

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

**THAIS MOREIRA CLAUDIO**

**SENSIBILIDADE AO FUNGICIDA TEBUCONAZOLE EM *Aspergillus fumigatus*  
ISOLADO DE CAFÉ VERDE PROVENIENTE DE MINAS GERAIS-BRASIL**

**Ilha Solteira  
2026**

**THAIS MOREIRA CLAUDIO**

**SENSIBILIDADE AO FUNGICIDA TEBUCONAZOLE EM *Aspergillus fumigatus*  
ISOLADO DE CAFÉ VERDE PROVENIENTE DE MINAS GERAIS-BRASIL**

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

Nome do orientador

**Prof. Dr. Paulo Cezar Ceresini**

Nome da coorientadora

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Katherin Castro-Rios**

**Ilha Solteira  
2026**

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvida pela Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação

C615s Claudio, Thais Moreira.  
Sensibilidade ao fungicida tebuconazole em aspergillus fumigatus isolado de café verde proveniente de Minas Gerais-Brasil / Thais Moreira Claudio. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2026  
31 f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas) -  
Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, 2026

Orientador: Paulo Cesar Ceresini  
Coorientador: Katherin Castro Rios  
Inclui bibliografia

1. Resistência. 2. Sensibilidade. 3. Fungicida. 4. Azólicos. 5. Café verde. 6. Tebuconazol.

Elaborada por Raiane da Silva Santos - CRB-8/9999

## ATA DE DEFESA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

### SENSIBILIDADE AO FUNGICIDA TEBUCONAZOLE EM *Aspergillus fumigatus* ISOLADO DE CAFÉ VERDE PROVENIENTE DE MINAS GERAIS-BRASIL


#### THAIS MOREIRA CLAUDIO

##### 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)  Documento assinado digitalmente  
KATHERIN CASTRO RIOS  
Data: 28/01/2026 15:52:27-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>  
Nome: Katherin Castro Rios

2ª EXAMINADOR  Documento assinado digitalmente  
KARINE ASSIS COSTA  
Data: 28/01/2026 12:20:48-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>  
Nome: Karine Assis Costa

3ª EXAMINADOR  Documento assinado digitalmente  
IGOR PAIVA RAMOS  
Data: 28/01/2026 12:04:58-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>  
Nome: Igor Paiva Ramos

#### CONCEITO

( X ) Aprovado

( ) Reprovado

Ilha Solteira - SP, 28 de Janeiro de 2026.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos **meus pais**, por todo o incentivo, confiança e apoio incondicional ao longo dessa trajetória. O suporte de vocês foi essencial para que esta etapa tivesse um início e, agora, uma conclusão. Sem vocês, nada disso seria possível. Ao meu irmão, pelo carinho, apoio e amor incondicional.

À minha grande amiga de longa data, **Ana Luisa de Oliveira Azevedo**, por estar ao meu lado mesmo à distância, compartilhando tanto os momentos de alegria quanto os de dificuldade. Agradeço pela compreensão diante das minhas ausências e pelo apoio fundamental para a conclusão deste trabalho.

Agradeço imensamente ao meu esposo **Luis Eduardo Fernandes Rezende** por me apoiar, me dar suporte emocional e aguentar essa carga durante todos esses anos, fazendo meus dias mais felizes e aconchegantes e por sempre acreditar no meu potencial.

Aos meus companheiros de laboratório, em especial **Arla Ramalho da Cruz e Maria Clara Shiroma Buri**, por estarem sempre ao meu lado, oferecendo auxílio, companheirismo e tornando os dias no laboratório mais leves e agradáveis.

Quanto à equipe do Laboratório de Fitopatologia, agradeço pelos ensinamentos, pela convivência e pelas experiências compartilhadas, que contribuíram significativamente tanto para o meu crescimento acadêmico quanto pessoal.

À minha co-orientadora, por quem tenho imenso carinho **Katherine Castro Rios**, pela paciência, dedicação, orientação e pelas valiosas contribuições que foram fundamentais para a minha formação acadêmica.

Ao meu orientador, **Paulo Cezar Ceresini**, pela orientação, pelos ensinamentos e por sempre acreditar no meu potencial para o desenvolvimento e conhecimento científico.

Por fim, agradeço à Coordenadoria de Ações Afirmativas, Diversidade e Equidade (CAADI), pelo apoio que possibilitou a realização deste trabalho.

Agradeço a **Jeová Deus** por nunca me abandonar, por me fortalecer nos momentos mais difíceis, concedendo-me força, perseverança e discernimento ao longo de toda essa trajetória. Mesmo diante de lutas, batalhas e perseguições, Sua presença constante tornou possível seguir adiante, trabalhar com dignidade e conquistar oportunidades dentro da academia. Sou grata por cada aprendizado, por cada porta aberta e por toda sustentação que tornou esta etapa possível.

