi o Shimadzu LC-10VP HPLC (Shimadzu, Japão) com detector de fluorescência modelo RF-10AxL, comprimentos de onda de 333 nm de excitação e 477 nm de emissão e injetor automático. A coluna utilizada foi a Shimadzu Shimpack (5µm, 4,6x250mm).

A fase móvel utilizada foi Metanol: Acetonitrila: Água: Ác. acético (35:35:29:01, v/v/v/v) em um fluxo de 0,8 mL/min.

4.5.3 Otimização da metodologia de quantificação de ocratoxina A

4.5.3.1 Curva padrão ocratoxina A

Para a construção da curva padrão de ocratoxina A foram preparadas diluições do padrão (Sigma, St Louis, EUA), considerando 5 pontos na curva. A determinação da concentração de ocratoxina A da amostra foi determinada pela interpolação da área do pico da amostra na curva padrão.

4.5.3.2 Fortificação das amostras – Recuperação do método

Amostras de cebola sem contaminação com ocratoxina A foram fortificadas com padrão de ocratoxina nos níveis 0,3; 2,5 e 12,0 µg/kg e analisadas de acordo com o método descrito nos itens 4.5.1 e 4.5.2. Os valores de recuperação foram obtidos para os três níveis.

4.5.3.3 Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

O limite de detecção do método foi determinado pela análise de 8 repetições de amostras de cebola com baixa concentração de ocratoxina A (0,3 µg/kg). O desvio padrão da média dos resultados foi multiplicado pelo valor t de Student para uma confiabilidade de 99 %, segundo graus de liberdade apropriados. O limite de quantificação do método foi calculado como 10 vezes o valor do desvio padrão (KEITH *et al.*, 1983, LONG & WINEFORDNER, 1983).

4.6 Avaliação do potencial de produção de fumonisina B₂ pelos isolados de *Aspergillus section Nigri* utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Como o número de isolados de *Aspergillus section Nigri* das amostras de pós-colheita foi muito elevado e o método de análise complexo e de custo alto, foi utilizado o critério de testar 20 % das cepas de *Aspergillus section Nigri* de cada amostra. Além disso, após análise morfológica, verificou-se que as cepas eram semelhantes. Já para as amostras do campo e do solo, foram testados todos os isolados, devido ao baixo percentual de infecção por estas espécies e ao reduzido número de isolados.

4.6.1 Preparo das cepas

Os isolados de *Aspergillus section Nigri* foram inoculados em meio ágar Czapek extrato de levedura 20 % de sacarose (CY20S) e incubados a 25 °C por 7 dias, de acordo com metodologia de Frisvad *et al.* (2007).

Para a extração da FB₂ foram retirados 5 pedaços do centro da colônia (plugs) e estes foram transferidos para frasco âmbar. Antes e após a adição dos plugs no frasco âmbar, os mesmos foram pesados para obter-se o peso real do micélio para posterior cálculo da concentração da fumonisina B₂. Em seguida, foi adicionado 1 mL de metanol grau HPLC, seguido de agitação em vortex por 3 min. A solução foi filtrada em membrana de 0,22 µm (Analítica) para a limpeza da amostra, e foi coletado 500 µL deste filtrado em um vial para análise por CLAE.

No momento da injeção, 50 µL deste filtrado foram transferidos para um vial e acrescentados 50 µL do reagente o-phthaldialdehydo (OPA) para a derivatização da fumonisina, de acordo com a metodologia de Visconti, *et al.* (2001). O vial foi agitado em vortex por 30 seg e injetado rapidamente 20 µL em cromatógrafo, conforme especificado abaixo. Para controle da análise foi injetado padrão de FB₂ (Sigma-Aldrich), seguindo os mesmos passos de derivatização das cepas. Foram extraídas cepas provenientes do bulbo da cebola e do solo.

4.6.2 Condições cromatográficas

A detecção e quantificação da FB₂ foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, com detector de fluorescência. O sistema utilizado foi o Shimadzu LC-10VP (Shimadzu, Japão) com detector de fluorescência a 335 nm de excitação e 440 nm de emissão. A coluna utilizada foi Shimadzu YMC (5µm, 4,6x250mm).

A fase móvel utilizada foi Acetonitrila: Água: Ácido Acético (51:47:02, v/v/v) em um fluxo de 1,0 mL/min.

4.7 Análise de fumonisina B₂ nas amostras de cebola

4.7.1 Preparo de amostras

A metodologia de quantificação de FB₂ foi otimizada de acordo com protocolo da Vicam para análise de fumonisina B₁, B₂ e B₃ em milho, com detecção por CLAE-Fluorescência (MANUAL DE INSTRUÇÕES FUMONITEST E FUMONITEST WB).

Para análise de FB₂ os bulbos de cebola foram triturados, (aproximadamente 200 g) em liquidificador (Oster classic) e a quantidade de 5 g foi utilizada para análise. No momento da extração foi adicionado 12,5 mL de Metanol: Acetonitrila: Água (25:25:50, v/v/v) , seguindo de homogeneização em shaker (New Brunswick Scientific Company) por 20 min. Em seguida, a mistura foi centrifugada (International Equipment Company) por 10 min à 5000 rpm. O sobrenadante foi retirado e armazenado em um frasco de 50 mL. O material que ficou no frasco foi extraído novamente com 12,5 mL de Metanol: Acetonitrila: Água (25:25:50, v/v/v), foi agitado novamente em shaker por 20 minutos e centrifugado por 10 min à 5000 rpm. O sobrenadante foi retirado e adicionado no frasco juntamente com o primeiro sobrenadante. Ambos foram filtrados em papel filtro quantitativo - filtragem rápida (Nalgon). Deste filtrado foi retirado uma alíquota de 10 mL e foi transferida para um balão volumétrico, adicionando-se 40 mL de tampão fosfato (PBS). Esta solução foi filtrada em filtro de fibra de vidro (Vicom). Em seguida, 10 mL do filtrado foram transferidos para a coluna de imunoafinidade FumoniTestTM WB (Vicom) em um fluxo de 1-2 mL/min. Após a passagem de toda a solução, a coluna foi lavada com 10 mL de PBS. A FB₂ foi eluída com 1,5 mL de

metanol HPLC em frasco âmbar, seguido da secagem em fluxo de nitrogênio a 40 °C.

Foi realizado o controle positivo diário, fortificando uma amostra sem contaminação, com 0,5 µg/mL de padrão de FB₂ (Sigma-Aldrich).

Antes da injeção, o extrato seco foi ressuspendido com 200 µL de Acetonitrila : Água (1:1, v/v). Em seguida 50 µL deste filtrado foram transferidos para um vial de CLAE, acrescentando 50 µL do reagente o-phthaldialdehydo (OPA) para a derivatização da fumonisina. O vial foi agitado em vortex por 30 seg e rapidamente 20 µL da solução foi injetado em cromatógrafo conforme especificado abaixo. As extrações foram realizadas somente nos bulbos.

4.7.2 Condições cromatográficas

A detecção e quantificação da fumonisina B₂ foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de fluorescência. O sistema utilizado foi Shimadzu LC-10VP (Shimadzu, Japão) com detector de fluorescência a 335 nm de excitação e 440 nm de emissão. A coluna utilizada foi Shimadzu YMC (5µm, 4,6x250mm).

A fase móvel utilizada foi Acetonitrila: Água: Ácido Acético (51:47:02, v/v/v) em um fluxo de 1,0 mL/min.

4.7.3 Otimização da metodologia para fumonisina B₂

A metodologia utilizada para a análise de FB₂ em amostras de bulbos de cebola foi realizada de acordo com a proposta da Vicam para análise de

fumonisina em milho, com detecção por CLAE-Fluorescência, com modificações (MANUAL DE INSTRUÇÕES FUMONITEST E FUMONITEST WB).

Alguns métodos foram testados inicialmente e modificações na metodologia escolhida foram realizadas visando melhorar o desempenho e a eficácia de extração da fumonisina B₂ em cebola. Os testes são descritos a seguir.

Primeiramente foi testada a metodologia descrita pela Vicam para análise de fumonisina em milho, mas não foi obtida boa recuperação. No segundo ensaio foi alterada a quantidade de amostra pesada, retirando-se a etapa de centrifugação e adicionando-se o volume total do solvente. A amostra foi agitada somente em shaker durante 40 min. Contudo, a recuperação não foi satisfatória.

No terceiro teste seguiu-se a metodologia da Vicam, mas com alteração da velocidade e tempo de centrifugação, porém os resultados de recuperação foram insatisfatórios.

O quarto teste realizado foi semelhante ao terceiro, contudo foi alterada a velocidade e tempo da centrífuga para 5.000 rpm por 10 min. Neste teste os resultados foram satisfatórios.

4.7.3.1 Curva padrão de fumonisina B₂

Para a construção da curva padrão de fumonisina B₂ foram preparadas diluições do padrão (Sigma-Aldrich), considerando 5 pontos na curva. A determinação da concentração de fumonisina B₂ da amostra foi determinada pela interpolação da área do pico da amostra na curva padrão.

4.7.3.2 Fortificação das amostras – Recuperação do método

Amostras de cebola sem contaminação com fumonisina B₂ foram fortificadas com padrão de fumonisina nos níveis 0,25 e 0,50 µg/g, e analisadas de acordo com o método descrito nos itens 4.7.1 e 4.7.2. Os valores de recuperação foram obtidos para os dois níveis.

4.5.7.3 Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

O limite de detecção do método foi determinado pela análise de 8 repetições de amostras de cebola com baixa concentração de fumonisina B₂ (0,25 µg/g). O desvio padrão da média dos resultados foi multiplicado pelo valor t de Student para uma confiabilidade de 99 %, segundo graus de liberdade apropriados. O limite de quantificação do método foi calculado como 10 vezes o valor do desvio padrão (KEITH *et al.*, 1983, LONG & WINEFORDNER, 1983).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total foram analisadas 82 amostras, incluindo cebolas prontas pra consumo (40) coletadas em centros comerciais de São Paulo e cebolas recém-colhidas no campo (23) e solo (19).

5.2 Análise de atividade de água nos bulbos e casca de cebola

A análise de atividade de água foi realizada em triplicata e os valores médios das amostras do bulbo e casca estão representados da Tabela 4.

Tabela 4. Atividade de água nas amostras de cebola (bulbo e casca).

Origem		Média da atividade de água	Variação da atividade de água
Supermercados e centro varejista	Bulbo	0,993	0,978 - 1,000
	Casca	0,764	0,441 - 0,989
Campo	Bulbo	0,994	0,984 - 1,000
	Casca	0,905	0,765 - 1,000

Os bulbos apresentaram alta atividade de água, com média de 0,993 para as amostras do comércio, e 0,984 para as amostras do campo. A variação entre as amostras foi baixa, com mínima e máxima de 0,978 a 1,00, considerando o total de bulbos analisados. Já para a casca verificou-se que as amostras apresentaram valores mais baixos de atividade de água, com média de 0,764 e 0,905 para amostras de pós-colheita e campo, respectivamente. Estas foram mais heterogêneas, uma vez que se verificou amostra com atividade de água de 0,441 até 1,0. Comparando as amostras provenientes de pós-colheita e campo, é possível observar que a atividade de água das cebolas do campo foi mais elevada tanto no bulbo quanto na casca, devido à cebola ainda estar em contato com o solo e ainda não serem submetidas à etapa de cura, transporte, estocagem e comercialização. Além disso, as amostras do comércio apresentam um tempo maior durante as etapas de pós-processamento, e são submetidas às condições do meio ambiente, podendo as camadas mais externas perder água. Quando analisadas separadamente, as amostras de cebola de coloração amarela, branca e roxa não apresentaram grande variação de atividade de água (Tabela 5). Estes dados revelam que a cebola apresenta elevada atividade de água, e, portanto, é um produto susceptível à deterioração microbiana, incluindo os fungos filamentosos.

Tabela 5. Atividade de água nas amostras de cebola de diferentes colorações.

