

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ENGENHARIA
CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

ARLA DANIELA RAMALHO DA CRUZ

**ANÁLISE DE SENSIBILIDADE AO TEBUCONAZOL DE FUNGOS *Aspergillus
fumigatus* PROVENIENTES DA ERVA-MATE PARA TERERÉ COMERCIALIZADA
NA CIDADE DE ILHA SOLTEIRA - SP**

**Ilha Solteira
2023**

ARLA DANIELA RAMALHO DA CRUZ

ANÁLISE DE SENSIBILIDADE AO TEBUCONAZOL DE FUNGOS *Aspergillus fumigatus* PROVENIENTES DA ERVA-MATE PARA TERERÉ COMERCIALIZADA NA CIDADE DE ILHA SOLTEIRA - SP

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – Unesp como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Nome do orientador

Prof. Dr. Paulo Cezar Ceresini

Nome do coorientador

Profª. Dra. Katherin Castro-Rios

Ilha Solteira
2023

FICHA CATALOGRÁFICA

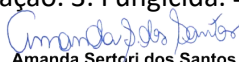
Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

C957a Cruz, Arla Daniela Ramalho.
Análise de sensibilidade ao tebuconazol de fungos *Aspergillus fumigatus* provenientes da erva-mate para tereré comercializada na cidade de Ilha Solteira – Brasil / Arla Daniela Ramalho Cruz. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2023
32 f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, 2023

Orientador: Paulo Cezar Ceresini
Co-orientador: Katherin Castro Rios
Inclui bibliografia

1. Resistência. 2. Mutação. 3. Fungicida. 4. Azólicos. 5. *Ilex paraguariensis*.


Amanda Sertori dos Santos

Biblioteca - CRB/8-9061
Seção Técnica de Referência, Atendimento ao
Usuário e Documentação
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação

ATA DE DEFESA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Análise de sensibilidade ao Tebuconazol de fungos *Aspergillus fumigatus* provenientes da Erva-mate para tereré comercializada na cidade de Ilha Solteira – Brasil

Arla Daniela Ramalho da Cruz

REGULAMENTO SOBRE A AVALIAÇÃO:

Artigo 25º - § 2º A apresentação pública do trabalho de TCC deverá ser de no mínimo 20 (vinte) minutos e máxima de 40 (quarenta) minutos. Após um intervalo de 5 (cinco) minutos, haverá a arguição do Trabalho pelos examinadores. O tempo de arguição, será de até 15 (quinze) minutos para cada examinador, e até 15 (quinze) minutos o tempo para a resposta da aluna a cada examinador ou no caso de se optar pelo diálogo o tempo conjunto entre examinador e acadêmico(a) será de no máximo 30 (trinta) minutos.

Artigo 24º – No julgamento do TCC, a banca examinadora deverá avaliar a apresentação oral, escrita e a defesa do trabalho durante a arguição. O conceito final será APROVADO ou REPROVADO.

COMISSÃO EXAMINADORA

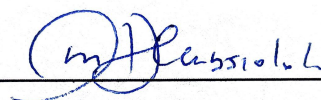
1ª EXAMINADOR (Coorientador-Presidente)

Profa. Dra. Katherin Castro Rios



2ª EXAMINADOR

Profa. Dra. Ana Maria Rodrigues Cassiolato



3ª EXAMINADOR

Dra. Tatiane Carla Silva



CONCEITO

(X) Aprovado

() Reprovado

Ilha Solteira - SP, 28 de novembro de 2023.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aqueles que me apoiaram incondicionalmente, que estiveram ao meu lado nos momentos mais difíceis e que tornaram essa jornada mais leve.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Daniel Neris da Cruz e Maria Aparecida Ramalho da Cruz, por me incentivarem e confiarem em mim. Seu apoio foi fundamental para essa etapa houvesse um início e agora um fim. Sem vocês eu nada seria.

Aos meus irmãos, Danilo Ramalho da Cruz e Dhone Ramalho da Cruz, por me escutarem e me aconselharem durante a graduação, graças as suas palavras pude superar inúmeros desafios que me fizeram chegar até aqui.

A minha grande amiga de longa data, Tawany Gonçalves Faria, por estar ao meu lado, mesmo que a distância, compartilhando tanto dos momentos bons quanto dos ruins. Agradeço por compreender minha ausência em diversos momentos. Sua amizade e apoio foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos, Bruno Bonadio Cozin, Eluana de Oliveira Souza, Gabriel Domingos David, Isabella Fiorini de Carvalho, Lucas Baltazar Longhi, Mayara Bertalha, Roberta Possas de Souza, por tornarem a graduação mais aconchegante e divertida.

Aos meus companheiros de laboratório, Davi Jacinto Ferreira, Maria Clara Shiroma Buri, Rafael Ígor Armindo Ribeiro e Thais Moreira Claudio, por estarem sempre ao meu lado, me auxiliando e tornando os dias no laboratório mais alegres.

A toda a equipe do laboratório de fitopatologia, agradeço pelos ensinamentos que contribuíram tanto para o meu crescimento acadêmico, quanto pessoal.

A minha co-orientadora, Katherine Castro-Rios, por toda a paciência, orientação e contribuições valiosas para minha formação.

Ao meu orientador, Paulo Cezar Ceresini, por me orientar e reacender em mim a paixão pelo conhecimento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenadoria de Ações Afirmativas, Diversidade e Equidade - CAADI.

“Torna-te aquilo que es”

(Friedrich Nietzsche)

RESUMO

A *Ilex paraguariensis* St. Hil, mais conhecida como erva-mate, é amplamente consumida em sua forma de tereré e chimarrão, e é de grande importância para a economia do país, gerando mais de 700 mil empregos. Um dos problemas referente ao consumo da erva está associado à quantidade de microrganismos encontrados em sua forma final, comercializada para a população, principalmente por conta da espécie *Aspergillus fumigatus*, um patógeno humano. Essa contaminação pode ocorrer por diversos fatores, como a falta de um padrão microbiológico, práticas de higiene inadequadas nas etapas de processamento, armazenamento e comercialização. Considerando que se trata de um produto para consumo, é de suma importância que um padrão microbiológico seja estabelecido para esse patógeno, visto que o tratamento disponível para as doenças causadas por ele, como a Aspergilose Invasiva e Pneumonia de Hipersensibilidade, é feito com antifúngicos azólicos, do mesmo grupo de fungicidas amplamente utilizados, como o tebuconazol, alvo deste estudo. Considerando o disposto acima, os objetivos deste trabalho foram avaliar a presença de fungos da espécie *A. fumigatus* e verificar se os isolados obtidos possuem resistência ao fungicida tebuconazol. Neste trabalho foram obtidos 43 isolados do gênero *Aspergillus*, sendo 5 da espécie *A. fumigatus*. Outros gêneros como *Mucor*, *Rhizopus* e *Penicillium* também foram identificados. Isolados resistentes não foram encontrados, entretanto, amostras que se desenvolveram em concentrações de 4 µg.mL⁻¹ de tebuconazol chamaram a atenção e evidenciaram a necessidade de mais estudos referentes ao perfil de sensibilidade do *A. fumigatus* ao tebuconazol.

Palavras-chave: resistência; mutação; fungicida; azólicos; *Ilex paraguariensis*.