*“Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajosa! Não se apavore, nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar.”  
(Josué 1:9)*

## RESUMO

O café constitui uma das principais *commodities* do Brasil, com elevada relevância econômica, social e produtiva, contribuindo significativamente para a geração de empregos e renda. Em razão da complexidade da cadeia produtiva do café, torna-se essencial o monitoramento da presença de fungos patogênicos e termotolerantes ao longo das etapas de produção e armazenamento. O presente estudo teve como objetivo identificar fungos patogênicos associados ao café e avaliar o comportamento de *Aspergillus fumigatus* frente ao fungicida agrícola tebuconazol em isolados de café verde provenientes de Minas Gerais, Brasil. As análises evidenciaram a ocorrência de fungos do gênero *Aspergillus* spp., com destaque para *Aspergillus fumigatus*. Essa espécie apresenta elevada importância médica, estando associada ao desenvolvimento de doenças causadas por *Aspergillus* spp., como a aspergilose broncopulmonar alérgica, que pode apresentar taxas de mortalidade entre 50% e 100% em pacientes imunocomprometidos, especialmente no período pós-pandemia da COVID-19. Os resultados demonstraram diferenças significativas no comportamento de *Aspergillus fumigatus* frente ao tebuconazol, evidenciando a importância da adoção de boas práticas agrícolas e a necessidade de ampliação de estudos sobre a sensibilidade e resistência de fungos patogênicos aos antifúngicos utilizados na agricultura, considerando o potencial risco de resistência cruzada com antifúngicos de uso clínico. Conclui-se que o monitoramento fúngico na cadeia produtiva do café é essencial para a segurança alimentar e a saúde pública.

**Palavras-chave:** resistência; sensibilidade; fungicida; azólicos; café verde, tebuconazol, *Aspergillus* spp.

## ABSTRACT

Coffee is one of the main commodities in Brazil, with high economic, social, and productive relevance, significantly contributing to employment and income generation. Due to the complexity of the coffee production chain, monitoring the presence of pathogenic and thermotolerant fungi throughout the stages of production and storage is essential. This study aimed to identify pathogenic fungi associated with coffee and to evaluate the behavior of *Aspergillus fumigatus* in response to the agricultural fungicide tebuconazole in green coffee isolates from Minas Gerais, Brazil. The analyses revealed the occurrence of fungi of the genus *Aspergillus* spp., with emphasis on *Aspergillus fumigatus*. This species has high medical relevance and is widely associated with diseases caused by *Aspergillus* spp., such as allergic bronchopulmonary aspergillosis, which may present mortality rates ranging from 50% to 100% in immunocompromised patients, especially in the post-COVID-19 pandemic period. The results demonstrated significant differences in the behavior of *Aspergillus fumigatus* in response to tebuconazole, highlighting the importance of adopting good agricultural practices and the need for further studies on the sensitivity and resistance of pathogenic fungi to antifungals used in agriculture, considering the potential risk of cross-resistance with clinically used antifungals. It is concluded that fungal monitoring in the coffee production chain is essential for food safety and public health.

**Keywords:** resistance; sensitivity; fungicide; azoles; green coffee, tebuconazole, *Aspergillus* spp..

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	- Grão de Café Verde adquiridas de Minas Gerais .....	16
<b>Figura 2</b>	- Amostras dos grãos de café organizados em placas de petri.....	17
<b>Figura 3</b>	- Identificação molecular por eletroforese em gel .....	19
<b>Figura 4</b>	- Avaliação de sensibilidade das amostras ao tebuconazol.....	20

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b>	- Crescimento relativo vs dose de Tebuconazol. ....	24
------------------	---	----

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	- Amostra de café verde .....	15
<b>Tabela 2</b>	- Primers específicos para <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	18
<b>Tabela 3</b>	- Frequência dos fungos isolados em café .....	20
<b>Tabela 4</b>	- Resultado ANOVA dos isolados de café verde - Gênero.....	22

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

AI	Aspergilose Invasiva
ANOVA	Análise de Variância
BDA	Ágar Batata Dextrose
ABPA	Aspergilose Broncopulmonar Alérgica
CIM50/MIC50	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
MG	Minas Gerais
PCR	Reação de Cadeia Polimerase
SP	São Paulo
UFC	Unidade de Formação de Colônias
DMIs	Inibidores da desmetilação

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
2.1	Gênero <i>Aspergillus</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	14
2.2	Contaminação ambiental e Ciclo de vida do <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	15
2.3	Resistência à fungicidas azólicos.....	16
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	16
3.1	Coleta de amostras de café verde.....	16
3.2	Análise Microbiológica.....	17
3.3	Isolamento microbiológico e nomeação dos isolados .....	18
3.4	Extração de DNA e Identificação molecular .....	19
3.5	Avaliação da resistência/sensibilidade aos azóis dos isolados de <i>A. fumigatus</i> de café verde.....	20
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	21
4.1	Análise microbiológica das amostras de café verde .....	21
4.2	Teste de Sensibilidade ao Tebuconazol.....	23
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	26
5.1	Análise microbiológica das amostras de café verde.....	26
5.2	Teste de Sensibilidade ao Tebuconazol.....	27
5.3	Possíveis mutações e resistência.....	28
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	29
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	31