Coloração		Média da atividade de água	Varição da atividade de água
Amarela	Bulbo	0,993	0,939 - 1,000
	Casca	0,764	0,484 - 0,989
Branca	Bulbo	0,994	0,990 - 0,998
	Casca	0,850	0,713 - 0,986
Roxa	Bulbo	0,989	0,989 - 0,996
	Casca	0,723	0,441 - 0,893

Nas amostras da casca com coloração amarela e roxa, a atividade de água foi relativamente semelhante, já na casca branca foram observados valores maiores de atividade de água.

5.3 Avaliação da micobiota

5.3.1 Avaliação fúngica dos bulbos de cebola

Após o plaqueamento direto do bulbo e casca da cebola, e diluição do solo foi possível observar alta infecção fúngica em geral e por *Aspergillus section Nigri* como mostra a Figura 12.

A Figura 13 apresenta a porcentagem média de infecção total e a média de infecção de todos os gêneros fúngicos presentes nos bulbos.

Quando analisadas todas as amostras de bulbos de cebola, tanto pós-colheita como do campo, a média de infecção total foi de 58 % (mediana de 56 %). O principal grupo presente foi *A. section Nigri*, com média de 42 % de infecção (mediana de 34 %) e um total de 1337 isolados. Seguido de *Penicillium sp.* com média de infecção de 21 % (mediana de 4 %).

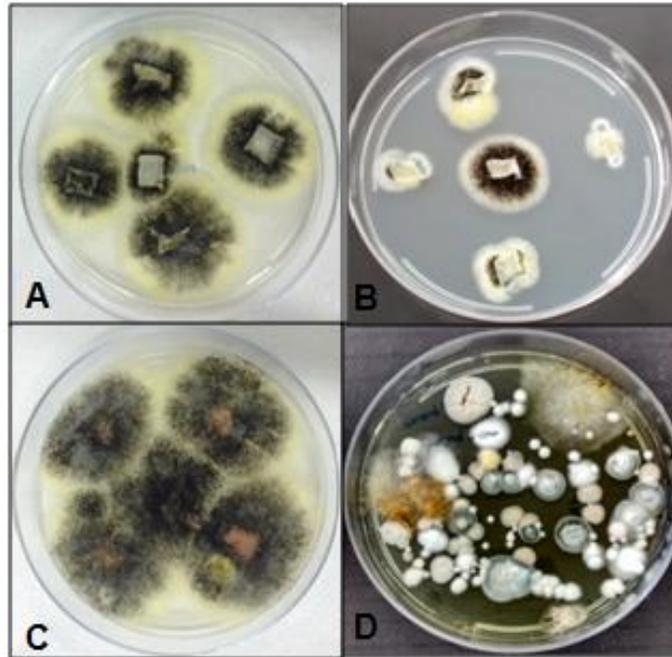


Figura 12. Infecção fúngica das amostras de cebola (bulbo e casca) e solo. Plaqueamento direto e diluição em DG18. A e B: Bulbo ; C: Casca e D: Solo.

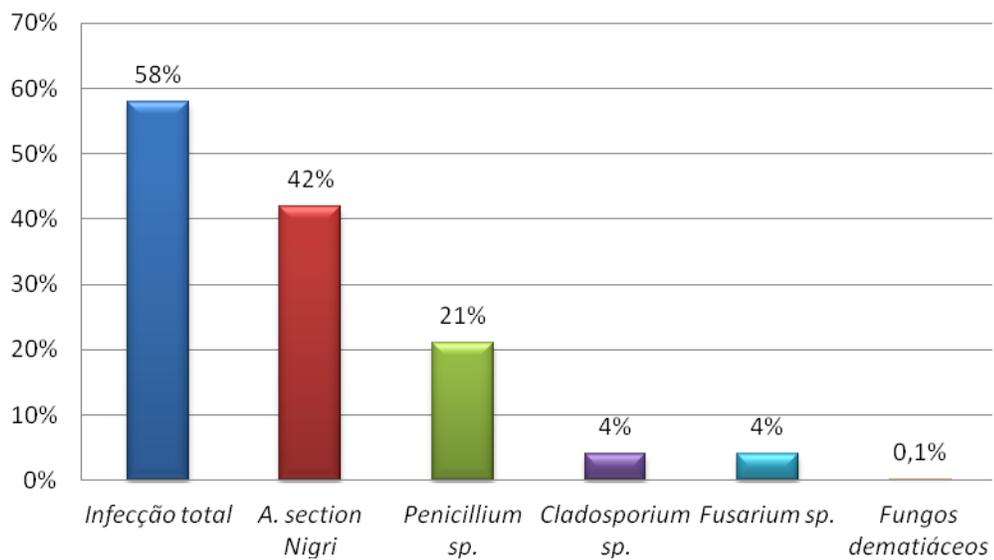


Figura 13. Porcentagem de infecção fúngica no total de amostras analisadas.

Nas 40 amostras de bulbos de cebola provenientes da pós-colheita verificou-se que a média de infecção fúngica total foi de 74 % e mediana de 85 %. Verificou-se maior número de isolados de *Aspergillus* section *Nigri* que as amostras do campo, com 64 % de media de infecção e 1.306 isolados (mediana de 70%). Os principais gêneros encontrados foram *Penicillium*, *Fusarium* e grupo dos fungos *dematiáceos* (Figura 14).

A elevada contaminação fúngica por *A. section Nigri* nos bulbos de cebola da pós-colheita foram similares aos obtidos por Sinclair & Letham (1996), que estudaram a incidência de *A. niger* no pescoço, base e meio dos bulbos de cebola e como resultado obtiveram uma elevada infecção por *A. niger*.

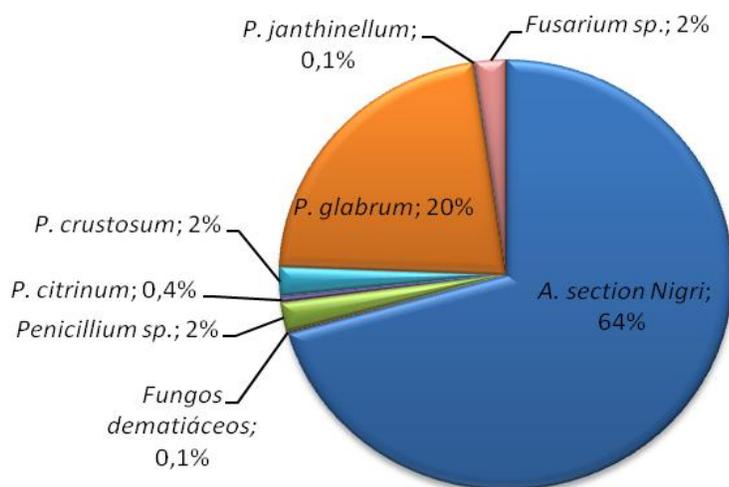


Figura 14. Porcentagem média de infecção fúngica pelos isolados das amostras de bulbos de cebola provenientes da pós-colheita.

De 23 amostras de bulbos de cebola provenientes do campo foram isolados um total de 412 fungos, apresentando porcentagem média de infecção total de 30 % (mediana de 28 %). O gênero de maior ocorrência foi *Penicillium*, seguidos por

Cladosporium, *Fusarium*, *Aspergillus* section *Nigri* (10 amostras infectadas) e grupo dos fungos dematiáceos. (Figura 15).

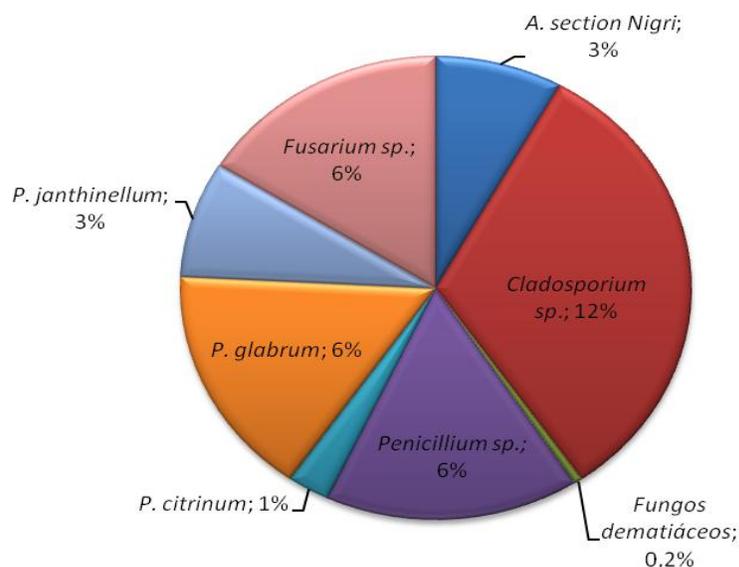


Figura 15. Porcentagem média de infecção fúngica pelos isolados de amostras de bulbos de cebola provenientes do campo.

Quando comparadas as amostras de bulbo de cebola provenientes da pós-colheita e do campo é possível observar a maior incidência de *Aspergillus* section *Nigri* na pós-colheita (Figura 16). Estes resultados corroboram com os trabalhos de Kamal *et al.* (2012) e da Embrapa Hortaliças, que relatam os *A. section Nigri* os fungos predominantes na pós-colheita causadores do mofo preto que atacam os bulbos. Estes fungos estão presentes no campo e seu crescimento pode ocorrer durante o armazenamento e transporte deste alimento, que em condições inadequadas, como elevada umidade e temperatura, pode favorecer o desenvolvimento dos *Aspergillus* negros. Por outro lado, estas espécies por serem xerofílicas, isto é, crescerem em baixa atividade de água, podem ser favorecidas também durante a pós-colheita, uma vez que perdem água após a colheita e durante o transporte e comercialização.

Outro fungo bastante predominante foi o *Penicillium*, responsável pela doença mofo verde na pós-colheita. Já nas amostras de campo a predominância também foi do gênero *Penicillium*, seguidos pelo *Cladosporium*, que é bastante comum em solo e no ambiente.

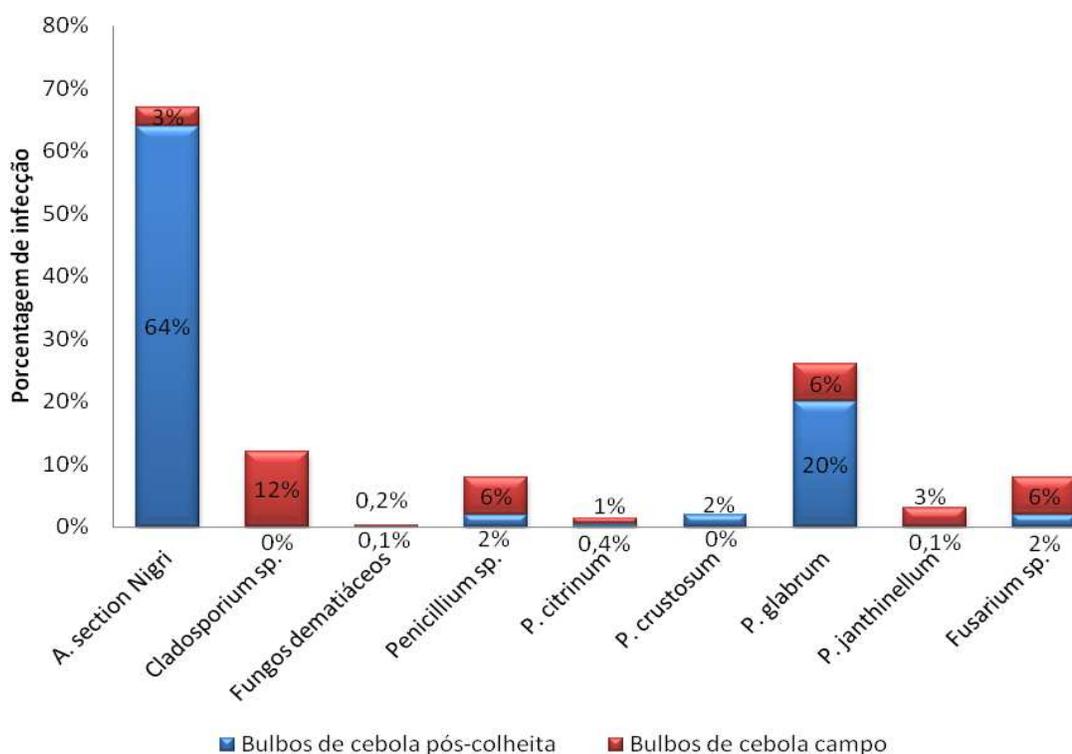


Figura 16. Porcentagem média de infecção fúngica de cebola na pós-colheita e provenientes do campo.