ABSTRACT

The *Ilex paraguariensis* St. Hil, better known as yerba mate, is widely consumed in its forms of tereré and chimarrão and holds significant importance for the country's economy, generating over 700 thousand jobs. One of the issues related to yerba mate consumption is associated with the quantity of microorganisms found in its final, commercially available form, particularly due to the presence of the *Aspergillus fumigatus* species, a human pathogen. Contamination can occur due to various factors, such as the lack of a microbiological standard, inadequate hygiene practices during processing, storage, and commercialization stages. Considering that it is a product for consumption, it is crucial to establish a microbiological standard for this pathogen. This is because the available treatment for diseases caused by it, such as Invasive Aspergillosis and Hypersensitivity Pneumonia, involves the use of azole antifungals, from the same group of widely used fungicides, such as tebuconazole, the focus of this study. In light of the above, the objectives of this study were to assess the presence of *A. fumigatus* fungi and determine whether the isolates obtained are resistant to the fungicide tebuconazole. In this study, 43 isolates of the *Aspergillus* genus were obtained, including 5 of the *A. fumigatus* species. Other genera such as *Mucor*, *Rhizopus*, and *Penicillium* were also identified. No resistant isolates were found; however, samples that developed at concentrations of 4 µg/mL of tebuconazole were noteworthy, emphasizing the need for further studies on the sensitivity profile of *A. fumigatus* to tebuconazole.

Keywords: resistance; mutation; fungicide; azoles; *Ilex paraguariensis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Amostras adquiridas em Ilha Solteira - SP.....	19
Figura 2	- Frequência de gênero de fungos nos isolados.....	22
Figura 3	- Ensaio de sensibilidade IA9MVF1.....	24
Figura 4	- Gráfico de sensibilidade das amostras ao tebuconazol.....	26
Figura 5	- Comparação de mutação no gene CYP51A, com um isolado referência resistente ao fungicida tebuconazol e os isolados de erva-mate para tereré.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Descrição das amostras de Erva-Mate.....	18
Tabela 2	- Resultado ANOVA - Gênero.....	23
Tabela 3	- Média de crescimento micelial (%).	25

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AI	Aspergilose Invasiva
ANOVA	Análise de Variância
BDA	Ágar Batata Dextrose
BPA	Boas Práticas Agrícolas
CIM50	Concentração inibitória mínima de 50% de atividade do patógeno
EC50	Concentração efetiva de inibição de 50% de atividade do patógeno
EUA	Estados Unidos da América
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MEA	Ágar Malte
PCR	Reação de Cadeia Polimerase
PI	Pneumonia de Hipersensibilidade
SP	São Paulo
UFC	Unidade de Formação de Colônias

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	<i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil (ERVA-MATE) E CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA.....	15
2.2	GÊNERO <i>Aspergillus</i> E <i>Aspergillus fumigatus</i>	16
2.3	CONTAMINAÇÃO E CICLO DE VIDA.....	16
2.4	MUTAÇÃO E RESISTÊNCIA.....	17
3	MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1	COLETA DAS AMOSTRAS.....	18
3.2	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	19
3.3	ISOLAMENTO, CLASSIFICAÇÃO E ENUMERAÇÃO DOS FUNGOS.....	20
3.4	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	20
3.5	AVALIAÇÃO DE SENSIBILIDADE A AZÓIS DOS ISOLADOS DE <i>Aspergillus fumigatus</i>	21
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	22
4	RESULTADOS	22
4.1	ISOLAMENTO MICROBIOLÓGICO.....	22
4.2	SENSIBILIDADE AO AZOL.....	23
4.3	MUTAÇÕES E RESISTÊNCIA.....	26
5	DISCUSSÃO	26
5.1	ISOLAMENTO MICROBIOLÓGICO.....	27
5.2	SENSIBILIDADE AO AZOL.....	28
5.3	MUTAÇÕES E RESISTÊNCIA.....	28
6	CONCLUSÃO	29
	REFERÊNCIAS	30

1. INTRODUÇÃO

A *Ilex paraguariensis* St. Hil, popularmente conhecida como erva-mate, é uma planta natural do Brasil e Paraguai, sendo amplamente utilizada, não somente nesses países, mas também em diversas nações da América do Sul, nos Estados Unidos da América (EUA) e em outros continentes (DANIEL, 2009; PIASSETTA; MIKOS; AUER, 2021). No Brasil, o segundo maior produtor mundial, a erva é amplamente consumida na forma de tereré e chimarrão, mas foi sua forma em chá que ultrapassou as fronteiras do país (DANIEL, 2009; PIASSETTA; MIKOS; AUER, 2021). De acordo com Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2020), no ano de 2020 a área destinada à colheita da erva foi de mais de 70 mil hectares, que resultou ao Brasil cerca de 425 mil toneladas de erva-mate, sendo a região Sul a grande produtora; nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, entretanto, o estado do Mato Grosso do Sul também possui hectares destinados à produção da *Ilex paraguariensis* St. Hil. Esses dados demonstram a importância econômica que o produto possui, afinal, o setor ervateiro gera aproximadamente 700 mil empregos em cerca de 180 mil propriedades rurais distribuídas pelo sul do Brasil e Mato Grosso do Sul (MEDRADO e MOSELE, 2004; PIASSETTA; MIKOS; AUER, 2021).

Daniel (2009) comenta que, apesar disso, as colheitas realizadas no país ainda necessitam de aperfeiçoamento em diversas etapas do cultivo, inclusive na colheita e processamento da erva, que se realizada sem o cuidado necessário pode resultar na contaminação do produto com diversos fungos, inclusive os do gênero *Aspergillus*. Uma pesquisa de Borges *et al.* (2011), que indicou que a contaminação da erva-mate pode ter sido causada pelo contato das folhas colhidas diretamente com o chão. Castrillo, Horiński e Jerke (2013), que encontrou, inclusive, cepas de *Aspergillus fumigatus* em amostras de erva-mate comercializadas em Posadas, na Argentina, havendo maior número de gêneros de *Aspergillus* na amostra elaborada (com mais etapas de processamento) que na amostra cancheada.

Perez *et al.* (2013) destacou que a contaminação fúngica de produtos agrícolas ocorrem, na maioria das vezes, durante o período de armazenamento do produto, onde todas as condições são favoráveis para o crescimento e desenvolvimento dos fungos, Castrillo, Horiński e Jerke (2013) comentou que o aumento de mais etapas no processamento da erva-mate pode ter tido relação com o aumento de gêneros de fungos encontrados nas

amostras analisadas, demonstrando a importância das Boas Práticas Agrícolas (BPA), que são procedimentos que devem ser adotados pelas empresas para garantir que os produtos não estejam contaminados e que não ofereçam risco ao consumidor (EMBRAPA, 2004).