## 1. INTRODUÇÃO

O café destaca-se como uma das *commodities* agrícolas mais comercializadas em escala global, figurando entre os primeiros lugares tanto em volume de produção quanto em valor econômico. Nesse contexto, o Brasil consolida-se como o maior produtor e exportador mundial de café (Organização Mundial do Café, 2020). Essa liderança evidencia a significativa contribuição econômica do café para o Brasil, conforme destacado por Hamdouche (2015). Em 2020, a estimativa da safra brasileira foi impulsionada pela bialidade positiva, resultando em uma produção de 63,08 milhões de sacas, um aumento de 27,9% em relação a 2019. Em Minas Gerais, o maior estado produtor, a safra totalizou 34,65 milhões de sacas (Conab, 2020). Entretanto, em 2021, houve uma queda na produção de café no Brasil, enquanto os preços médios mensais têm mantido uma tendência de alta desde novembro de 2020, influenciados pela diminuição da produção e pelo aumento da demanda global em 2021/22 (Conab, 2022). Além disso, a perspectiva de ocorrência do fenômeno climático "La Niña" aumentou, o que contribuiu para a valorização do café, pois esse fenômeno tende a prejudicar a produção no Brasil. Considerando essas projeções de exportações e o impacto econômico para o país, torna-se crucial assegurar a qualidade deste produto Hamdouche (2015)..

Mesmo que a indústria do café seja altamente próspera, é essencial reconhecer algumas nuances cruciais sobre o desenvolvimento, processamento e os desafios técnicos contemporâneos na produção deste grão (Hamdouche Y., 2015). Isso inclui uma compreensão mais aprofundada das características organolépticas do café, como aroma, sabor, acidez e corpo, que desempenham um papel fundamental na qualidade e na apreciação da bebida para muitos consumidores. A ausência de tratamento adequado ao longo das etapas de produção do café, especialmente durante a fase de secagem, que envolve o contato direto dos grãos com o ar e o solo, pode aumentar a suscetibilidade à contaminação por fungos (Duris D., 2010; Nganou, 2020). Além disso, condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento microbiano podem facilitar a disseminação de agentes nocivos nos grãos de café, favorecendo a proliferação de microrganismos. Esse cenário compromete a qualidade sanitária e comercial do produto, podendo resultar em prejuízos econômicos significativos para a cadeia produtiva do café (Duris D., 2010; Nganou *et al.*, 2020).

Os procedimentos de tratamento pós-colheita do café, como a secagem, são uma parte essencial de várias etapas da cadeia produtiva, geralmente ocorrendo imediatamente após a colheita e antes do beneficiamento final dos grãos. Suárez-Quiroz *et al.* (2004) conduziram

uma avaliação das etapas dos processos de obtenção do café verde, constatando contaminação fúngica de 80%, 72% e 90% nos processos úmidos, mecânicos e secos, respectivamente. Eles observaram que a prevalência da contaminação ocorre principalmente por fungos dos gêneros *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., presença de leveduras e outros fungos adaptados a condições úmidas. Culliao & Barcelo (2015) também avaliaram uma ampla diversidade fúngica associada às fases de colheita e pós-colheita em amostras de café verde e café cereja, encontrando uma taxa de contaminação de 75% durante a colheita e 100% na pós-colheita, especialmente durante o processo de secagem ao sol, que é suscetível à contaminação fúngica. Além disso, a contaminação fúngica em grãos de café é influenciada pelas características ambientais das regiões produtoras, como clima, altitude e condições edafoclimáticas, bem como pelos tipos de manejo e tratamentos adotados ao longo da cadeia produtiva. Essas variações regionais podem determinar diferenças significativas na composição e na abundância das colônias fúngicas associadas ao café (Nganou, 2020).

Foi observado, em Cavite, nas Filipinas, que amostras de café verde apresentaram frequência de contaminação por *Aspergillus* spp. de 86% quando submetidas à esterilização superficial, enquanto atingiram 100% de contaminação quando a esterilização não era realizada (Alvindhia & Guzman 2016). Também foram identificados a presença de isolados de *Aspergillus* spp. pertencentes às seções *Fumigati* e *Circumdati* (Viegas *et al.* 2017). De modo consistente, os fungos mais prevalentes ao longo das etapas de produção e colheita do café pertencem predominantemente aos gêneros *Aspergillus* spp., e *Penicillium* spp., (Nakajima *et al.*, 1997). Quando a proliferação fúngica não é devidamente controlada, ocorrem fermentações indesejáveis, resultando na formação de metabólitos secundários prejudiciais à saúde humana, como as ocratoxinas (Azevedo., 2019). A ocratoxina A (OTA) apresenta alta incidência durante os processos pré-colheita, pós-colheita e armazenamento. Esta micotoxina possui potencial neurotóxico, hepatotóxico, nefrotóxico e carcinogênico, representando um sério risco para a saúde humana e também afetando negativamente a economia dos países produtores (Corrêa *et al.*, 2019).