5.3.2 Infecção fúngica das cascas de cebola

Para as cascas de cebola verificou-se maior diversidade das espécies fúngicas quando comparadas com a parte interna (bulbo). Este fato pode ser explicado pelo maior contato da casca com o solo.

Dentre as 40 amostras de casca de cebola provenientes da pós-colheita analisadas foi isolado um total de 1.635 fungos, apresentando média de infecção fúngica de 80 % (mediana de 90 %). Semelhante nas amostras de bulbos de cebola de pós colheita, o fungo que teve predominância na casca foi o *A. section Nigri* com média de infecção fúngica de 63 % (mediana de 78 %), seguidos pelos gêneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Talaromyces*, grupo *dematiáceos* e *Cladosporium* (Figura 17).

Nas amostras de coloração roxa, branca e amarela a média de infecção fúngica foi de 92 %, 40 % e 80 %, e a infecção média por *A. section Nigri* foi de 86 %, 5 % e 63 %, respectivamente. Na casca de coloração roxa, além de *A. section Nigri* houve alta infecção por *P. glabrum* com média infecção de 32 %, já na casca de coloração branca, a média foi de 15 % por *P. sub. Aspergilloides*, 15 % *P. glabrum* e 65 % por *Fusarium sp.*

Como resultado semelhante dos bulbos, as cascas de coloração roxa apresentaram elevada contaminação por *A. section Nigri* e este valor foi significativamente maior (86 %) que a casca de coloração branca (5 %).

A Figura 17 apresenta as principais espécies isoladas de casca de cebola das amostras provenientes da pós-colheita.

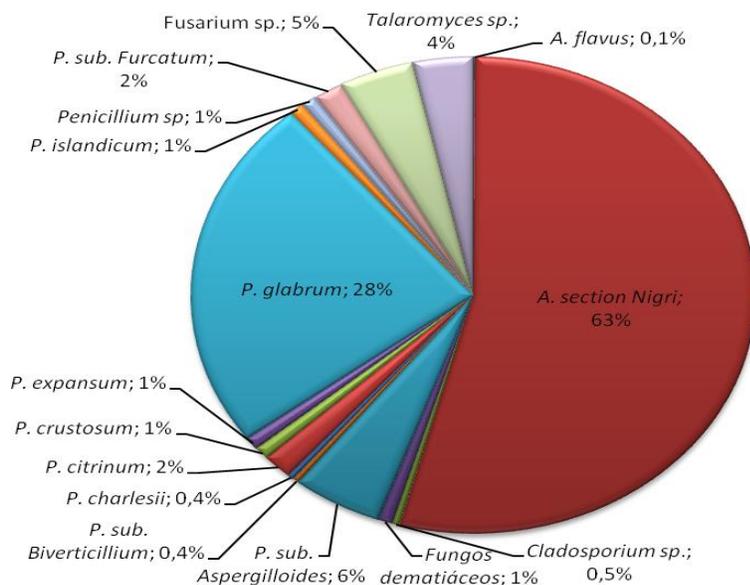


Figura 17. Porcentagem média de infecção fúngica na casca de cebola provenientes da pós-colheita.

Podemos observar na Tabela 6 a comparação entre a infecção fúngica total e pelos isolados de *A. section Nigri* nos bulbos e nas cascas de cebola provenientes da pós-colheita com diferentes colorações.

Em relação à coloração da cebola, verificou-se alta infecção fúngica e por *Aspergillus section Nigri*. A frequência de ocorrência de *Aspergillus section Nigri* para o bulbo foi maior que 90% para as três colorações analisadas. A média de infecção fúngica total do bulbo de cebola roxa, branca e amarela foi de 87 %, 58 % e 73 % e a infecção por *A. section Nigri* foi de 92 %, 44 % e 61 %, respectivamente. Apesar do número reduzido de amostras de cebola branca e roxa, pode-se observar que no bulbo de cebola roxa houve elevada contaminação por *A. section Nigri* e esse número foi menor na cebola branca. Contudo mais amostras devem ser analisadas para a confirmação destes resultados.

Os valores de infecção obtidos para a casca de cebola amarela e roxa foram semelhantes aos obtidos para o bulbo, mostrando a ocorrência de *Aspergillus section Nigri* tanto na parte interna quanto na parte externa da cebola. A média de infecção fúngica total da casca de cebola roxa, branca e amarela foi de 92%, 40% e 80 % e a infecção por *A. section Nigri* foi de 86 %, 5 % e 63 %, respectivamente.

Tabela 6. Infecção fúngica total e pelos isolados de *Aspergillus section Nigri* nos bulbos e cascas de cebola com diferentes colorações.

Coloração (n)	Bulbo				Casca			
	Infecção fúngica total(%)	Infecção por <i>Aspergillus section Nigri</i>			Infecção fúngica total(%)	Infecção por <i>Aspergillus section Nigri</i>		
		Frequência (%)	Infecção (%)	Variação		Frequência (%)	Infecção (%)	Variação
Amarela (33)	73	94	61	0 - 100%	80	91	63	0 - 100%
Branca (2)	58	100	44	18% - 70%	40	50	5	0 - 10%
Roxa (5)	87	100	92	74% - 100%	92	100	86	40 - 100%

n = número de amostras

Nas amostras de casca de cebola provenientes do campo (23), a média de infecção fúngica total foi de 85 %, com 1.674 isolados. O fungo predominante nas amostras foi o gênero *Fusarium*, seguido de *Cladosporium*, *Penicillium*, grupo *dematiáceos*, *Aspergillus* section *Nigri*, *Botrytis*, *Talaromyces*, *Eurothium* e *Epicoccum* (Figura 18).

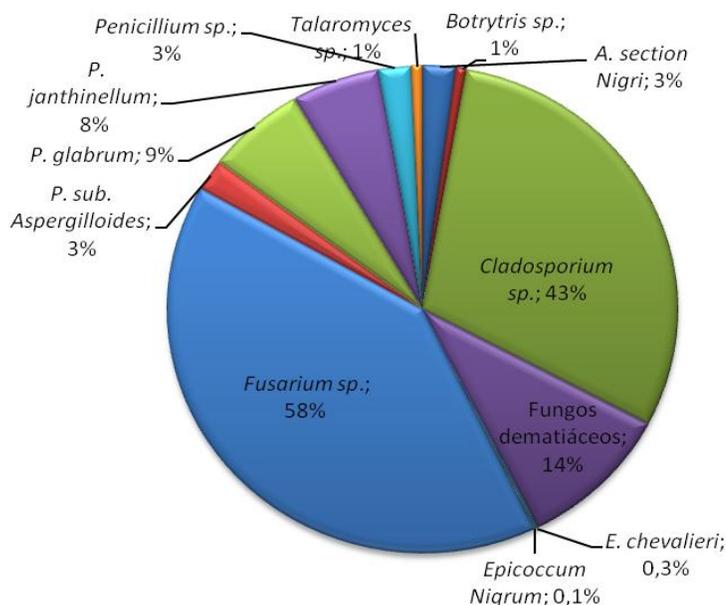


Figura 18. Porcentagem média de infecção fúngica da casca de cebola provenientes do campo.

Quando comparadas as amostras da casca de cebola da pós-colheita e campo, pode-se observar que houve predominância de *A. section Nigri* nas amostras da pós-colheita (Figura 19). Nas amostras de campo a predominância foi de *Fusarium*, *Cladosporium* e fungos dematiáceos, normalmente encontrados no ambiente.

É possível observar também, tanto nas amostras de pós-colheita quanto no campo, a infecção por *Penicillium*, responsável pela doença mofo verde. Nas

amostras de campo podemos observar maior infecção por *Fusarium* e *Cladosporium*, que é comum no solo e no ambiente.

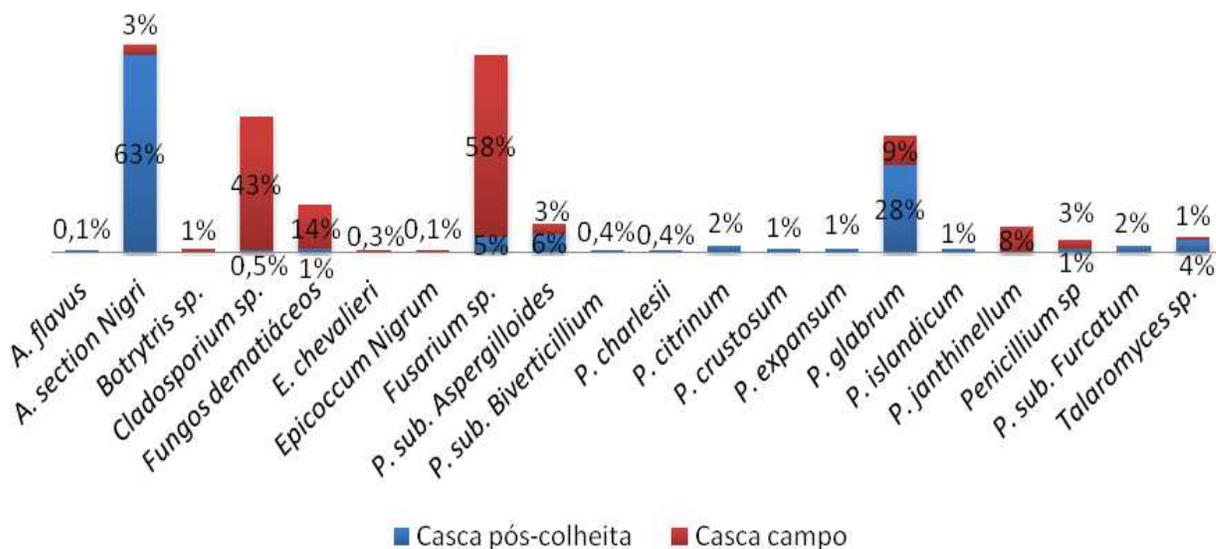


Figura 19. Porcentagem média de infecção fúngica de casca da cebola de pós-colheita e campo.

Quando comparados os isolados dos bulbos e cascas de cebola das diferentes nacionalidades (Tabela 7) podemos observar elevada infecção fúngica total e elevada infecção por *A. section Nigri*, exceto pela cebola proveniente da Holanda. Nas amostras produzidas no Brasil a infecção fúngica por *A. section Nigri* foi alta, maior que ao 60 %. Sendo assim, notamos que os *A. section Nigri* estiveram presentes em diversas regiões apesar das diferentes condições ambientais. Contudo, um número maior de amostras devem ser analisadas para a confirmação da distribuição destas espécies em cebolas de diferentes origens.

Tabela 7. Infecção fúngica total e pelos isolados de *A. section Nigri* nos bulbos e cascas de cebola de diferentes nacionalidades.

Origem (n)	Bulbo			Casca		
	Infecção fúngica total (%)	Infecção por <i>Aspergillus section Nigri</i>		Infecção fúngica total (%)	Infecção por <i>Aspergillus section Nigri</i>	
		Infecção (%)	Variação		Infecção (%)	Variação
São Paulo (16)	86	75	22 - 100%	92	80	16 - 100%
Santa Catarina (10)	73	67	0 - 100%	81	56	0 - 100%
Paraná (2)	94	93	86 - 100%	100	93	85 - 100%
Espanha (8)	61	53	14 - 100%	51	34	0 - 100%
Argentina (2)	39	32	30 - 34%	83	70	60 - 80%
Holanda (1)	76	-	-	75	-	-
Chile (1)	40	40	40%	70	95	95%

n = número de amostras

5.3.3 Contagem de bolores e leveduras nas amostras de solo

A média de contagem de bolores das amostras do solo foi de $3,3 \times 10^4$ UFC/g. A Tabela 8 apresenta as espécies fúngicas presentes.