O gênero *Aspergillus* possui grande importância econômica, por um lado são muito utilizados na síntese de produtos químicos e produção de enzimas, mas por outro, são organismos que degradam alimentos e podem produzir aflatoxinas e ocratoxina A, os tipos de micotoxinas mais importantes (PITT e HOCKING, 2022). Sendo assim, o consumo da erva-mate contaminada por esses fungos pode ocasionar diversos riscos à saúde humana, podendo se tornar um problema de saúde pública (PEREZ, *et al.*, 2013). Além disso, a Aspergilose Invasiva (AI) é uma das doenças que podem ser resultantes dessa contaminação com *Aspergillus spp.*, tendo sua mortalidade variando entre 85 a 95% em pacientes imunocomprometidos (MESQUITA-ROCHA, 2019). A Pneumonia de Hipersensibilidade (PI) também pode ser causada por fungos desse gênero, o estudo de caso realizado por Corrêa *et al.* (2022) demonstrou que um paciente não fumante e com exames normais desenvolveu a doença em questão, após tomar chimarrão (uma bebida quente), com isso percebemos que não são somente os pacientes imunocomprometidos que estão em risco e que os fungos do gênero *Aspergillus* podem sobreviver mesmo a altos valores de temperaturas e pH mais ácidos. Vieira *et al.* (2010) demonstrou em sua pesquisa que mesmo a exposição do fungo a pH 1,5 (pH do estômago) por 30 min não foi capaz de eliminar seus esporos, demonstrou também que os fungos foram capazes de resistir a exposição a altas temperaturas, superior 50°C, lembrando que, a bebida quente (chimarrão) raramente supera 50°C e a bebida fria (Tereré) também permite o crescimento desses fungos.

O *Aspergillus fumigatus* é um fungo termorresistente que possui uma rápida germinação, seus esporos assexuados podem ser dispersos a grandes distâncias pelo ar, isso o torna presente em todo o ambiente, inclusive é inalado diariamente por seres humanos, mas como a quantidade é pequena os indivíduos saudáveis são capazes de remover os conídeos inalados, entretanto, aqueles que são imunocomprometidos podem acabar desenvolvendo uma aspergilose (VERWEIJ *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2021). Um dos antifúngicos utilizado para o tratamento desse tipo de doença são os triazólicos, que inibem a síntese de ergosterol e consequentemente bloqueiam a ação da enzima 14- α -demetilase (MESQUITA-ROCHA, 2019) e o surgimento de resistências a esses compostos pelos fungos afetam o tratamento

dessas doenças, contribuindo para o aumento na taxa de falha do tratamento (VERWEIJ *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2021).

Para evitar que esses fungos se tornem resistentes ao tratamento disponível, com uso de triazóis, é necessário que a erva-mate esteja livre de contaminação, para isso o controle de patógenos deve ser feito de forma adequada, assim como os cuidados de coleta, pós coleta e armazenamento, portanto, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar a presença de fungos do gênero *Aspergillus*, em especial a espécie *Aspergillus fumigatus*, em 9 amostras de erva-mate comercializadas no estado de São Paulo, Brasil, tendo como objetivo específico verificar se a espécie em questão possui sensibilidade ao fungicida tebuconazol.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Ilex paraguariensis* St. Hil (Erva-mate) e Contaminação microbiológica

A *Ilex paraguariensis* St. Hil, popularmente conhecida como erva-mate, é utilizada na fabricação de diversos produtos de consumo humano, como o tereré e o chimarrão, e é uma planta nativa do Brasil e Paraguai (DANIEL, 2009). No passado, a erva ficou conhecida como “ouro verde”, isso porque grande parte da economia da época era baseada nesse produto, visto que com a Guerra da Tríplice Aliança (1864-1870) o Paraguai perdeu o posto de grande produtor para o Brasil (DANIEL, 2009).

Após esses acontecimentos a erva-mate continuou sendo de grande importância para a economia brasileira, tanto que em 1927 foi criado o Instituto Mate, com o objetivo de aperfeiçoar, defender e divulgar o produto tanto em terras brasileiras quanto no estrangeiro (DANIEL, 2009). Esse produto possui inúmeros benefícios à saúde, tendo propriedades antioxidantes, apresenta vitaminas e minerais essenciais para o corpo humano e ainda é comercializada em cosméticos, que garantem proteção da pele, inclusive contra a radiação solar (CENTENARO *et al.*, 2020).

Juntamente com a busca de novos produtos com propriedades terapêuticas e a pressão para consumir produtos de origem natural, é de se esperar que o consumo de plantas como a erva-mate aumente (CARVALHO *et al.*, 2009). Como as ervas precisam passar por processos de secagem, normalmente em estufas a céu aberto, para só então seguirem para os outros

processos de produção e estarem prontas para o consumo, percebe-se que elas estão sujeitas a contaminações por fungos filamentosos, como o *Aspergillus* (CARVALHO *et al.*, 2009).

A presença desses microrganismos implica na qualidade do produto que estará sendo comercializado, afinal, irá influenciar em sua vida útil e segurança alimentar para os consumidores, logo, a presença de fungos filamentosos e outro microrganismos demonstra a contaminação da matéria-prima nas fases de processamento ou fases seguintes (como estocagem e comercialização), bem como práticas de higiene falhas, que não estão de acordo com o requerido para o processamento de alimentos (KUHNS *et al.*, 2021).

2.2 Gênero *Aspergillus* e *Aspergillus fumigatus*

Os representantes do gênero *Aspergillus* possuem grande facilidade de crescer em ambientes com altas temperaturas, pouca água ou ambas as condições (PITT e HOCKING, 2022), deste modo, este fungo é capaz de sobreviver em diferentes habitats como desertos, salinas, ártico, mangues, etc., além de estar presente em campos de agricultura em diferentes altitudes, podendo ser encontrado em até 2000 m acima do nível do mar (ABDEL-AZEEM *et al.*, 2016).

A espécie *Aspergillus fumigatus*, foco deste estudo, é um patógeno humano responsável por causar a Aspergilose invasiva (AI) e alergias graves (PITT e HOCKING, 2022). Indivíduos imunocomprometidos possuem pouca resistência a infecções fúngicas e por este motivo não devem ser expostos a esta espécie em específico e só podem realizar experimentos laboratoriais com espécies patogênicas, desde que, feitos em cabines de biossegurança (PITT e HOCKING, 2022). Indivíduos saudáveis possuem resistência maior, entretanto alguns cuidados devem ser tomados, como não farejar as culturas, tomar cuidado com o manuseio e descartar as colônias fúngicas assim que a espécie for identificada (PITT e HOCKING, 2022). Esta espécie não deve ser utilizada para experimentos de biodeterioração de alimentos sem os devidos cuidados por conta da disseminação de seus esporos (ABDEL-AZEEM *et al.*, 2016), que são dispersos pelo ar com facilidade, permitindo sua distribuição por grandes distâncias (MESQUITA-ROCHA, 2019).

2.3 Contaminação e Ciclo de vida

A contaminação por este fungo ocorre principalmente pelas vias aéreas, o formato aerodinâmico dos esporos facilita a inalação do mesmo, permitindo que eles se alojem nos seios nasais e árvore broncopulmonar, sítios para o desenvolvimento da AI (MESQUITA-ROCHA, 2019). O *A. fumigatus* possui três tipos de reprodução, a sexuada (onde é necessário duas linhagens distintas, as chamadas de parentais), assexuada (o fungo se desenvolve através de um único esporo ou hifa) e parasexual (ocorre através da fusão de hifas) que contribuem para a variação genética (VERWEIJ *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2021). Na AI o *A. fumigatus* cresce através do alongamento celular pelos tecidos, isto acaba resultando em uma limitação reprodutiva e consequentemente restringe a variação genética, reduzindo sua resistência a fungicidas azóis, entretanto, a resistência ao fungicida nos pacientes estão associados a seleção ambiental, onde o *A. fumigatus* resistente ao azol é inalado (VERWEIJ *et al.*, 2016). Segundo ZHANG *et al.* (2021), a resistência deste fungo aos azóis vem sendo cada vez mais relatada, principalmente por este fungicida não ser de uso exclusivamente clínico e amplamente utilizado no meio ambiente, o autor acredita que eles tenham selecionado mecanismos que os tenham tornado resistentes com o passar do tempo, tornando-se uma ameaça ao tratamento da aspergilose.