As doenças por *Aspergillus* spp., têm como principal via de infecção a inalação de conídios pelas vias respiratórias (Dos Santos, 2020). A exposição ambiental resulta em contaminação, enquanto a colonização ou infecção humana depende da plasticidade adaptativa do fungo, expressa por: (i) respostas fisiológicas transitórias (ex.: formação de biofilmes), (ii) mutações genéticas que levam à adaptação e resistência aos antifúngicos clínicos e agrícolas (Acampamentos *et al.*, 2012; Hagiwara *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2021).

Os humanos inalam cerca de 100 conídios de *Aspergillus fumigatus* diariamente (Latge *et al.*, 1999 Citado Por Zhang *et al.*, 2021), porém trabalhadores agrícolas estão expostos a cargas 10x superiores devido à manipulação direta de grãos e folhas contaminadas (Viegas *et al.*, 2017). Em indivíduos imunocompetentes, o epitélio das vias aéreas e os macrófagos alveolares elimina eficientemente esses conídios. Contudo, nos imunocomprometidos, especialmente no cenário pós COVID-19, a germinação dos conídios pode desencadear aspergiloses (Van De Veerdonk *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2021).

O uso intensivo de tebuconazol (fungicida triazol) na cafeicultura exerce pressão seletiva sobre *A. fumigatus*, favorecendo linhagens com mutações no gene *cyp51A* - principal mecanismo de resistência a azóis (Zhang *et al.*, 2021). Embora os fungicidas inibidores da desmetilação (DMIs) (como os triazóis) sejam eficazes contra fungos fitopatogênicos invasivos, sua ação preventiva em grãos armazenados é comprometida pelo desenvolvimento de resistência em fungos saprófitos como *A. fumigatus* (Kano *et al.*, 2014; O'Neill, 2015).

Este trabalho visa avaliar a contaminação por *Aspergillus fumigatus* sensível ao tebuconazol em café verde provenientes de cidades de Minas Gerais, analisando os riscos à saúde humana e impactos econômicos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Gênero *Aspergillus* e *Aspergillus fumigatus*

Com mais de 400 espécies, o gênero *Aspergillus* spp. destaca-se pela sua importância econômica (utilizados na síntese de produtos químicos e produção de enzimas) e resiliência ecológica, sendo organismos capazes de degradar alimentos e produzir aflatoxinas e ocratoxina A - tipos de micotoxinas importantes (Pitt e Hocking, 2022). Colonizando ambientes extremos, desde desertos e regiões polares até altitudes de 2.000 m, graças à capacidade de crescer sob estresse térmico, hídrico e salino (Pitt e Hocking, 2022; Abdel-Azeem *et al.*, 2016). Em agroecossistemas, adaptam-se a cultivos como o café, onde condições pós-colheita (secagem a 40-60°C) favorecem sua proliferação. Esse gênero inclui espécies capazes de causar aspergilose, porém nem todas são patogênicas ao homem (Pitt e Hocking, 2022; Abdel-Azeem *et al.*, 2016).

Dentre as espécies do gênero *Aspergillus* spp., *Aspergillus fumigatus* é o protagonista agente contaminante de alimentos devido à sua onipresença ambiental no solo, matéria orgânica em decomposição, sistemas de ventilação, e especialmente plantações de café em

climas subtropicais (Sugui *et al.*, 2014). São resistentes a estresses com conídios melanizados suportando radiação UV, dessecação e temperaturas de até 70°C (Latgé, 1999) e dispersão eficiente com esporos assexuados que viajam >500 km por correntes aéreas (Zhang *et al.*, 2021).

*Aspergillus fumigatus* é o principal causador das manifestações clínicas, variando desde formas leves até condições graves, em um espectro que inclui aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) - resposta imunológica a conídios inalados; aspergiloma - bola fúngica em cavidades pulmonares pré-existentes; aspergilose pulmonar crônica - colonização progressiva em pacientes com comorbidades e aspergilose invasiva aguda (AI) - disseminação hematogênica com mortalidade >50% (Latgé, 1999; Zhang *et al.*, 2021).