A frequência de ocorrência de *A. section Nigri* em solo foi baixa, mas estas espécies estiveram presentes, indicando que pode ser uma das fontes de contaminação das cebolas. *A. section Nigri* estiveram presentes em 6 amostras de solo analisados. A média de contagem foi de 1×10^3 UFC/g.

Os gêneros mais frequentes no solo foram *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, grupo dos fungos *dematiáceos* e *Trichoderma*.

Tabela 8. Contagem de bolores e leveduras nas amostras de solo.

Amostras	Contagem de bolores e leveduras (UFC/g)										
	Infecção total	<i>Absidia corimbyfera</i>	<i>A. caelatus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. nomius</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>A. section Nigri</i>	<i>A. ustus</i>	<i>A. wentii</i>	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Fungos dematiáceos</i>
22	5,3x10 ³	-	-	-	-	-	-	-	-	1x10 ²	5,0x10 ²
25	6,9x10 ³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,0x10 ²
28	6,1x10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	5,0x10 ⁴	-
30	3,5x10 ⁴	-	6x10 ³	-	-	-	-	4x10 ³	4x10 ³	-	1,7x10 ⁴
32	3,6x10 ⁴	-	2x10 ³	-	-	1x10 ³	-	9x10 ³	-	-	6x10 ³
34	7,8x10 ³	-	-	-	-	-	3,6x10 ³	-	1x10 ²	-	3x10 ²
36	4,1x10 ⁴	-	1x10 ³	-	-	1x10 ³	8x10 ³	5x10 ³	3x10 ³	3x10 ³	3x10 ³
38	6,9x10 ³	-	1x10 ²	-	-	1x10 ²	5x10 ²	1,5x10 ³	-	-	1,0x10 ³
40	9,9x10 ⁴	-	1x10 ³	-	1x10 ³	-	6x10 ²	-	-	-	-
42	3,4x10 ⁴	3,0x10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	2,8x10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2x10 ³
46	4,6x10 ⁴	-	-	1x10 ³	-	-	6x10 ³	-	-	-	2,7x10 ⁴
48	3,2x10 ⁴	3x10 ³	-	-	-	-	2x10 ²	-	-	-	5x10 ³
50	6,6x10 ³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52	5,0x10 ³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54	2,9x10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	3x10 ³	4x10 ³
56	6,3x10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1x10 ³
58	5,8x10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	4x10 ³	7x10 ³
61	8,2x10 ⁴	-	-	5x10 ³	-	-	-	-	-	-	6,4x10 ⁴
Média	3,3x10⁴	2x10³	6x10²	6x10¹	6x10¹	1x10²	1x10³	1x10³	4x10²	3x10³	4,1x10³

- não detectado

Contagem de bolores e leveduras (UFC/g)											
Amostras	<i>Fusarium sp.</i>	<i>P. brevicompactum</i>	<i>P. glabrum</i>	<i>P. raistrickii</i>	<i>P. restrictum</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>P. sub. Biverticillium</i>	<i>A. terreus</i>	<i>T. purpurogenus</i>	<i>Talaromyces sp.</i>	<i>Trichoderma</i>
22	1x10 ²	-	-	1,4x10 ³	-	1,5x10 ³	-	-	-	-	1x10 ²
25	1x10 ²	-	4,8x10 ³	-	-	-	-	-	-	-	-
28	1x10 ³	-	-	-	-	-	-	3x10 ³	-	3x10 ³	-
30	4x10 ³	-	-	-	-	-	-	4x10 ³	-	-	-
32	6x10 ³	-	-	-	-	9x10 ³	-	-	-	-	6x10 ³
34	-	-	3,1x10 ³	-	-	-	-	-	-	-	1,2x10 ³
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	1,9x10 ³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,8x10 ³
40	-	-	-	-	-	6,4x10 ³	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4x10 ³
44	710 ³	-	-	-	7x10 ³	-	1,0x10 ⁴	-	-	-	2x10 ³
46	8x10 ³	-	-	-	-	-	-	-	4x10 ³	-	-
48	2,1x10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3x10 ³
50	4x10 ²	-	-	-	-	1x10 ²	-	-	-	-	6,0x10 ³
52	2,3x10 ³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,9x10 ³
54	9x10 ³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3x10 ⁴
56	1,7x10 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	2,4x10 ⁴	2,1x10 ⁴
58	-	-	-	-	-	1,0x10 ⁴	-	1,0x10 ⁴	-	1,5x10 ⁴	1,2x10 ⁴
61	-	6x10 ³	-	-	-	7x10 ³	-	-	-	-	-
Média	5x10³	3x10²	4,2x10²	7,4x10¹	4x10²	1,8x10³	5x10²	8,9x10²	2x10²	2x10³	4x10³

- não detectado

Pinotti e colaboradores (2011) estudaram solos provenientes de culturas de amora, framboesa e mirtilo no sul do Brasil, e obtiveram resultados semelhantes com o presente trabalho. A maior incidência de fungos encontrados foi do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, porém eles relataram a presença dos antagonistas *Clonostachys rosea* e *Trichoderma sp.* Também Borges *et al.* (2011), estudaram a diversidade fúngica em solos de erva-mate no município de Campo Alegre/SC - Brasil e observou-se uma maior incidência do gênero de *Aspergillus* e *Penicillium*, porém foram observados os gêneros *Acremonium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Metarhizium*, *Gliocladium*, *Lecanicillium*, *Rhizopus*.

5.4 Caracterização morfológica dos *Aspergillus section Nigri*

As cepas selecionadas como *Aspergillus section Nigri* foram isoladas em meio CYA e MEA, por 7 dias a 25 °C (Figura 20) e em seguida foram avaliadas as características macro e microscópicas dos isolados. Para o auxílio na caracterização dos isolados foram utilizadas as chaves de classificação de Klich & Pitt, 1988, Pitt e Hocking (2009) e Samson *et al.* (2010).

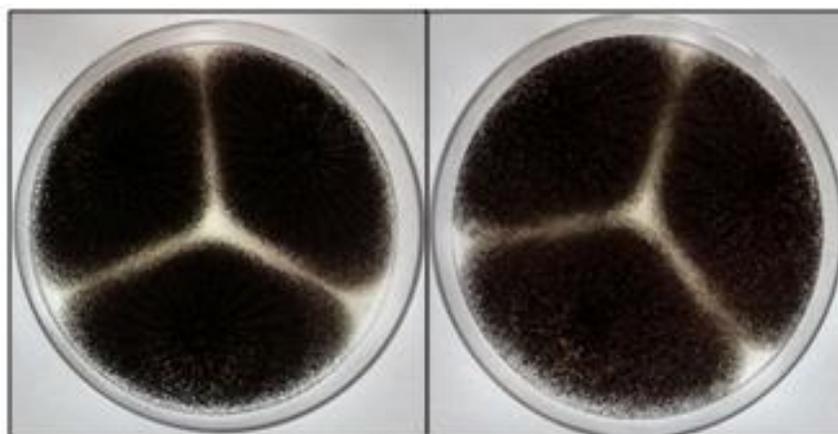


Figura 20. *Aspergillus section Nigri* em CYA a 25 °C por 7 dias.

As colônias selecionadas como *Aspergillus* section *Nigri* foram colônias planas e aveludadas. Quando isoladas em meio CYA a 25 °C e 37 °C por 7 dias, apresentaram diâmetro de 60 mm. Não houve crescimento em meio CYA a 5 °C, e em MEA a 25 °C estas apresentaram diâmetro de 40 mm. Em meio CREA houve produção de ácido, o meio passou de roxo para amarelo (Figura 21). Estes resultados foram semelhantes com a descrição de Pitt; Hocking (2009) e Samson *et al.* (2007) para *Aspergillus niger*.

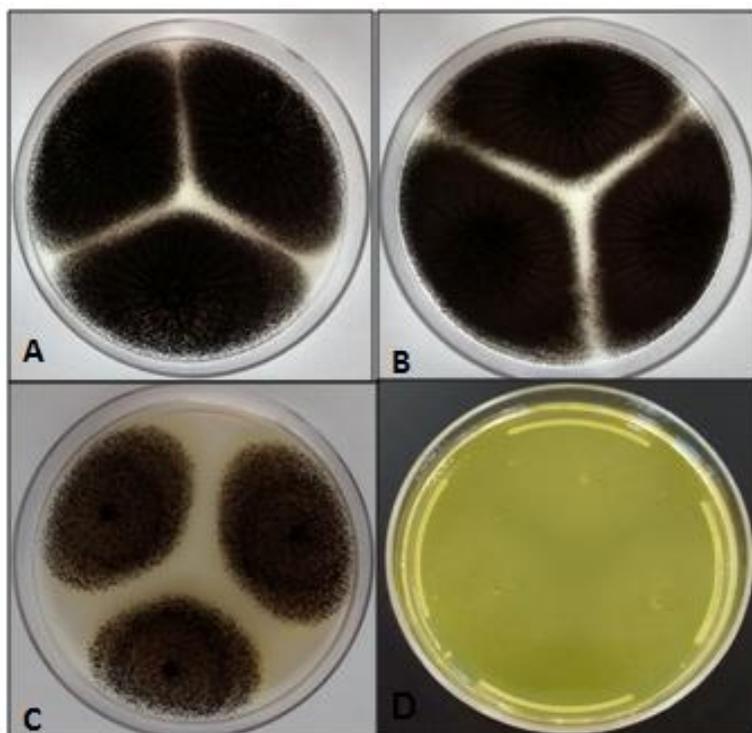


Figura 21. *Aspergillus* section *Nigri* em A: CYA a 25 °C; B: CYA a 37°C; C: MEA a 25 °C; D: CREA a 25°C.

Após a identificação macroscópica, foram avaliadas as características dos isolados em microscópio óptico (aumento de 400 e 1000x). Os isolados apresentaram-se bisseriados, de diâmetro 144,3 µm (vesícula, métula e fiálide), conidióforo com paredes lisas, conídios esféricos e rugosos com diâmetro de 5,4 µm (Figura 22). Todos os *Aspergillus* negros da cebola (bulbo e casca) e do solo,

apresentaram características que os enquadra dentro do grupo dos *Aspergillus* section *Nigri*.

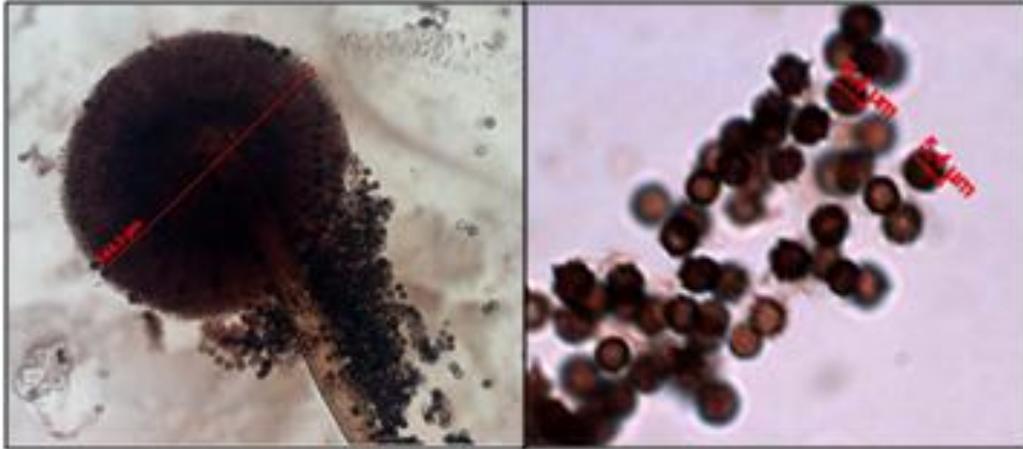


Figura 22. A. section *Nigri* (A: 400x e B: 1000x).