2.4 Mutação e Resistência

A resistência descrita neste trabalho se refere a incapacidade do fungicida de inibir completamente o crescimento do microorganismo, sendo classificada como uma resistência secundária, visto que depende da exposição do microorganismo a um fungicida (BASTOS *et al.*, 2021). Essa resistência normalmente está associada a uma mutação no gene CYP51 e sua região promotora, sendo responsável por mediar uma das etapas da síntese do ergosterol, um dos constituintes da membrana que são responsáveis pela permeabilidade e integridade da mesma (BASTOS, *et al.*, 2021).

Acredita-se que a exposição aos fungicidas azóis tenha selecionado indivíduos que possuíssem mecanismos de resistência (ZHANG *et al.*, 2021), como os triazóis ambientais possuem um mecanismo de ação similar aos triazóis médicos, a hipótese mais aceita é a de que os fungicidas agrícolas estão levando ao surgimento de cepas resistentes aos antifúngicos clínicos (BASTOS *et al.*, 2021).

Os triazóis clínicos, como voriconazol, itraconazol e posaconazol, são as primeiras escolhas para a realização de tratamentos contra a aspergilose (ETIENNE *et al.*, 2021), isso ocorre devido à baixa toxicidade e alta eficácia desses fármacos. No surgimento de resistência contra esses medicamentos trazem consequências graves para o tratamento de doenças associadas ao *A. fumigatus* (FRAAIJE *et al.*, 2020).

3. Material e Métodos

3.1 Coleta das amostras

Foram utilizadas 9 amostras de Erva-mate para tereré, como indicado e descrito na figura 1 e tabela 1, respectivamente. Todas foram adquiridas no comércio da cidade de Ilha Solteira (Estado de São Paulo) em fevereiro de 2022. Todos os produtos adquiridos estavam no prazo de validade indicado e não apresentavam violação na embalagem, assim que adquiridas as amostras foram levadas ao laboratório para que a análise fosse realizada.

Tabela 1 - Descrição das amostras de Erva Mate.

Amostra	Marca	Tipo	Origem
1	Gaúcho	Moída	Almirante Tamandaré - PR
2	Yacuy (Orgânico)	Moída	Canoinhas - SC
3	Constança	Moída	Santo Antônio do Sudoeste - PR
4	Campanário	Moída	Naviraí - MS
5	Siamar	Moída	Chapecó - SC
6	Yacuy	Moída	Canoinhas - SC
7	Kinino	Moída	Laranjeiras do Sul - PR
8	Ouropy	Moída	Campo Grande - MS
9	Santo Antônio	Moída	Ponta Porã - MS

Fonte: Elaboração do próprio autor.

Figura 1 - Amostras adquiridas em Ilha Solteira - SP. A. Amostra 1; B. Amostra 2; C. Amostra 3; D. Amostra 4; E. Amostra 5; F. Amostra 6; G. Amostra 7; H. Amostra 8; I. Amostra 9.



Fonte: Elaboração do próprio autor.

3.2 Análise microbiológica

Como as amostras são moídas para sua comercialização, de acordo com Pitt e Hocking (2022) a técnica empregada para realizar a avaliação microbiológica nesta etapa foi a diluição em placas, sendo assim, 10 g de cada uma das amostras foram homogeneizadas em 90 mL de água peptonada (Kasvi). Porções de 0,1 mL da solução foram depositadas e espalhadas, com o auxílio de uma micropipeta e uma haste (esterilizada com álcool e fogo antes do uso), em 5 placas diferentes contendo meio de cultura ágar batata dextrose (BDA, Kasvi), com Cloranfenicol (Sigma-Aldrich). Todas as placas foram rotuladas e incubadas, três placas foram mantidas a 25 °C e duas a 37 °C por um período de 5 a 7 dias.

3.3 Isolamento, classificação e enumeração dos fungos

Após a fase inicial de incubação, as colônias foram transferidas individualmente para placas contendo ágar malte (MEA, Kasvi), utilizando agulhas previamente esterilizadas pelo calor. Durante esse procedimento uma pequena porção do micélio foi removida e transferida para a nova placa de malte. As colônias foram incubadas novamente a temperaturas de 25°C e 37°C, sendo cada colônia mantida na temperatura anteriormente determinada.

O micélio dos fungos foi colocado em uma lâmina de vidro com lactofenol azul de algodão diluído e levado ao microscópio óptico, para que a identificação prévia do gênero dos fungos fosse realizada, com base na literatura de Pitt e Hocking (2022). As imagens obtidas foram geradas no aumento de 40x. Para a identificação morfológica padrão dos fungos algumas características devem ser analisadas, sendo, diâmetro, cor, cor reversa, superfície, margem, elevação, formas e presença de exsudatos, para isso utilizou-se a literatura de Sidrim *et al.* (2003) e Pitt e Hocking (2022). Para identificar a frequência de ocorrência de cada fungo identificado e o número de colônias, os resultados foram calculados por meio da equação abaixo, que expressa os resultados em Unidade de Formação de Colônias (UFC/g), com a seguinte equação:

$$\frac{UFC}{g} = \frac{(Número\ de\ colônias * fator\ de\ diluição)}{volume\ da\ amostra}$$

3.4 Identificação molecular

Para a identificação dos isolados em nível de espécie, eles foram submetidos a um ensaio de PCR, para tal, os fragmentos de micélio com 2 cm² de diâmetro foram coletados das colônias que cresceram em meio BDA por 3 dias a 37 °C, em seguida as amostras foram liofilizadas. O DNA do micélio foi extraído utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, EUA), seguindo as instruções do fabricante e quantificado em um espectrofotômetro Nanodrop® 2000c (Thermo Fisher Scientific, EUA).

A identificação da espécie *A. fumigatus* foi realizada por PCR seguindo o ensaio descrito por Serrano *et al.* (2011), em que os primers de β -tubulina: F 5'-TGACGGTGATTGGGATCTC-3' e R 5'-CGTCCGCTTCTTCTTCCTTTGTGTTTT-3' e Rodlet: F 5'-ACATTGACGAGGGCATCCTT-3' e R 5'-ATGAGGGAACCGCTCTGATG-3', foram utilizados, eles servem para amplificar um fragmento de aproximadamente 198 bp e

313 bp respectivamente. As amplificações foram realizadas em um termociclador ProFlex PCR (Applied Biosystems, EUA), com as seguintes condições de ciclo: uma desnaturação inicial de 5 min em 94°C, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 min e a 68°C durante 1 min, por fim, uma extensão final em 68 °C durante 2 min, os resultados da amplificação foram visualizados utilizando a eletroforese em gel de agarose.