## **2.2 Contaminação ambiental e Ciclo de vida do *Aspergillus fumigatus***

A contaminação humana ocorre principalmente pela via aérea e sua morfologia potencializa a inalação e deposição nos seios nasais e árvore brônquica, que são os sítios primários para o desenvolvimento de aspergilose invasiva (AI) (Mesquita-Rocha, 2019). Devido sua elevada plasticidade genética ocorrem três mecanismos reprodutivos, sendo a reprodução assexuada gerando clones através dos conídios (estruturas de dispersão primária), reprodução sexuada envolvendo a fusão de linhagens parentais compatíveis, produzindo ascósporos e o ciclo parassexual que promove a recombinação genética via fusão de hifas aneuploides, sem meiose (Verweij *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2021).

No ambiente, os esporos assexuados de *Aspergillus fumigatus* permanecem em estado de dormência até encontrarem condições adequadas, e quando ativados incham e germinam em hifas, formando um micélio colonizador que produz corpos de frutificação (conidióforos) (Sugui *et al.*, 2014; Latgé *et al.*, 2019). Cada conidióforo gera até 10<sup>4</sup> conídios/dia, garantindo dispersão massiva (Sugui *et al.*, 2014; Latgé *et al.*, 2019). Sua elevada variabilidade genética permite seleção de cepas adaptadas a pressões ambientais, como exposição a azólicos agrícolas. Essa adaptação pode levar a fenótipos de resistência multi-azólica, complicando terapias clínicas (Sugui *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2021).

## **2.3 Resistência a fungicidas azólicos**

Diante dos estudos de Zhang *et al.*, (2021), *Aspergillus fumigatus* precisa de modificações genéticas ou plasticidade fenotípica para obter sucesso em colonizar hospedeiros humanos e sobreviver em ambientes com constante mudança. Acredita-se que a

exposição a fungicidas agrícolas (como tebuconazol) seleciona cepas fúngicas com mecanismos de resistência preexistentes (ex: mutações em CYP51 ou superexpressão de bombas de efluxo) (Zhang *et al.*, 2021). A resistência associada a uma mutação no gene CYP51 e sua região motora é 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).

A pressão seletiva nos campos agrícolas pode levar a fenótipos de resistência multi-azólica, já que os triazóis agrícolas e clínicos compartilham o mesmo alvo molecular, comprometendo a eficácia de antifúngicos médicos (Bastos *et al.*, 2021), sendo voriconazol, isavuconazol, itraconazol e posaconazol, as primeiras escolhas para a realização de tratamentos contra a aspergilose (Etienne *et al.*, 2021; De Moraes *et al.*, 2022; Serpa, Faradiba Sarquis *et al.*, 2024 ) Essa preferência ocorre devido à baixa toxicidade e alta eficácia desses fármacos e o surgimento de resistência a esses antifúngicos compromete o tratamento por doenças de *A.fumigatus* (Fraaije *et al.*, 2020).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta das amostras de café verde

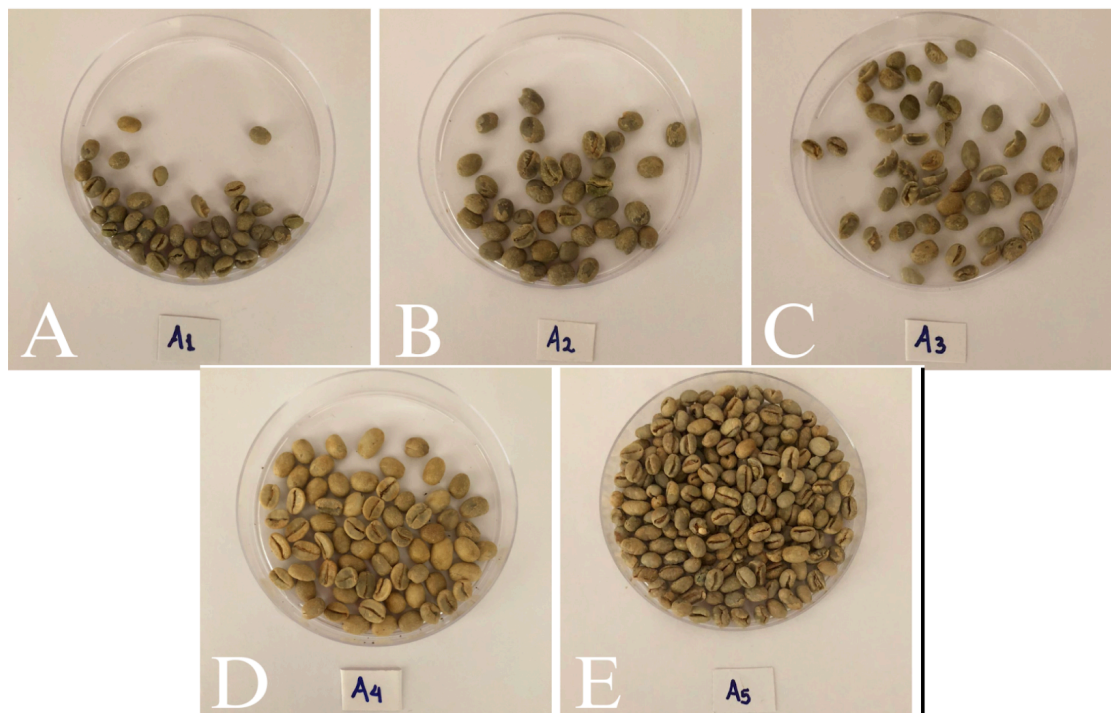
Foram utilizadas cinco amostras de café verde (Tabela 1 e Figura 1) provenientes de cidades de Minas Gerais - Brasil. Todos os produtos exibiram um adequado estado de conservação e apresentavam-se dentro do prazo de validade sem violação na embalagem, conforme indicado pelo fabricante.