Representantes deste grupo foram encaminhados para Laboratórios de pesquisa parceiros, para a realização da análise molecular e sequenciamento de DNA e definição da identidade das espécies. As mesmas cepas serão analisadas quanto à produção de metabólitos químicos, que auxiliarão na confirmação da identidade das espécies.

Os *Aspergillus* section *Nigri* estão presentes em vários alimentos, principalmente aqueles expostos ao sol, e são comumente encontrados no solo. São frequentemente isolados de ambientes quentes e seus esporos são resistentes à radiação. *Aspergillus niger* pode crescer em ampla faixa de temperatura, atividade de água e pH (SCHUSTER *et al.*, 2002; PITT; HOCKING, 2009; SAMSON *et al.*, 2010). Sendo assim, a cebola é um alimento muito propício para o crescimento desta espécie, e quando estocado de maneira inadequada, com elevada umidade de água e temperatura há o favorecimento destes *Aspergillus* se desenvolverem, reproduzirem e produzirem micotoxinas.

5.5 Avaliação do potencial de produção de ocratoxina A pelos *Aspergillus section Nigri* isolados

As cepas selecionadas como *A. section Nigri* foram testadas quanto ao potencial de produção de ocratoxina A, avaliadas pela técnica de Cromatografia de Camada Delgada, como mostra a Figura 23.

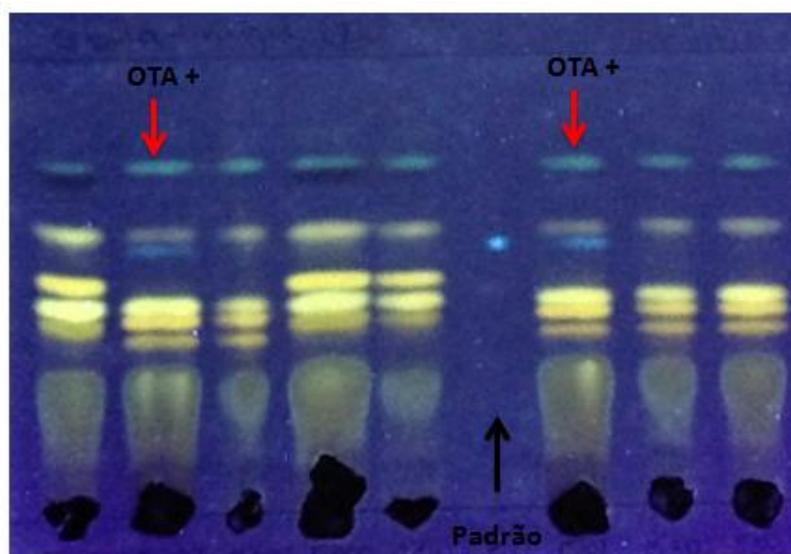


Figura 23. Produção de ocratoxina A pelos isolados de *A. section Nigri*.

Dentre as amostras de bulbos de cebola de pós colheita foram isoladas 1.306 cepas de *A. section nigri* e somente 1 % (11 isolados) foi capaz de produzir ocratoxina A. Somente um isolado de cebola roxa foi capaz de produzir ocratoxina A. Todos os demais (10) produtores foram isolados de cebola amarela. Já nas amostras do campo foram isoladas 31 cepas de *A. section Nigri*, e 10 (32 %) foram capazes de produzir ocratoxina A.

Das cascas das amostras de pós-colheita foram isolados 934 *A. section nigri* e 23 cepas (2 %) de cebola amarela foram capazes de produzir ocratoxina A.

Dentre as amostras de casca de cebola de campo, 40 isolados de *A. section nigri*, apenas 5 % apresentou a capacidade para a produção de ocratoxina A.

Os resultados provenientes das amostras de campo podem ser correlacionados com os estudos de Frisvad e colaboradores (2011) que verificaram a capacidade de cepas de *Aspergillus niger* utilizadas ou não em processos industriais para produzir ocratoxina A. Neste trabalho foi observado que 33 % das cepas industriais e 7 % das cepas não industriais foram capazes de produzir ocratoxina A. No presente trabalho podemos observar que 32% dos isolados de *A. section Nigri* foram capazes de produzir OTA. Já Chiotta *et al.* (2011), estudaram a capacidade de *Aspegillus* negros isolados de uvas da Argentina produzirem ocratoxina A, e constataram que 14 % das cepas isoladas e identificadas como *A. niger* foram capazes de produzir ocratoxina A.

5.6 Otimização da análise de ocratoxina A na cebola

No teste de recuperação da ocratoxina A em cebolas, as médias obtidas foram 82 %; 80,1 % e 80,9 % para os três níveis testados, ou seja, 0,3; 2,5 e 12 µg/kg respectivamente, conforme mostra a Tabela 9. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do método foram de 0,1 µg/kg e 0,3 µg/kg, respectivamente. A Figura 24 apresenta a curva padrão de ocratoxina A.

O método utilizado para detecção da ocratoxina A em cebola foi eficiente, mostrando que houve pouca perda do analito durante o processo de extração e limpeza da amostra. Apresentou exatidão, atribuída pelos resultados de recuperação. De acordo com o Regulamento (CE) N° 401/2006 da Comissão da União Européia, que estabelece os valores de contaminação e os valores de recuperação aceitos, mostra que os resultados apresentados de recuperação estão satisfatórios, com valores entre 70 a 110 % para os níveis maiores que 1,0 µg/kg e entre 50 a 120 % para os níveis menores que 1,0 µg/kg. Além disso, os

valores de coeficiente de variação foram baixos: 10,4; 9,2 e 2,98 % para os níveis de 0,3; 2,5 e 12 µg/kg, respectivamente. Estes valores encontram-se abaixo dos limites de coeficiente de variação relatados por Horwitz et al. (1980) e Schuller et al. (1976), de 32 % e 40 %, respectivamente, para análises de micotoxinas, cujos resultados encontram-se na ordem de ppb (10⁻⁹) ou µg/kg.

Desta maneira é possível observar que a metodologia descrita por Vargas et al. (2005) foi eficiente para a extração de ocratoxina A em bulbos de cebola.

Tabela 9. Valores de recuperação de OTA em bulbos de cebola.

Ocratoxina A (µg/kg)	Repetições	OTA (µg/kg)	Recuperação (%)
0,3	1	0,26	72,7
	2	0,30	83,4
	3	0,32	89,6
	Média	0,29	82
	Coeficiente de Variação	10,4	-
2,5	1	1,85	71,9
	2	2,12	82,2
	3	2,22	86,2
	Média	2,06	80,1
	Coeficiente de Variação	9,2	-
12	1	10,08	74,0
	2	10,65	86,4
	3	10,57	82,1
	Média	10,43	80,9
	Coeficiente de Variação	2,98	-

Dentre as 63 amostras de bulbo de cebola analisadas, nenhuma apresentou contaminação por ocratoxina A. Estes resultados corroboram com Gherbawy *et al.* (2015) que analisaram quarenta amostras de cebola provenientes de diferentes mercados na cidade de Taif da Arábia Saudita, e não identificaram a presença de ocratoxina A.

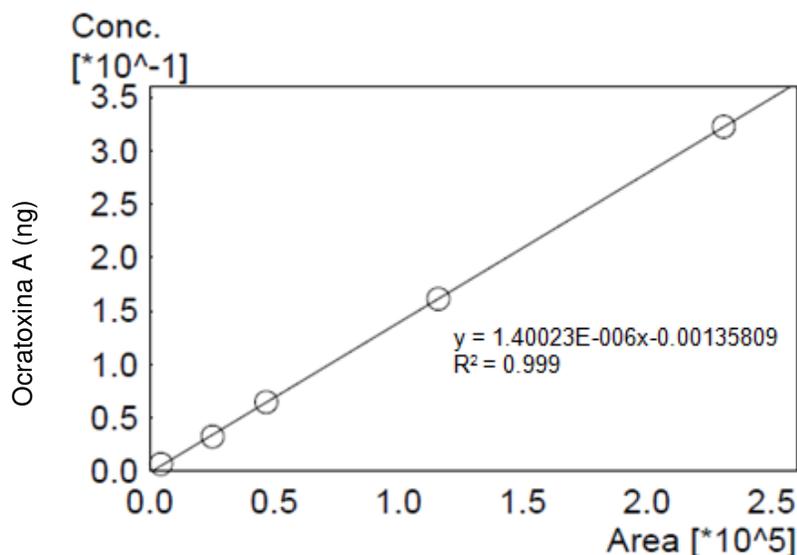


Figura 24. Curva padrão de ocratoxina A.

5.7 Análise de fumonisina B₂ pelos isolados de *Aspergillus section Nigri*

Para o teste de detecção de produção de FB₂ pelos isolados, foi testado um total de 320 cepas de *A. section Nigri*. A Tabela 10 apresenta a produção de FB₂ de todas as cepas de *A. section Nigri* isoladas de bulbos de cebola e solo.

Dentre as cepas de *Aspergillus section Nigri* provenientes do bulbo de cebola da pós-colheita, campo e solo foram testados 261, 26 e 33 isolados, respectivamente, destes 52,5 %, 85 % e 33 % foram produtoras de FB₂. Considerando o total de cepas testadas (320), 53 % foram produtores de FB₂, e os níveis de produção variaram de 0,23 a 3,23 µg/g (ppm).

Os resultados das cepas testadas de *A. section Nigri* provenientes dos bulbos de cebola do campo, 85 % das cepas foram produtoras de FB₂ e são similares com os estudos realizados por Frisvad *et al.* (2011). Estes autores relataram que 81% das cepas de *A. niger* de uso industrial foram capazes de produzir FB₂. Segundo Mogensen e colaboradores (2010) apontaram que 77 % das cepas de *A. niger* isoladas de uvas e uvas passas foram capazes de produzir FB₂. Susca *et al.* (2014) analisaram amostras de grãos de milho dos Estados Unidos e da Itália e obtiveram um percentual de 72 % das cepas isoladas de *A. niger* capazes de produzir FB₂.

A Figura 25 apresenta a curva padrão de FB₂ utilizada para a quantificação de produção de fumonisina B₂ pelos isolados, obtida através das diluições do padrão de FB₂.

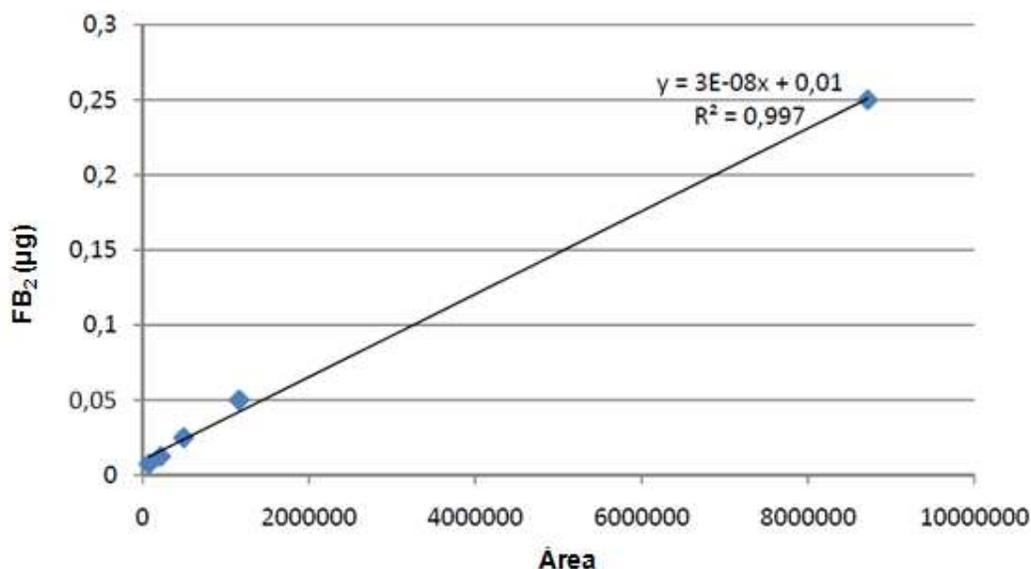


Figura 25. Curva padrão de fumonisina B₂.