3.5 Avaliação da sensibilidade a Azois dos isolados de *Aspergillus fumigatus*

Os 5 isolados confirmados de *A. fumigatus* foram submetidos a um teste para calcular a concentração efetiva para inibir 50% da atividade do patógeno (EC50), para o fungicida Tebuconazol.

As culturas preservadas a -20°C de *A. fumigatus* foram reativadas em meio BDA e incubadas a 35°C, por 72h. O inóculo fúngico foi preparado adicionando 5 mL da solução de Tween 20 nas placas com crescimento fúngico, posteriormente 5 µg.mL⁻¹ dessa suspensão de esporos foram transferidos para novas placas de meio BDA suplementado com diferentes concentrações dos fungicidas (0,03; 0,5; 2; 4; 8 e 16 µg.mL⁻¹), seguindo o protocolo descrito por Brackin *et al.* (2020). Essas placas foram vedadas com Parafilm® e incubadas a 37°C de 48 a 72 h, quando foi mensurado o crescimento micelial das colônias e calculada a inibição relativa em cada dose, através do software RStudio. Posteriormente realizou-se a “triagem Tebucheck”, descrita no protocolo mencionado anteriormente.

Realizado o EC50, as amostras foram submetidas a uma análise de variação no gene CYP51A, utilizando como base a metodologia de Fraaije *et al.* (2020), foi necessário realizar um ensaio PCR e utilizar os primers 51AF1 GGAGAAGGAAAGAAGCACTCT e 51AR1 CTGTCTCACTTGGATGTG para amplificar um fragmento de 2040 bp. As condições de ciclo foram as mesmas descritas anteriormente, para a realização da identificação molecular.

Os produtos do PCR foram encaminhados para a empresa Macrogen (Coréia do Sul), para que fossem purificados e sequenciados, possibilitando as análises das sequências de DNA no software Geneious R 9.0.5 (Biomatters, Auckland, Nova Zelândia). As 5 amostras de *A. fumigatus* confirmadas através da identificação molecular foram comparadas com as sequências de CYP51A-rDNA de uma espécie de *A. fumigatus* sensível a azóis, nomeada de MG972984 (HARE *et al.*, 2019), disponível no banco de dados GenBank/NCBI.

3.6 Análise estatística

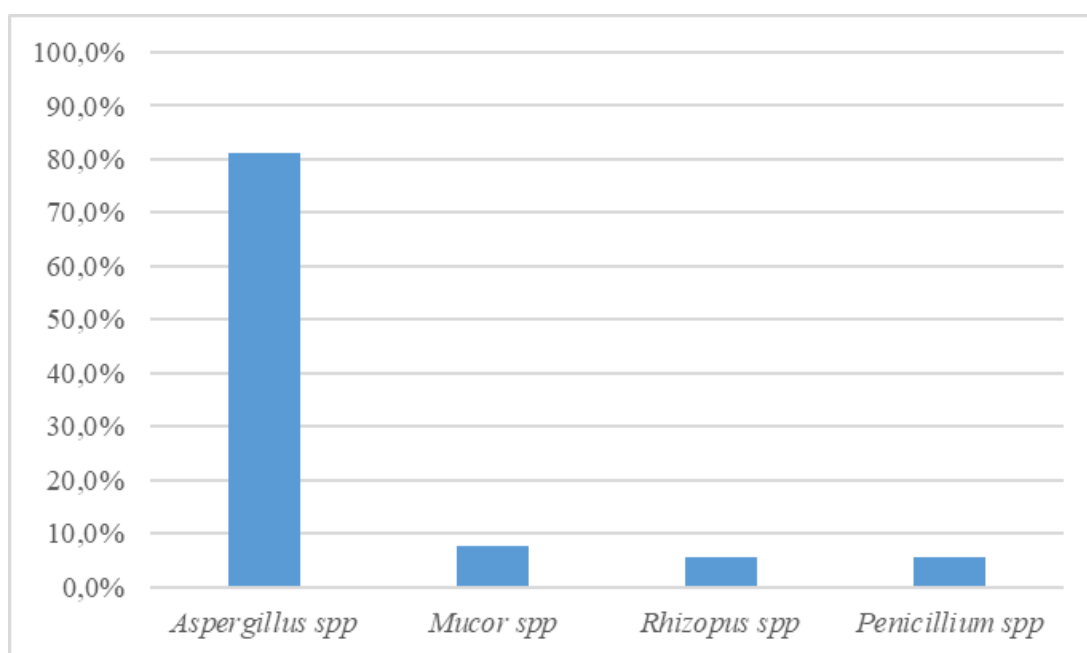
Para analisar a significância dos dados obtidos, sendo da temperatura de incubação e tipo de amostra sobre frequência de fungo e UFC/g, os dados foram analisados quanto a normalidade e homogeneidade de variância, depois por ANOVA (Análise de Variância) e Kruskal Wallis usando o pacote de software Jamovi versão 1.2 (JAMОВI, 2020). As diferenças consideráveis (ou significativas) foram analisadas através do teste de Tukey ou DSCF como um complemento para a análise, a diferença foi considerada significativa caso o valor de $p \leq 5\%$. Os resultados experimentais foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

4. Resultados

4.1 Isolamento microbiológico

Foram obtidos um total de 53 isolados de fungos, dentre eles a frequência do gênero *Aspergillus* correspondeu a 81,1% das amostras, representando 43 isolados. Também foram encontrados isolados do gênero *Mucor*, *Rhizopus* e *Penicillium*, como demonstrado na figura 2.

Figura 2 - Frequência de gênero de fungos nos isolados.



Fonte: Elaboração do próprio autor.

Foi observado que, das 5 repetições, o isolado nomeado de A2M1 (correspondendo a Amostra 2 repetição 1) incubado a 25°C não apresentou contaminação, o mesmo ocorreu com os isolados A2M4 (37°C), A3M1, A3M2, A6M1, A7M1 e A7M2, todos a 25°C. Notou-se também que, as amostras A2, A3, A4, A6 e A7 só apresentaram contaminações do gênero *Aspergillus* spp, enquanto a amostra A1 e A8 apresentaram todos os gêneros, exceto por *Penicillium* spp, a amostra A5 não possuía *Penicillium* spp. nem *Rhizopus* spp. e a amostra A9 apresentou todos os gêneros, exceto por *Mucor* spp.

Quanto à análise estatística dos dados, que foi realizada pelo teste ANOVA e validada pelos testes não paramétricos, podemos observar que não houve diferenças significativas para os dados analisados ($p > 0,05$), em relação ao gênero, amostra e temperatura, como observado na tabela 2.

Tabela 2 - Resultado ANOVA - Gênero.

	Soma dos quadrados	df	valor quadrático médio	F	p
Amostra	5,777	8	0,722	0,892	0,534
Temperatura	0,318	1	0,318	0,392	0,535
Amostra*Temperatura	2,207	8	0,276	0,341	0,944
Resíduos	28,348	35	0,810		

Fonte: Elaboração do próprio autor.