**Tabela 1.** Amostras de café verde provenientes de diferentes municípios do estado de Minas Gerais, Brasil.

Amostra	Marca	Tipo	Origem	Safra
1	Catucaí amarelo	Grão	Araxá - MG	Peneira moka, Safra 2021-2022
2	Catucaí amarelo	Grão	Araxá - MG	Peneira 16 acima, Safra 2021-2022
3	Catucaí amarelo	Grão	Araxá - MG	Peneira 14-15, Safra 2021-2022
4	Catucaí vermelho	Grão	Paraguaçu - MG	Safra 2020-2021

Fonte: Elaboração do próprio autor.

**Figura 1.** A–C: Grãos de café verde da cultivar Catucaí amarelo, provenientes de Araxá, MG, sendo (A) peneira moka, safra 2021–2022; (B) peneira 16 acima, safra 2021–2022; e (C) peneira 14–15, safra 2021–2022. D: Grãos de café verde da cultivar Catucaí vermelho, provenientes de Paraguaçu, MG, safra 2020–2021. E: Grãos de café verde da cultivar Mundo Novo, provenientes de Paraguaçu, MG, safra 2020–2021.



Fonte: Elaboração do próprio autor.

### 3.2 Análise microbiológica

Efetuiu-se os tratamentos das amostras de café verde A1, A2, A3, A4 e A5, sendo nomeados os isolados posteriormente com essa classificação de amostras, (Figura 1) utilizando a metodologia de Pitt e Hocking (2022), sem a desinfecção dos grãos, transferindo-os em grupo de cinco sementes (Figura 2) para as placas de petri (90 x 90 mm) contendo meio batata dextrose ágar (BDA) (KASVI -Espanha) e Chloramphenicol (Sigma-Aldrich, China). Todas as placas foram adequadamente nomeadas e incubadas em um BOD a 25°C e a 37°C por um período de 5-7 dias para as colônias fúngicas poderem crescer.

**Figura 2.** Amostras dos grãos de café verde organizados em cinco grãos em cada placa de petri e seladas com filme PVC.



**Fonte:** Elaboração do próprio autor.

### 3.3 Isolamento microbiológico e nomeação dos isolados

Após o período de incubação das amostras de café para a obtenção das colônias fúngicas, realizou-se a repicagem das mesmas com o objetivo de torná-las puras. As colônias foram transferidas individualmente para placas contendo ágar malte (cada amostra obteve uma réplica) (MEA, Kasvi), utilizando agulhas para maior precisão, esterilizadas com álcool e fogo. As colônias foram incubadas novamente a temperaturas de 37°C por 48 horas. Isso possibilitou a identificação dos fungos até o nível de gênero, identificadas com base em características macroscópicas e microscópicas das colônias (Pitt e Hocking, 2022). A identificação microscópica foi realizada por meio da observação das estruturas fúngicas coradas com azul de algodão, utilizando microscópio óptico com aumento final de 400×. Foram consideradas características compatíveis com *Aspergillus fumigatus* a presença de conidióforos hialinos e lisos, vesículas globosas a subglobosas, parcialmente recobertas por fiáldes dispostas predominantemente em uma única série (unisseriadas), formando cabeças conidiais compactas e colunares, além de conídios globosos a subglobosos, de parede finamente rugosa. Apenas as colônias que apresentaram esse conjunto de características morfológicas foram mantidas para armazenamento a longo prazo. Posteriormente foi realizada a análise molecular para confirmação da espécie.

A quantificação dos fungos foi expressa em Unidades Formadoras de Colônias por Grama (UFC/g), calculadas a partir da contagem das colônias desenvolvidas nas placas de cultivo. O número de colônias observadas foi multiplicado pelo recíproco do fator de diluição utilizado, de modo a corrigir a diluição aplicada à amostra. Em seguida, o valor obtido foi dividido pelo volume de chapeamento, permitindo a padronização dos resultados para a unidade de massa da amostra analisada.

$$\frac{UFC}{g} = \frac{(\text{Número de colônias} * \text{Recíprocas do fator de diluição})}{\text{Volume de chapeamento}}$$

### 3.4 Extração de DNA e Identificação molecular

Os fragmentos de micélio das colônias de *Aspergillus fumigatus* em meio ágar BDA foram coletados e armazenados em tubos eppendorf, posteriormente liofilizados e armazenados a -20°C para a extração de DNA, o qual foi extraído do micélio liofilizado utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA foi quantificado em um espectrofotômetro Nanodrop® 2000c (Thermo Fisher Scientific, EUA).