Tabela 10. Produção de FB₂ pelas cepas de *A. section Nigri* isoladas dos bulbos de cebola da pós-colheita, campo^(c) e solo^(s).

N° ITAL	FB ₂ (µg/g)	N° ITAL	FB ₂ (µg/g)	N° ITAL	FB ₂ (µg/g)	N° ITAL	FB ₂ (µg/g)	N° ITAL	FB ₂ (µg/g)						
15.003	0,79	15.406	0,53	15.773	0,25	16.181	0,36	16.527 ^(c)	2,29	16.870 ^(s)	1,20	17.234	0,45	17.486	-
15.005	-	15.409	0,29	15.830	-	16.188	-	16.528 ^(c)	0,48	16.871 ^(s)	-	17.237	-	17.490	-
15.007	0,59	15.446	0,40	15.837	0,34	16.192	-	16.530 ^(c)	0,49	16.872 ^(s)	-	17.241	0,53	17.492	-
15.014	-	15.459	0,50	15.842	-	16.249	0,38	16.531 ^(c)	1,22	16.873 ^(s)	-	17.244	0,47	17.504	-
15.016	0,60	15.461	-	15.850	-	16.251	-	16.532 ^(c)	0,96	16.874 ^(s)	-	17.250	0,55	17.506	1,19
15.020	-	15.464	0,89	15.851	0,84	16.256	0,68	16.538 ^(c)	0,24	16.875 ^(s)	-	17.255	0,80	17.513	-
15.093	0,36	15.465	1,24	15.859	1,33	16.260	0,30	16.539 ^(c)	0,53	16.881 ^(s)	1,96	17.263	1,48	17.519	0,52
15.094	-	15.470	0,53	15.864	1,21	16.265	0,40	16.544 ^(c)	-	16.882 ^(s)	-	17.278	1,15	17.525	-
15.128	0,93	15.473	0,25	15.866	-	16.270	0,17	16.545 ^(c)	0,25	16.926	-	17.284	-	17.528	-
15.129	0,57	15.477	-	15.929	0,88	16.278	-	16.547 ^(c)	-	16.930	0,45	17.288	2,07	17.533	0,50
15.136	-	15.486	-	15.931	0,46	16.285	1,09	16.548 ^(c)	0,45	16.938	-	17.294	-	17.548	-
15.138	-	15.539	-	15.932	0,77	16.290	1,17	16.595 ^(c)	-	16.940	-	17.298	-	17.551	-
15.144	-	15.544	0,38	15.934	-	16.297	0,29	16.618 ^(c)	1,50	16.943	0,80	17.304	-	17.562	0,32
15.146	-	15.548	0,72	15.935	-	16.350	-	16.619 ^(c)	0,53	16.945	0,34	17.321	-	17.566	0,77
15.153	1,61	15.559	0,30	15.936	-	16.352	1,23	16.658 ^(c)	-	16.956	-	17.325	-	17.570	0,55
15.154	0,25	15.563	-	15.940	-	16.357	-	16.769 ^(s)	0,63	16.961	-	17.332	0,64	17.574	-
15.160	3,23	15.564	-	15.941	-	16.360	-	16.770 ^(s)	-	16.967	0,54	17.348	-	17.581	1,14
15.181	0,86	15.567	0,84	15.943	-	16.368	-	16.783 ^(s)	-	16.971	0,52	17.350	-	17.605	-
15.234	0,22	15.579	0,71	15.951	-	16.371	0,82	16.784 ^(s)	0,28	16.993	0,35	17.354	-	17.611	0,43
15.236	-	15.580	-	15.956	0,48	16.398	-	16.785 ^(s)	-	17.068	0,50	17.360	-	17.616	-

- não detectado

N° ITAL	FB ₂ (µg/g)	N° ITAL	FB ₂ (µg/g)	N° ITAL	FB ₂ (µg/g)	N° ITAL	FB ₂ (µg/g)	N° ITAL	FB ₂ (µg/g)	N° ITAL	FB ₂ (µg/g)	N° ITAL	FB ₂ (µg/g)	N° ITAL	FB ₂ (µg/g)
15.238	0,70	15.634	-	15.970	0,33	16.404	-	16.786 ^(s)	-	17.088	0,85	17.368	-	17.620	-
15.245	1,90	15.636	-	15.974	0,23	16.411	-	16.787 ^(s)	-	17.095	-	17.372	-	17.626	-
15.246	0,38	15.639	0,88	15.981	0,34	16.418	-	16.795 ^(s)	-	17.098	-	17.376	1,12	17.631	0,59
15.250	0,45	15.646	-	15.986	-	16.421	-	16.796 ^(s)	0,99	17.104	0,34	17.380	-	17.636	0,19
15.252	-	15.648	-	15.989	-	16.427	1,12	16.797 ^(s)	0,30	17.112	-	17.388	1,16	17.642	-
15.253	1,22	15.650	1,33	16.041	2,37	16.431	-	16.798 ^(s)	0,96	17.116	-	17.393	-	17.645	-
15.255	1,05	15.682	-	16.046	0,52	16.432	1,26	16.800 ^(s)	-	17.121	0,59	17.400	-	17.669	0,96
15.263	-	15.688	0,66	16.050	0,61	16.434	0,79	16.812 ^(s)	-	17.125	0,65	17.405	-	17.677	-
15.274	1,08	15.697	-	16.061	1,25	16.440	1,05	16.821 ^(s)	-	17.135	1,36	17.418	-	17.683	0,77
15.281	0,98	15.698	0,22	16.064	-	16.500 ^(c)	0,37	16.823 ^(s)	-	17.136	0,42	17.426	-	17.689	-
15.307	-	15.700	0,52	16.075	0,90	16.501 ^(c)	0,38	16.860 ^(s)	-	17.159	0,34	17.433	-	17.692	-
15.328	2,36	15.703	1,65	16.081	0,27	16.502 ^(c)	0,47	16.861 ^(s)	0,36	17.164	0,32	17.437	-	17.698	0,34
15.336	-	15.704	-	16.088	0,34	16.509 ^(c)	0,72	16.862 ^(s)	-	17.168	0,29	17.444	-	17.707	0,28
15.340	0,95	15.738	0,84	16.143	-	16.510 ^(c)	0,28	16.863 ^(s)	-	17.172	0,44	17.449	-	17.712	0,43
15.342	1,89	15740	0,29	16.148	-	16.511 ^(c)	0,52	16.864 ^(s)	-	17.176	0,60	17.455	-	17.713	1,12
15.345	1,03	15.748	-	16.156	0,32	16.512 ^(c)	1,21	16.865 ^(s)	-	17.180	0,26	17.459	-	17.722	0,37
15.348	-	15.758	0,24	16.158	-	16.513 ^(c)	1,32	16.866 ^(s)	1,79	17.184	0,87	17.460	-	17.741	-
15.399	0,71	15.759	-	16.162	-	16.514 ^(c)	1,04	16.867 ^(s)	1,73	17.193	0,49	17.468	-	17.749	0,48
15.401	1,30	15.766	-	16.169	-	16.515 ^(c)	0,58	16.868 ^(s)	-	17.199	0,49	17.470	-	17.753	-
15.403	0,34	15.772	0,96	16.177	-	16.522 ^(c)	1,40	16.869 ^(s)	0,49	17.207	0,52	17.484	-	17.759	0,41

- não detectado

5.8 Otimização da metodologia de quantificação de fumonisina B₂ em cebola

No teste de recuperação de FB₂ em cebolas, as médias obtidas foram 80,8 % e 74,3 % para os dois níveis testados 0,25 e 0,50 µg/g, respectivamente, (Tabela 11). Os resultados do limite de detecção foi de 0,04 µg/g e de quantificação de 0,14 µg/g. A Figura 26 apresenta a curva padrão de FB₂.

Tabela 11. Valores de recuperação de fumonisina B₂ em bulbos de cebola.

Fumonisin B₂ (µg/g)	Repetições	FB₂ (µg/g)	Recuperação (%)
0,25	1	0,199	79,6%
	2	0,201	80,4%
	3	0,206	82,4%
	Média	0,202	80,8%
	Coefficiente de Variação	1,8	-
0,50	1	0,352	70,4%
	2	0,358	71,6%
	3	0,404	80,9%
	Média	0,371	74,3%
	Coefficiente de Variação	7,7	-

De acordo com o Regulamento (CE) N° 401/2006 da Comissão da União Europeia, que estabelece os valores de contaminação e os valores de recuperação aceites, mostra que os resultados apresentados de recuperação

estão satisfatórios, com valores entre 60 a 120 % para os níveis menores ou iguais a 0,5 µg/g, e entre 70 a 110 % para os níveis maiores que 0,5 µg/g. Além disso, os valores de coeficiente de variação foram baixos 1,8 e 7,7 % para os níveis de 0,25 e 0,5 µg/g, respectivamente. Estes valores encontram-se abaixo dos limites de coeficiente de variação relatados por Horwitz et al. (1980), de 16 % para análises de micotoxinas, cujos resultados encontram-se na ordem de ppm (10^{-6}) ou µg/g.

Não foi observada a presença de FB₂ nas amostras de bulbos de cebola, portanto este resultado difere dos descritos por Gherbawy e colaboradores (2015), que analisaram 40 amostras de cebola provenientes de mercados da cidade de Taif da Arábia Saudita e detectaram a presença de fumonisina B₂ em 15 amostras (37,5 %).

Varga *et al.* (2012) estudaram 6 amostras de bulbos de cebola adquiridas em mercados da Hungria, que já apresentavam estar visivelmente contaminadas por fungos, e em duas amostras foram detectadas a contaminação por fumonisina B₂, B₃ e B₄.

6. CONCLUSÕES

Dentre o total de amostras analisadas de cebola foi possível observar elevada infecção fúngica neste produto e uma grande diversidade de fungos presentes.

Quando analisadas a microbiota presente nas amostras de cebola de pós-colheita, pode-se observar a predominância foi de *A. section Nigri* e estes podem ser considerados os principais contaminantes em bulbos de cebola em amostras prontas para consumo.

Já nas amostras de campo os gêneros mais comuns foram *Fusarium*, *Clasdosporium* e fungos *dematiáceos*. Contudo os *Aspergillus section Nigri* também estiveram presentes, porém em menor grau de infecção.

Em relação as amostras de solo, foi observada diversificada variedade fúngica, e os gêneros de maior incidência foram *Aspergillus* e *Penicillium*. Foi verificada a presença de *A. section Nigri*, que pode ser considerada a possível fonte de contaminação das cebolas, uma vez que os bulbos e casca estão em contato direto com o solo.

Os isolados de *Aspergillus section Nigri*, macro e microscopicamente foram similares aos *Aspergillus niger*, sendo necessário confirmar sua identidade através de análises moleculares e metabólitos.

Os valores de atividade de água das amostras de campo foram relativamente maiores quando comparados com as amostras da pós-colheita por estarem presentes no solo e ainda não submetidos à etapa de cura, transporte, estocagem e comercialização.

Em relação à produção de toxinas pelas cepas, nas amostras de pós-colheita, a produção de ocratoxina A pelos isolados foi baixa, ao redor de 1 a 2 %, mostrando que os *Aspergillus section Nigri* isolados da cebola, nesta fase de produção, mesmo em estando presentes em alta infecção, a maioria dos isolados apresentou baixo potencial para a produção desta micotoxina. Já nas amostras de campo esta porcentagem foi maior, 32 % no bulbo e 5 % na casca.

Quando avaliadas a produção de fumonisina B₂ pelas cepas, 53 % do total de isolados foram capazes de produzir FB₂, mostrando um potencial maior dos isolados de *Aspergillus section Nigri* em produzir esta micotoxina do que a ocratoxina A.