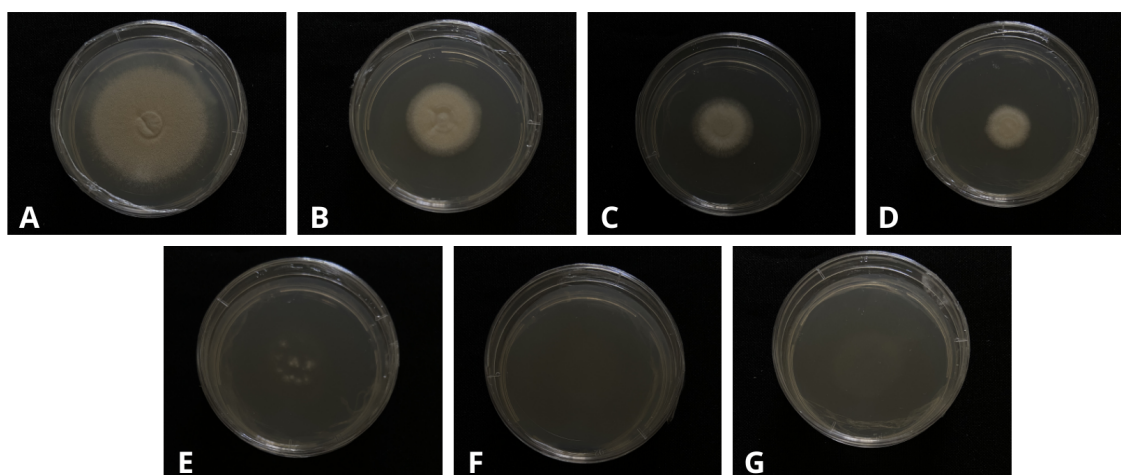
4.2 Sensibilidade ao azol

Vinculado aos objetivos específicos deste trabalho, a verificação de sensibilidade ao fungicida Tebuconazol foi realizada em apenas 5 amostras, sendo elas IA3MVF1, IA6MF2, IA9MF1, IA9MF2 e IA9M8VF1, todas identificadas como sendo da espécie *Aspergillus fumigatus* através do ensaio PCR.

Conforme o protocolo de Brackin *et al.* (2020), as culturas de *A. fumigatus* das amostras citadas anteriormente foram translocadas para meio BDA suplementadas com

diferentes concentrações de Tebuconazol. Na imagem figura 3 é possível observar o crescimento do isolado IA9MVF1 nas diferentes concentrações do fungicida.

Figura 3 - Ensaio de sensibilidade A9MF1. Concentrações: A) 0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. B) 0,03 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. C) 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ D) 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. E) 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. F) 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. G) 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.



Fonte: Elaboração do próprio autor.

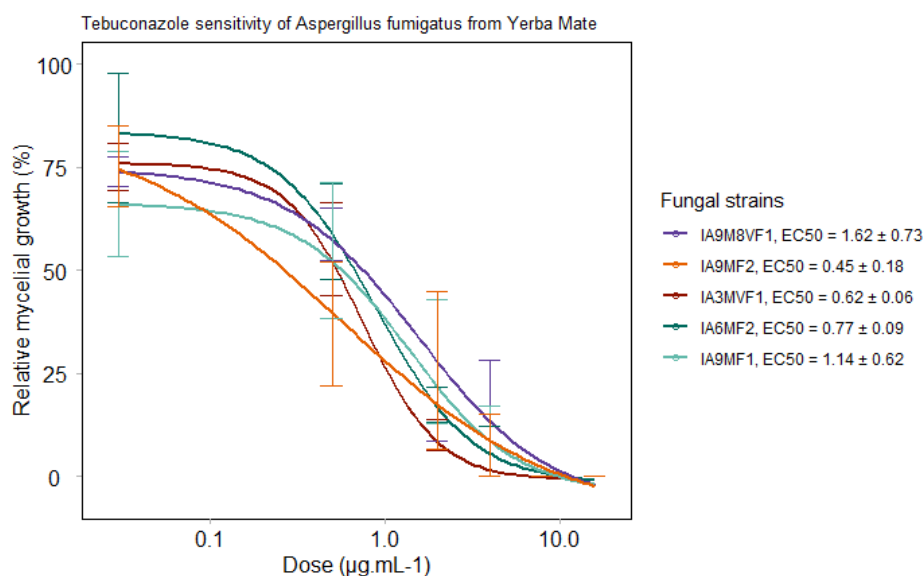
Analizando os resultados da média de crescimento micelial das diferentes concentrações de fungicida, foi possível observar que para concentrações maiores houve uma diminuição no crescimento micelial dos isolados. Para a concentração de 0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ observamos um crescimento de 100% em todas as amostras, a partir das concentrações de 0,03 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ já foi possível observar essa diminuição. Nas concentrações superiores a 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ já não foi mais possível observar o crescimento micelial, indicando que essas doses levaram a 100% da inibição do crescimento dos isolados. Na amostra IA3MVF1 o crescimento foi de 0% a 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, entretanto, observou-se crescimento nas outras amostras para esta mesma concentração, como o exemplo da figura 3 e como na amostra IA9M8VF1 que apresentou o maior crescimento nessa concentração, sendo de 14,35%, como podemos observar na tabela 4.

Tabela 3 - Média de crescimento micelial (%).

Isolados	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)						
	0	0,03	0,5	2	4	8	16
IA6MF2	100 $\pm$ 0	83,11 $\pm$ 12	58,73 $\pm$ 9	17,32 $\pm$ 3	5,13 $\pm$ 5	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
IA9M8VF1	100 $\pm$ 0	74,04 $\pm$ 2	56,49 $\pm$ 4	28,80 $\pm$ 14	14,35 $\pm$ 11	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
IA9MF2	100 $\pm$ 0	74,62 $\pm$ 7	38,34 $\pm$ 10	22,39 $\pm$ 15	4,96 $\pm$ 5	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
IA9MF1	100 $\pm$ 0	66,37 $\pm$ 10	50,83 $\pm$ 12	24,52 $\pm$ 11	6,04 $\pm$ 7	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
IA3MVF1	100 $\pm$ 0	75,82 $\pm$ 4	52,26 $\pm$ 8	9,07 $\pm$ 2	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0

Fonte: Elaboração do próprio autor.

Com relação ao modelo de crescimento dos isolados em resposta às diferentes doses do fungicida tebuconazol (Figura 4), após a realização do EC50, juntamente com análises estatísticas realizadas no software RStudio, foi possível estimar o valor da concentração capaz de inibir 50% da atividade do patógeno. O valor mais alto observado, de 1.62 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, associado à amostra IA9M8VF1, a mesma que apresentou maior crescimento na concentração de 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 4).

Figura 4 - Gráfico de sensibilidade das amostras ao tebuconazol.

Fonte: Elaboração do próprio autor.

4.3 Mutações e Resistência

A análise genética realizada com o DNA micelial das amostras de *Aspergillus fumigatus*, através do Software Geneious R 9.0.5, não apresentaram nenhuma mutação para o gene testado, o CYP51A, como pode ser observado na figura 5. Essa figura compara o DNA de um dos isolados obtidos com o DNA de um isolado referência, o MG972984, que possui uma mutação M172V.

Figura 5 - Comparação de mutação no gene CYP51A, com um isolado de referência resistente ao fungicida tebuconazol e os isolados de erva-mate para tereré.