A identificação de *Aspergillus fumigatus* foi realizada por PCR (Serrano *et al.*, 2011), usando dos primers de  $\beta$ - tubulina e Rodlet A (rodA) (Tabela 2) específicos para a espécie, que amplificam um fragmento de aproximadamente 313 bp.

**Tabela 2.** Primers específicos para *Aspergillus fumigatus*.

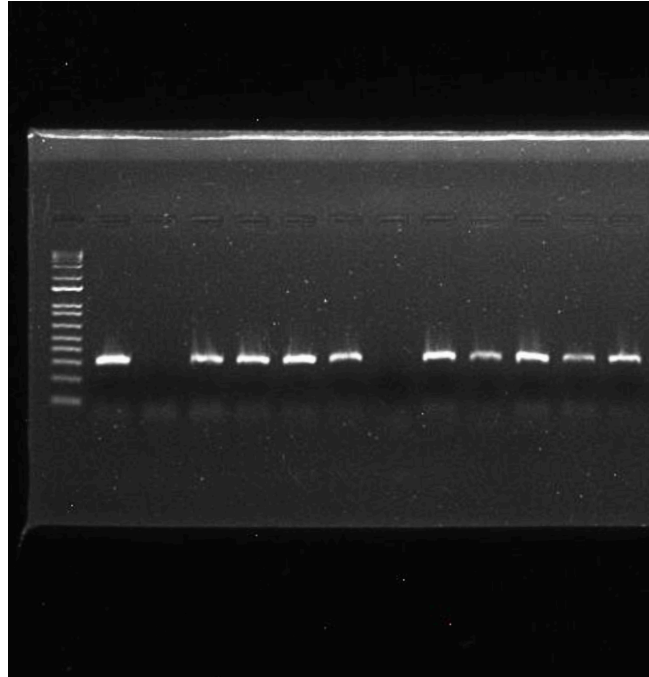
Primers			
$\beta$ -tubulina	F	5'-TGACGGTGATTGGGATCTC-3' e R	
		5'-CGTCCGCTTCTTCTTCCTTTGTGTTTT-3'	
Rodlet A	F	5'-ACATTGACGAGGGCATCCTT-3'	e R
		5'-ATGAGGGAACCGCTCTGATG-3'	

**Fonte:** Elaboração do próprio autor.

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, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C durante 1 min, 68 °C durante 1 min e uma extensão final em 68 °C durante 2 min dos quais os resultados da amplificação foram visualizados utilizando a eletroforese em gel de agarose. Portanto, a identificação molecular

(figura 3) utilizando destes primers é altamente recomendada para *Aspergillus fumigatus* uma vez que eles são específicos para a espécie (Serrano *et al*, 2011).

**Figura 3.** Identificação molecular de *Aspergillus fumigatus* por eletroforese em gel de agarose, evidenciando amplificação positiva do gene  $\beta$ -tubulina.



**Fonte:** Elaborado do próprio autor.

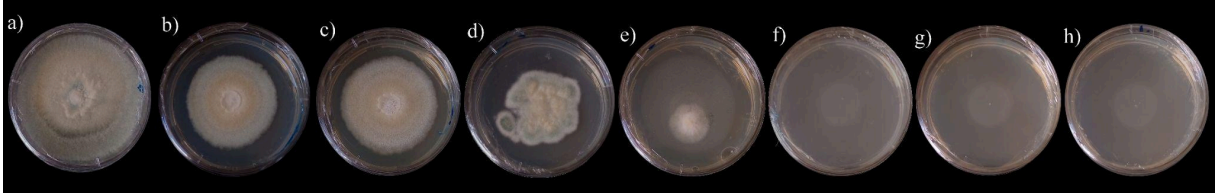
### 3.5 Avaliação da resistência/sensibilidade ao tebuconazol dos isolados de *A. fumigatus* de café verde

Inicialmente os isolados de *A. fumigatus*, foram armazenados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  em discos de papel filtro esterilizados, com diâmetro de 0,5 cm, contendo uma suspensão de esporos. Esses discos foram transferidos para placas contendo meio de cultivo ágar batata-dextrose (BDA, a  $24\text{ g.L}^{-1}$ ) e incubados a uma temperatura de  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por um período de 72 horas. Esse processo tem como objetivo possibilitar o crescimento das colônias.