Apesar dos fungos isolados da cebola apresentarem a capacidade de produzir micotoxinas em meio de cultura, quando realizado os testes nas amostras do bulbo não foi observada a presença destes contaminantes. Possivelmente a cebola não foi um bom substrato para a produção de micotoxinas neste alimento.

Neste trabalho ainda inédito no Brasil, foi possível evidenciar a alta contaminação de cebolas por *Aspergillus section Nigri* e a presença de espécies produtoras de fumonisina B₂ e ocratoxina A. Contudo a presença destes contaminantes não foi confirmada na cebola. O conhecimento da identidade das espécies fúngicas e de seu potencial para produzir micotoxinas possibilita prever e/ou completar as informações sobre a qualidade final do alimento.

Mais estudos são necessários visando analisar maior número de amostras, variando entre diferentes tipos, variedades e origem da cebola, hortaliça mundialmente consumida e utilizada no preparo de alimentos.

A constatação do problema de fungos toxigênicos em alguns alimentos tem sido evidenciada por pesquisas realizadas em vários países. Cabe cada país estabelecer medidas que garantam o controle da qualidade sanitário desses produtos consumidos por sua população. Uma vez detectado o problema, há necessidade de se estabelecer uma legislação pertinente, com limites seguros de ingestão de cada micotoxina no produto e garantir a realização de um monitoramento eficiente dos níveis destes contaminantes.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foi possível avaliar a contaminação fúngica da cebola e identificar as principais espécies presentes.

Aspergillus section *Nigri* foi confirmado como o principal contaminante da cebola nas amostras de mercado, prontas para consumo, e alguns isolados foram capazes de produzir principalmente fumonisina B₂, mas também ocratoxina A. Contudo estas duas micotoxinas não foram detectadas nas cebolas, indicando que este não é um substrato que favorece a produção destas toxinas por estas espécies, porém pode ser importantes como patógenos vegetais.

Os isolados de *Aspergillus* section *Nigri* estão sendo identificados através de análise molecular e metabólitos em parceria com a Universidade Estadual de Londrina (UEL) e da Universidade Técnica da Dinamarca – DTU. As análises moleculares já foram iniciadas e os resultados primários mostraram que os *Aspergillus* section *Nigri* isolados da cebola neste estudo podem ser identificados como *A. niger* / *A. welwitschiae*. Estes resultados complementarão este trabalho de dissertação e serão disponibilizados nos artigos científicos que serão publicados.

Para estudos futuros é considerada relevante a realização de algumas atividades para a complementação do presente trabalho: i) Analisar amostras de cebola do campo de outras regiões, que apresentem diferentes condições climatológicas e correlacionar com os resultados obtidos; ii) estudar um número maior de amostras de cebola de coloração branca e roxa para obtenção de mais dados e resultados conclusivos sobre a infecção de *A. section Nigri* nestas amostras; iii) avaliar a forma de infecção de *Aspergillus* section *Nigri* na cebola, contaminando a hortaliça com estas espécies toxigênicas e verificando o grau e forma de contaminação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLA, G.; CABAÑES, F. J. *Ochratoxin A production by strains of Aspergillus niger var. niger*. Applied and Environmental Microbiology, v. 60, p. 2650-2652, 1994.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº7 de 18 de fevereiro de 2011. *Diário Oficial da União*. n. 37, seção 1, 22 de fevereiro de 2011.

BARKAI-GOLAN, R. *Aspergillus Mycotoxins*. Chapter 6. Mycotoxins in Fruits and Vegetables. Nachman Paster, 2011.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. *Mycotoxins*. Clin. Microbiol. Rev. v. 16, n. 3, p. 497–516, 2003.

BINDER, E.M.; TAN, L.M.; CHIN, L.J.; HANDL, J.; RICHARD, J. *Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients*. Animal Feed Science and Technology, v. 137, p. 265–282, 2007.

BISBAL F.; GIL, J.V.; RAMÓN, D.; MARTÍNEZ-CULEBRAS, P.V. *ITS-RFLP characterization of black Aspergillus isolates responsible for ochratoxin A contamination in cocoa beans*. Eur Food Res Technol.v. 229, p.751–755, 2009.

BORGES, L.R.; LAZZARI, S.M.N.; PIMENTEL, I.C.; VILA NOVA, M.X. *Diversidade de fungos filamentosos em solo de monocultivo de erva-mate, Ilex paraguariensis St. Hil.* Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient., v. 9, n. 2, p. 185-194, 2011.

BOUDRA, H.; LE BARS, P. AND LE BARS, J. *Thermostability of Ochratoxin A in Wheat under Two Moisture Conditions*. Applied And Environmental Microbiology, p. 1156–1158, 1995.

CHIOTTA, M.L.; SUSCA, A., STEA, G.; MULÈ, G.; PERRONE, G.; LOGRIECO, A.; CHULZE, S.N. *Phylogenetic characterization and ochratoxin A – Fumonisin profile of black Aspergillus isolated from grapes in Argentina*. International Journal of Food Microbiology, v. 149, p. 171-176, 2011.

COPETTI, M.V.; PEREIRA, J.L.; IAMANAKA, B.T.; PITT, J.I.; TANIWAKI, M.H. *Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing*. International Journal of Food Microbiology, v.143, p. 67–70, 2010.

CREPPY, E.E. Human *ochratoxicosis*. J. Toxicol. Toxin Reviews, v. 18, p. 277 - 293, 1999.

DASKAYA-DIKMEN, C.; HEPERKAN, D. Review Article: *Fumonisin production of black Aspergilli in vitro, fumonisin and ochratoxin A production in figs of positive strains and their growth assessment.*, v. 32, n. 1 , p. 10-17, 2013.

DESJARDINS, A. E. *Fusarium mycotoxins: chemistry, genetics and biology*. Minnesota: APS Press, p. 260, 2006.

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO. *Resolução - Rdc Nº 59, De 26 De Dezembro De 2013*. Nº 252.

DURAND, N.; EL SHEIKHA, A.F.; SUAREZ-QUIROS, M. L.; OSCAR, G.R.; NGANOU, N. D.; FONTANA-TACHON, A.; MONTET, D. *Application of PCR-DGGE to the study of dynamics and biodiversity of yeasts and potentially OTA producing fungi during coffee processing*. Food Control, v.34, p. 466 - 471, 2013.

EMBRAPA, 2015. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Cebola/CultivoCebolaNordeste/colheita.htm>. Acesso: 03 de Junho de 2015.

EMBRAPA HORTALIÇAS, 2015. Disponível em: http://www.cnph.embrapa.br/paginas/sistemas_producao/cultivo_da_cebola/plantio.htm. Acesso: 03 de Junho de 2015.

EMBRAPA HORTALIÇAS, 2015. Disponível em: http://www.cnph.embrapa.br/paginas/sistemas_producao/cultivo_da_cebola/doencas.htm. Acesso: 08 de Junho de 2015.

EMBRAPA SEMI - ÁRIDO. *Sistemas de Produção*, 3. 2007. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Cebola/CultivoCebolaNordeste/botanica.htm>. Acesso: 01 de Dezembro 2014.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). *Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to ochratoxin A (OTA) in food*. Adopted on 4 April 2006. The EFSA Journal, v. 365, p. 1-56, 2006.

FERREIRA, M.D. *Cultura da Cebola – Recomendações Técnicas*. Asgrow Vegetables Seeds – SVS do Brasil Sementes Ltda, Campinas-SP. 2000. 36p.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J.C.; SVENDENSEN, J.A.; *Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures*. Applied and Environmental Microbiology, v.45, p. 81-85, 1983.

FLORES-FLORES, M. E.; LIZARRAGA, E., CERAIN, A. L., GONZÁLEZ-PEÑAS, E. *Presence of mycotoxins in animal milk: A review*. Food Control, v. 53, p. 163-176, 2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO), 2013. Disponível em: http://www.fao.org/nr/water/cropinfo_onions.html. Acesso: 29 de Novembro 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO), 2003. Disponível em: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/inpho/docs/Post_Harvest_Compendium_-_Onion.pdf. Acesso: 29 de Novembro 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO), 2003. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i4601e.pdf>. Acesso: 23 de Julho 2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO) / WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Safety evaluation of certain mycotoxins in food*. FAO Food and Nutrition Paper 74 / Who Food Additives Series 47, prepared by the fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), Rome. 2001.

FRISVAD, J.C.; LARSEN, T.O.; THRANE, U.; MEIJER, M.; VARGA, J.; SAMSON, R.A.; NIELSEN, K. *Fumonisin and Ochratoxin production in industrial Aspergillus niger strain*. Plos One, v. 6, n. 8, p. 1-5, 2011.

FRISVAD, J. C.; MICK FRANK, J.; HOUBRAKEN, J. A. M. P.; KUIJPERS, A. F. A. AND SAMSON, R. A. *New ochratoxin A producing species of Aspergillus section Circumdati*. Studies In Mycology, v. 50, p. 23–43, 2004.

FRISVAD, J.C.; SMEDSGAARD, J.; SAMSON, R.A.; LARSEN, T.O.; THRANE, U. *Fumonisin B₂ production by Aspergillus niger*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 55, p. 9727-9732, 2007.

GELDERBLOM, W. C. A.; JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W. F. O.; THIEL, P. G.; HORAK, R. M.; VLEGGAR, R. *Fumonisinins - novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by Fusarium moniliforme*. Applied Environmental Microbiology, v. 54, p.1806 e 1811, 1988.

GHERBAWY, Y.; ELHARIRY, H.; KOCSUBE, S.; BAHOBIAL, A.; EL DEEB, B.; ALTALHI, A.; VARGA, J. AND VAGVOLGYI, C. *Molecular Characterization of Black Aspergillus Species from Onion and Their Potential for Ochratoxin A and Fumonisin B₂ Production*. Foodborne Pathogens And Disease, v. 12, n. 5, 2015.

GUTLEB, A.C.; MORRISON, E.; MURK, A.J. *Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by Fusarium strains: a review*. Environ. Toxicol. Pharmacol., v. 11, p. 309 - 320, 2002.

HOCKING, A.D.; LEONG, S.L.L.; KAZI, B.A.; EMMETT, R.W.; SCOTT, E.S. *Fungi and mycotoxins in vineyards and grape products*. International Journal of Food Microbiology, v. 119, p. 84–88, 2007.

HORTAS, 2015. Disponível em: <http://hortas.info/como-plantar-cebola>. Acesso: 03 de Junho de 2015.

HORWITZ, W.; KAMPS, L.R.; BOYER, K.W. *Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents*. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, Baltimore, v.63, n.6, p.1344 -1354, 1980.

HUSSEIN, S.H., BRASELL, J.M. *Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals*. Toxicology, v.167, n.2, p.101-134, 2001.

IAMANAKA, B.T.; OLIVEIRA, I.S.; TANIWAKI, M.H. *Micotoxinas em alimentos*. In: Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica. Recife: Comunigraf, p. 368, 2010.

IAMANAKA, B.T.; TANIWAKI, M.H.; MENEZES, H.C.; VICENTE, E.; FUNGARO, M.H.P. *Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil*. Food Additives & Contaminants, v. 22, n.12, p.1258-1263, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), 2013. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/>. Acesso: 6 junho de 2013.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). *Ochratoxin A*. In: Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human: Some Naturally Occurring Substances; Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic amines and mycotoxins, v. 56. IARC, Lyon, France, p. 489–521, 1993.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). *Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene a styrene*. In: IARC Monographs on the evaluationof carcinogenic risks to humans. Lyon, France, v. 82, p.171 - 300, 2002.

JORNAL A COMARCA. Edição 387, p.6, 2012. Disponível em: <http://www.acomarca.com/pub/jornalacomarca/index.jsp?ipg=98200>. Acesso: 8 de Junho de 2015.

JORNAL OFICIAL DA UNIÃO EUROPEIA. Regulamento (Ce) N. 401/2006 da Comissão. 23pags, 2006.