Consensus Identity	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
1. IA3C6 CYP51A translation	Ser	Ser	Gly	Arg	Met	Asp	Ile	Ser	Ala	Ala	Ala
2. IA6MF2 CYP51A translation	Ser	Ser	Gly	Arg	Met	Asp	Ile	Ser	Ala	Ala	Ala
3. IA9MF1 CYP51A translation	Ser	Ser	Gly	Arg	Met	Asp	Ile	Ser	Ala	Ala	Ala
4. IA9MF2 CYP51A translation	Ser	Ser	Gly	Arg	Met	Asp	Ile	Ser	Ala	Ala	Ala
5. IA9MV8F1 CYP51A translation	Ser	Ser	Gly	Arg	Met	Asp	Ile	Ser	Ala	Ala	Ala
6. MG972984 translation	Ser	Ser	Gly	Arg	Val	Asp	Ile	Ser	Ala	Ala	Ala

Fonte: Elaboração do próprio autor.

5. Discussão

5.1 Isolamento microbiológico

Uma possível causa para a presença de *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp. e *Penicillium* spp. nas amostras de erva-mate analisadas, seria a falta de um padrão microbiológico específico para esses gêneros, visto que a Instrução Normativa nº 126 de 2022 menciona um limite microbiológico para cafês, chás e produtos para infusão, entretanto, os integrantes dos gêneros acima não possuem um limite microbiológico cadastrado (ANVISA, 2022).

Os gêneros encontrados coincidem com os resultados de Borges *et al.* (2002), que realizou a contagem de fungos filamentosos encontrados em marcas de erva-mate comercializadas na cidade de Curitiba-PR (Brasil), a pesquisadora encontrou fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus*, apenas o gênero *Mucor* não coincide. Outra pesquisa com amostras de erva-mate comercializadas no Brasil, especificamente em Porto Alegre-RS (Brasil), foi realizada por Vieira *et al.* (2010), que evidenciaram a presença do gênero *Aspergillus*, assim como, nota-se que havia a presença do gênero *Penicillium*. Perez *et al.* (2013) realizou uma pesquisa com amostras de erva-mate adquiridas em Porto Alegre (Brasil), das 8 amostras analisadas apenas uma não apresentou contaminação, e dos isolados obtidos a predominância foi de *A. fumigatus*, coincidindo também com os resultados apresentados anteriormente.

Em trabalhos realizados fora do Brasil, também com amostras de erva-mate, é possível citar as pesquisadoras Castrillo, Horiński e Jerke (2013), que obtiveram suas amostras na cidade de Posadas (Argentina) e em seus estudos conseguiram identificar 80% de frequência do gênero *Aspergillus*, sendo 8,6% representando o *A. fumigatus* e outras espécies. Di Pentima *et al.* (2005) em um trabalho realizado nos EUA, com 5 amostras colhidas e embaladas na Argentina e 1 amostra colhida no Brasil e embalada nos EUA, foi possível observar a presença de fungos patogênicos em 5 das 6 amostras, sendo que 3 delas apresentaram a espécie *A. fumigatus*.

Em relação ao gênero, temperatura e amostra (Tabela 2), foi possível observar que não há diferença significativa, isso possivelmente se deve ao fato de que os membros do gênero *Aspergillus*, que apareceram com mais frequência, serem xerofílicos, comumente encontrados

em produtos secos e possuem crescimento rápido em uma ampla faixa de temperatura (ABDEL-AZEEM, 2016).

5.2 Sensibilidade ao azol

Nos resultados de sensibilidade, podemos perceber que com o aumento da dosagem do fungicida houve uma diminuição em seu crescimento micelial e com o EC50 foi possível estabelecer uma dose capaz de inibir em 50% a atividade do patógeno, sendo $1,62 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a mais alta (Figura 4). No trabalho realizado por Oliboni (2022), os isolados de *Aspergillus* spp presentes no ar apresentaram uma concentração inibitória mínima (CIM50) de $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, ou $0,5 \text{ mg/L}$, para tebuconazol.

Zhou *et al.* (2021), em seu estudo sobre a ampla resistência a azólicos em isolados de *A. fumigatus* provenientes de amostras do solo obteve um CIM50 de $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$, após uma análise genética foi possível identificar uma combinação de 3 mutações em 12 das cepas analisadas em seu trabalho, dentre elas a mutação M172V no gene CYP51A, que não foi observada neste estudo.

Não foi viável estabelecer um valor preciso de CIM50 para o tebuconazol, conforme notado nos estudos anteriores; este valor demonstrou ser variável. No que diz respeito aos isolados provenientes de erva-mate, não foram identificados estudos disponíveis, evidenciando a necessidade de estudos mais aprofundados acerca dessa erva.

O crescimento dos isolados a concentrações superiores a $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ evidenciam a necessidade de mais estudos acerca da sensibilidade da espécie aos azólicos, indicando um alerta de que essa linhagem possa se tornar um problema no futuro.

5.3 Mutação e Resistência

A maioria dos isolados resistentes, tanto de cepas clínicas quanto de cepas ambientais, apresentaram mutações no gene CYP51A, causando alterações na conformação na enzima 14- α esterol desmetilase, que, por sua vez, altera a integridade e permeabilidade da membrana fúngica, impedindo o crescimento do patógeno (BASTOS, 2021). Como os principais mecanismos de resistência a antifúngicos azólicos estão relacionados a proteína codificada por este gene, várias mutações tem sido descritas, como as 5 mutações missense diferentes

(F46Y, M172V, N248T, D255E e E427K), como foram relatadas em diferentes isolados de *A. fumigatus* ao redor do mundo (RUBIO-GARCIA, 2018).

No presente trabalho não foi possível visualizar nenhuma das mutações citadas anteriormente, mas é possível observar a mutação M172V no isolado de referência MG972984, onde ocorre uma substituição da metionina pela valina na região 172, conforme mostra a Figura 5.

A sensibilidade associada ao fungicida triazol representa um perigo a saúde dos consumidores, tendo em vista que o tratamento de doenças causadas por esse fungo são realizados com medicamentos do grupo dos azóis (BASTOS *et al.*, 2021), sendo o voriconazol, itraconazol e posaconazol os mais importantes para o tratamento da aspergilose (ZHANG *et al.*, 2021). Existem estudos que abordam a coleta de cepas resistentes a azóis em pacientes que não receberam tratamento com o antifúngico, evidenciando a ocorrência de resistência cruzada (BASTOS *et al.*, 2021), o que dificulta o tratamento da doença e limita ainda mais as opções de tratamento (ZHANG *et al.*, 2021), ainda mais se consideramos que a pandemia da COVID 19 agravou ainda mais o problema de doenças resistentes aos azóis (ZHOU, 2021).

6. Conclusão

A presença de *A. fumigatus* nas amostras comerciais de erva-mate para tereré representa um risco à saúde humana, para indivíduos saudáveis e principalmente para aqueles que possuem algum comprometimento imunológico, mesmo não tendo a confirmação para isolados resistentes ao triazol neste estudo. As diferenças de sensibilidade e o crescimento de isolados as concentrações mais altas do fungicida sinalizam um alerta, de que esses isolados podem vir a se tornar uma ameaça futuramente.

Ressalta-se a importância da definição de um limite microbiológico para este patógeno em diferentes tipos de alimentos, métodos de desinfecção adequada, e mais estudos a respeito do perfil de sensibilidade que *A. fumigatus* apresenta para fungicidas triazóis, tanto agrícolas quanto fármacos, em vista da possibilidade de uma resistência cruzada.

REFERÊNCIAS

ABDEL-AZEEM, A. M. et al. Biodiversity of the genus *Aspergillus* in different habitats. Em: **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 3–28. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-444-63505-1.00001-4>>.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Instrução normativa nº 161, de 1º de julho de 2022. Disponível em: https://ses.sp.bvs.br/wp-content/uploads/2022/07/U_IN-MS-ANVISA-161_010722.pdf. Acesso em 27 mar. 2023.

BASTOS, R. W. et al. Fungicide effects on human fungal pathogens: Cross-resistance to medical drugs and beyond. **PLoS pathogens**, v. 17, n. 12, p. e1010073, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1010073>>.

BORGES, L. R. et al. CONTAGEM DE FUNGOS NO CONTROLE DE QUALIDADE DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) E ISOLAMENTO DE GÊNEROS POTENCIALMENTE MICOTOXIGÊNICOS. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 20, n. 1, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5380/cep.v20i1.1139>>.

BORGES, L. R. et al. Diversidade de fungos filamentosos em solo de monocultivo de erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 9, n. 2, p. 185, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.7213/cienciaanimal.v9i2.11786>>.

BRACKIN, A. P. et al. A low-cost tebuconazole-based screening test for azole-resistant *Aspergillus fumigatus*. **Current protocols in microbiology**, v. 58, n. 1, p. e112, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/cpmc.112>>.

CARVALHO, S. et al. Contaminação fúngica em chás de camomila, erva-doce e erva-mate. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n. 1, p. 91–95, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.53393/rial.2009.v68.32747>>.

CASTRILLO, M. L.; HORIANSKI, M. A.; JERKE, G. Aislamiento de cepas de *Aspergillus* sección Nigri en la yerba mate comercializada en Posadas (Misiones, Argentina) y evaluación de su potencial ocratoxigénico. **Revista Argentina de microbiología**, v. 45, n. 2, p. 110–113, 2013. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/s0325-7541\(13\)70009-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0325-7541(13)70009-9)>.

CENTENARO, M. et al. Evolução da produção e tecnologias no cultivo de erva-mate: Análise entre Brasil e Argentina. **Profanações**, p. 90–107, 2020.

CORRÊA, L. F. et al. Hypersensitivity pneumonia associated with metallic straw of mate (chimarrão): A case report. **Archives of environmental & occupational health**, v. 77, n. 9, p. 774–777, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/19338244.2021.2017252>>.

DANIEL, Omar. **Erva-mate**: sistema de produção e processamento industrial. Dourados, MS: UFGD, 2009.

DI PENTIMA, M. C. et al. Are your patients at risk? Fungal contamination of *Ilex paraguariensis* St. Hil (yerba maté). Transplant infectious disease: an official journal of the Transplantation Society, v. 7, n. 1, p. 47–48, 2005.

EMBRAPA, E. B. DE P. A. Manual de Boas Práticas Manual de Boas Práticas Manual de Boas Práticas Agrícolas e Sistema APPCC Agrícolas e Sistema APPC. Brasília - DF: [s.n.], 2004.

ETIENNE, K. A. et al. Genomic diversity of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in the United States. **mBio**, v. 12, n. 4, p. e0180321, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/mBio.01803-21>>.

FRAAIJE, B. et al. The multi-fungicide resistance status of *Aspergillus fumigatus* populations in arable soils and the wider european environment. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.599233>>.

GARCIA-RUBIO, R. et al. Insight into the significance of *Aspergillus fumigatus* cyp51A polymorphisms. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 6, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/aac.00241-18>>.

HARE, R. K. et al. In vivo selection of a unique tandem repeat mediated azole resistance mechanism (TR120) in *Aspergillus fumigatus* cyp51A, Denmark. **Emerging infectious diseases**, v. 25, n. 3, p. 577–580, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3201/eid2503.180297>>.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. **Quantidade produzida na extração vegetal, por produto (Toneladas)**. 2020. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9105-producao-da-extracao-vegetal-e-da-silvicultura.html?=&t=destaques>. Acesso em: 11 nov. 2023.

Jamovi. (2020). The jamovi project (1.2).

Manual de Boas Práticas Agrícolas e Sistema APPCC Brasília: EMBRAPA/SEDE, 2004. 101 p. (Qualidade e Segurança dos Alimentos). Projeto PAS campo. Convênio CNI/SENAI/SEBRAE/EMBRAPA

Medrado, Moacir José Sales. **O futuro da investigação científica em erva-mate**. Colombo, Pr: Embrapa Florestas, 2004. 64 p.

MESQUITA-ROCHA, Sabrina et al. *Aspergillus fumigatus*: aspectos gerais e importância na medicina contemporânea. **Health Sci Inst**, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 169-73, 2019.

KUHN, C. R. et al. CONTAMINAÇÃO MICROBIANA EM ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*). **Global Science and Technology**, v. 14, n. 1, p. 1–7, 2021.

OLIBONI, G. M. **Identificação e perfil de sensibilidade de *Aspergillus* spp. presente no ar atmosférico.** [s.l.] Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2022.

PÉREZ, P. J. et al. Evaluación del Perfil Micológico de la Yerba Mate durante el proceso productivo y producto final en establecimientos yerbateros: paraguay. **Revista de salud publica del Paraguay**, v. 3, n. 1, p. 8–13, 2013.

PIASSETTA, R. D. R. L.; MIKOS, A. P.; AUER, C. G. DOENÇAS FÚNGICAS DA CULTURA DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*) NO BRASIL. **BIOFIX Scientific Journal**, v. 6, n. 2, p. 153, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5380/biofix.v6i2.80320>>

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage.** 4. ed. Cham, Switzerland: Springer Nature, 2022.

SERRANO, R. et al. Rapid identification of *Aspergillus fumigatus* within the section Fumigati. **BMC microbiology**, v. 11, n. 1, p. 82, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-11-82>>.

SIDRIM, José Júlio Costa et al. Aspectos gerais de fungos filamentosos e dimórficos na apresentação filamentosa. In: SIDRIM, José Júlio Costa; ROCHA, Marcos Fábio Gadelha. **Micologia Médica à luz de autores contemporâneos.** [S.L.]: Guanabara Koogan, 2003. Cap. 8. p. 83-86.

VERWEIJ, P. E. et al. In-host adaptation and acquired triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a dilemma for clinical management. **The Lancet infectious diseases**, v. 16, n. 11, p. e251–e260, 2016. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30138-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30138-4)>.

VIEIRA, N. O. et al. Drinking yerba mate infusion: a potential risk factor for invasive fungal diseases?: Fungal contamination of yerba mate. **Transplant infectious disease: an official journal of the Transplantation Society**, v. 12, n. 6, p. 565–569, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3062.2010.00554.x>>.

ZHANG, J. et al. Azole-resistance development; How the *Aspergillus fumigatus* lifecycle defines the potential for adaptation. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 8, p. 599, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/jof7080599>>.

ZHOU, D. et al. Extensive genetic diversity and widespread azole resistance in greenhouse populations of *Aspergillus fumigatus* in Yunnan, China. **mSphere**, v. 6, n. 1, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/mSphere.00066-21>>.