JURJEVIC, Ž.; PETERSON, S. W.; STEA, G.; SOLFRIZZO, M.; VARGA, J.; UBKA, V.; PERRONE, G. Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from indoor air. International Mycological Association, IMA Fungus, v. 3, n. 2, p. 159–173, 2012.

KAMAL, N.; SAXENA, A.; STEINER, R. L. AND CRAMER, C. S. *Screening of New Mexico Autumn-sown Onions for Black Mold Disease*. HortTechnologyvol, v.22, n. 57, p.19-72, 2012.

KEITH, L.H.; CRUMMETT, W.; DEEGAN J.; LIBBY, R.A.; TAYLOR, J.K.; WENTLER, G. Principles of environmental analysis. Analytical Chemistry, Washington, v.55, p.2210-2218, 1983.

KLICH, M. A. *Identification of Common Aspergillus species*. Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelauteurs, p. 116, 2002.

KLICH, M. A. *Identification of Common Aspergillus Species*. Amsterdam: Centraalbureau voor Schimmelauteurs, Netherlands: Ponsen e Looijen. United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Southern Regional Research Center New Orleans, Louisiana USA, p. 116, 2002b.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. *A Laboratory Guide to Common Aspergillus Species and their Teleomorphs*, Australia: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization - Division of Food Processing, p. 116, 1988.

KOZAKIEWICZ, Z. *Aspergillus species on stored products*. Washington: CABI. Mycological Papers, p.161-188, 1989.

LEITE, D. L. *Produção de Sementes de Cebola*. Embrapa Clima Temperado. Circular Técnica, 142, p. 9, 2014.

LOGRIECO, A.F.; FERRACANE, R.; COZZI, G.; HAIDUKOWSKY M.; SUSCA, A.; MULÈ, G.; RITIENI, A. *Fumonisin B2 by Aspergillus niger in the grape-wine chain: an additional potential mycotoxicological risk*. Ann Microbiol, v. 61, p.1-3, 2011.

LONG, G.L.; WINEFORDNER, J.D. Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. Analytical Chemistry, Washington, v.55, p. 712A-724A, 1983.

MARIN, S.; RAMOS, A.J.; CANO-SANCHO, G.; SANCHIS, V. *Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment*. Food and Chemical Toxicology, v. 60, p. 218-237, 2013.

MARROQUÍN-CARDONA, A.G.; JOHNSON, N.M., PHILLIPS, T.D.; HAYES, A.W. *Mycotoxins in a changing global environment – A review*. Food and Chemical Toxicology, v.69, p. 220-230, 2014.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). *Produção Integrada no Brasil, Agropecuária Sustentável Alimentos Seguros*. 2008/2009.

MOGENSEN, J. M.; FRISVAD, J. C.; THRANE, U. AND NIELSEN, K.F. *Production of Fumonisin B2 and B4 by Aspergillus niger on Grapes and Raisins*. J. Agric. Food Chem. v. 58, p. 954-958, 2010.

MURPHY, P.A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.; BRYANT, C.M. *Food Mycotoxins: An Update*. J. Food Scien. v.71, n.5, p.51-65, 2006.

NOGUEIRA, S.; OLIVEIRA, M.B.P.P. *Prevalência de ocratoxina A em alimentos e consequentes problemas de segurança alimentar*. Alimentação humana, v.12, n. 2, 2006.

NOONIM, P.; MAHAKARNCHANAKUL, W.; NIELSEN, K.F.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A.. *Fumonisin B2 production by Aspergillus niger in Thai coffee beans*. Food Additives & Contaminants: Part A, v. 26, n. 1, p. 94-100, 2009.

NOONIM, P.; MAHAKARNCHANAKUL, W.; VARGA, J.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. *Two new species of Aspergillus section Nigri from Thai coffee beans*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 58, p. 1727–1734, 2008.

ONION IPMPIPE DIAGNOSTIC POCKET SERIES, 2011. Disponível em: http://www.ncipmc.org/resources/onion/onion_cards_portuguese.pdf. Acesso em: 04 de Junho de 2015.

PERAICA, M.; RADIC, B.; LUCIC, A.; PAVLOVIC, M. *Toxic effects of mycotoxins in humans*. World Health Organ., v. 77, p. 754 - 766, 1999.

PERRONE, G. *et al. Biodiversity of Aspergillus species in some important agricultural products*. Studies in Micology. Utrecht, v. 59, n. 1, p. 53-66, Dec. 2007.

PINOTTI, M.M.Z.; SANTOS, J.C.P.; KLAUBERG FILHO, O.; MICHELLUTI, D.J.; CASTRO, D.R.L. *Isolamento de Fungos de Solo Associados a culturas de Amora, Framboesa e Mirtilo no sul do Brasil*. Rev. Bras. de Agroecologia, v. 6, n. 1, p.67-80, 2011.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. *Fungi and Food Spoilage*. Springer.3ª Edição, 2009, 471p.

PITT, J.I., SAMSON, R.A. *Nomenclatural considerations in naming species of Aspergillus and its teleomorphs*. Studies in Mycology, v. 59, p. 67-70, 2007.

RAPER, K. B.; FENNEL, D. I. *The genus Aspergillus*. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 686, 1965.

RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F. O.; AND VISMER, H. F. *Production of Fumonisin Analogs by Fusarium Species*. Applied and Environmental Microbiology, p. 2101–2105, 2002.

SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C. *Introduction to Food- and Airborne Fungi*. 7th Ed., Utrecht, The Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, p. 389, 2004.

SAMSON, R.A.; HOUBRAKEN, J.; THRANE, U.; FRISVAD, J.C.; ANDERSEN, B., *Food and Indoor Fungi*. Utrecht, The Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 390p., 2010.

SAMSON, R.A.; NOONIM, P.; MEIJER, M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J.C.; VARGA, J. *Diagnostic tools to identify black Aspergilli*. *Studies in Mycology*, v. 59, p. 129–146, 2007.

SAMSON, R.A.; VARGA, J. *What is a species in Aspergillus?* *Medical Mycology*, v.1, p.1-8, 2009.

SAMSON, R.A.; VISAGIE, C.M.; HOUBRAKEN, J.; HONG, S.-B.; HUBKA, V.; KLAASSEN C.H.W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K.A.; SUSCA, A.; TANNEY, J.B.; VARGA, J.; KOCSUB_E, S.; SZIGETI, G.; YAGUCHI, T.; FRISVAD, J.C. *Phylogeny, identification and nomenclature of the genus Aspergillus*. *STUDIES IN MYCOLOGY*, v. 78, p. 141–173, 2014.

SANTOS, L.; MARÍN, S.; MATEO, E.M.; GIL-SERNA, J.; VALLE-ALGARRA, F.M.; PATIÑO, B.; RAMOS, A.J. *Mycobiota and co-occurrence of mycotoxins in Capsicum powder*. *International Journal of Food Microbiology*, v.151, p. 270–276, 2011.

SCHULLER, P.L.; HORWITZ, W.; STOLOFF, L. *Review of aflatoxin methodology. A review of sampling plans and collaboratively studied methods of analyses for aflatoxins*. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, Baltimore, v.59, p.1315-1343, 1976.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J. C.; VAN DIJCK, P. W. M. *On the safety of Aspergillus niger – a review*. *Appl Microbiol Biotechnology*, v. 59, p. 426–435 ,2002.

SCOTT, P.M. *Recent research on fumonisins: a review*. *Food Additives & Contaminants: Part A*, v. 29, n. 2, p. 242-248, 2012.

SEWRAM, V.; MSHICILELI, N.; SHEPHARD, G. S.; VISMER, H. F.; RHEEDER, J. P.; LEE, Y.W.; LESLIE, J. F. AND MARASAS, W. F. O. *Production of Fumonisin B and C Analogues by Several Fusarium Species*. *J. Agric. Food Chem.*, v. 53, p. 4861–4866, 2005.

SINCLAIR, P.J. AND LETHAM, D.B. *Incidence and sites of visible infection of Aspergillus-Niger on bulbs of 2 onion (Allium-Cepa) cultivars*. *Australasian plant pathology*, v. 25, n. 1, p. 8-11, 1996.

SOMMA, S.; PERRONE, G.; LOGRIECO, A.F. *Diversity of black aspergilli and mycotoxin risks in grape, wine and dried vine fruits*. *Phytopathologia Mediterranea*, 51 (1), pp. 131147, 2012.

SUSCA, A.; MORETTI, A.; STEA, G.; VILLANI, A.; HAIDUKOWSKI, M.; LOGRIECO, A.; MUNKVOLD, G. *Comparison of species composition and fumonisin production in Aspergillus section Nigri populations in maize kernels from USA and Italy*. International Journal of Food Microbiology, v.188, p. 75–82, 2014.

URBANO, G.R.; TANIWAKI, M.H.; LEITÃO, M.F.D.F.; VICENTINI, M.C. *Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw brazilian coffee*. Journal of Food Protection, v. 64, n. 8, p. 1226-1230, 2001.

VAN DER MERWE, K. J.; STEYN, P. S.; FOURIE, L.; SCOTT, DE B. & THERON, J. J. *Ochratoxin A, a Toxic Metabolite produced by Aspergillus ochraceus Wilh.* Nature 205, p. 1112-1113, 1965.

VARGA J, KEVEI F, HAMARI Z, TÓTH B, TÉREN J, CROFT JH, KOZAKIEWICZ Z. Genotypic and phenotypic variability among black aspergilli. In: integration of modern taxonomic methods for penicillium and aspergillus classification. (SAMSON RA, PITT JI, EDS). Amsterdam: Harwood Academic Publishers, p. 397-411, 2000.

VARGA, J., FRISVAD, J. C., KOCSUBÉ, S., BRANKOVICS, B., TÓTH, B., SZIGETI, G., SAMSON, R. A. *New and revisited species in Aspergillus section Nigri*. Studies in Mycology, v. 69, n. 1, p. 1-17, 2011.

VARGA, J.; HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R.A.; FRISVAD, J.C. Chapter 9 – *Molecular Diversity of Aspergillus and Penicillium Species on Fruits and Vegetables*. Mycotoxins in Fruits and Vegetables. Academic Press, p. 205–223, 2008.

VARGA, J.; KOCSUBÉA, S.; SZIGETIA, G.; MANA, V.; TÓTHB, B.; VÁGVÖLGYIA, C.; BARTÓKC, T. *Black Aspergilli and fumonisin contamination in onions purchased in Hungary*. Acta Alimentaria, v. 41, n. 4, p. 414–423, 2012.

VARGAS, E.A.; SANTOS, E.A. & PITTET, A. *Determination of ochratoxin A in green coffee by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography collaborative study*. J. Assoc. Off. Anal. Chem., v. 58, p. 773-779, 2005.

VICAM *A Waters Business*. Instruction Manual. FumoniTest and FumoniTest WB. 24 pags.

VISCONTI, A.; SOLFRIZZO, M.; DE GIROLAMO, A. *Determination of fumonisins B1 and B2 in corn and corn flakes by liquid chromatography with immunoaffinity column cleanup: Collaborative study*. J. Offic. Assoc. Analyt. Chem. Internat., v. 84, p.1828-1838, 2001.

VRIES, R.P; FRISVAD, J.C.; VAN DE VONDERVOORT, P.J.I.; BURGERS, K.; KUJIPERS, A.F.A.; SAMSON, R.A.; VISSER, J. *Aspergillus vadensis, a new*

species of the group of black Aspergilli. Springer, Netherlands, v. 87, n. 3, p. 195-203, 2005.

WORDELL FILHO, J.A.; ROWE, E.; GONÇALVES, P.A. de S.; DEBARBA, J.F.; BOFF, P.; THOMAZELLI, L.F. *Manejo fitossanitário na cultura da cebola*. Florianópolis: Epagri, p. 226, 2006.

ZAIN, M. E. *Impact of mycotoxins on humans and animals*. Journal of Saudi Chemical Society, v. 15, p. 129–144, 2011.