Após o período de incubação mencionado, pipetou-se 5 mL de Tween 20 em cada placa e esperou-se 5 minutos para a retirada de  $5\text{ }\mu\text{L}$  do líquido das colônias resultantes, essas foram transferidas no centro de novas placas contendo meio BDA suplementado com diferentes concentrações do fungicida tebuconazol determinadas de acordo com a literatura (0, 0,03, 0,5, 2, 4, 8, 16 e  $32\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Em seguida, as placas foram devidamente vedadas e incubadas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por mais 72 horas com o objetivo de quantificar o crescimento micelial das colônias e calcular a inibição relativa em cada dose. Para quantificar o crescimento micelial

de 9 isolados confirmados *A. fumigatus* provenientes de grãos de café verde sob diferentes doses de tebuconazol, mediu-se o diâmetro das colônias em cada placa com auxílio de um paquímetro digital (Brackin *et al.*, 2020).

**Figura 4.** Avaliação do crescimento micelial de *Aspergillus fumigatus* em ensaio de sensibilidade ao fungicida tebuconazol no isolado IA5C5.1, nas concentrações de: A) 0; B) 0,03; C) 0,5; D) 2,0; E) 4,0; F) 8,0; G) 16; e H) 32  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .



Fonte: Elaboração do próprio autor.

Os valores foram transformados em crescimento micelial relativo (%), e por meio desses resultados calculada a concentração efetiva para inibir 50% do crescimento fúngico ( $EC_{50}$ ) estimada utilizando-se o pacote *ec50estimator* atrelada à biblioteca *dcr* do software R studio (R Development Core Team, 2024) para a análise de curva de resposta às doses. Após o cálculo da  $EC_{50}$ , os isolados de *A. fumigatus* foram classificados em diferentes categorias de sensibilidade.

Os dados foram avaliados quanto à normalidade e homogeneidade e, em seguida, analisados por ANOVA ou Kruskal Wallis usando o pacote de software Jamovi versão 1.2 (JAMOV, 2020). As diferenças significativas foram determinadas pelo teste de Tukey ou DSCF pareado com um nível de significância de 5%. Os resultados experimentais foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão, e a unidade experimental para análise dos dados foi a placa.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Análise microbiológica das amostras de café verde

Foram identificados no total 87 fungos isolados de café verde em 100% das amostras, considerando as cinco amostras o gênero *Aspergillus* spp. apresentou uma frequência de 81,6%. Ademais, foram encontrados o gênero *Mucor* spp. e *Rhizopus* spp. Esses dados estão demonstrados na Tabela 3 e gráfico 1. Nem todas as amostras apresentaram todos os gêneros fúngicos.

**Tabela 3.** Frequência dos fungos isolados de grãos de café verde e distribuição dos gêneros fúngicos identificados em cinco amostras provenientes do estado de Minas Gerais, Brasil.

<b>Isolados</b>	<b>N°</b>	<b>Frequência (%)</b>
<i>Aspergillus</i> spp.	71	81,6%
<i>Mucor</i> spp.	11	12,6%
<i>Rhizopus</i> spp.	5	5,7%
Total dos Isolados	87	100%

**Fonte:** Elaboração do próprio autor.

No entanto, os resultados indicam a presença de espécies termotolerantes como *Aspergillus* spp., cujo potencial de produção de micotoxinas é alto, representando risco à saúde do consumidor.

A análise de variância (ANOVA) revelou efeitos estatisticamente significativos da amostra ( $F(4, 77) = 33,094$ ;  $p < 0,001$ ), da temperatura  $37^{\circ}\text{C}$  ( $F(1, 77) = 6,667$ ;  $p = 0,012$ ) e da interação entre amostra e temperatura ( $F(4, 77) = 3,255$ ;  $p = 0,016$ ) sobre o fator gênero. Assim, os resultados obtidos demonstram que há diferença significativa entre as amostras, bem como um efeito isolado da temperatura  $37^{\circ}\text{C}$  sobre o gênero. Além disso, a interação sugere que o efeito de temperatura (as temperaturas testadas foram de  $25^{\circ}\text{C}$  e  $37^{\circ}\text{C}$  mas a temperatura ótima para o crescimento de *Aspergillus* spp. é  $37^{\circ}\text{C}$ ) varia entre as amostras, evidenciando uma ação conjunta entre os dois fatores, representados na tabela 4.

**Tabela 4 -** Resultado ANOVA dos isolados de café verde - Gênero.

	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>df</b>	<b>valor quadrático médio</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Amostra	15.238	4	3.810	33.094	< .001
Temperatura	0.767	1	0.767	6.667	0.012
Amostra*Temperatura	1.499	4	0.375	3.255	0.016

Resíduos	8.864	77	0.115	-	-
----------	-------	----	-------	---	---

**Fonte:** Elaboração do próprio autor.

#### 4.2 Teste de sensibilidade ao tebuconazol

O teste de sensibilidade ao fungicida tebuconazol para os isolados das amostras de café verde foram realizados nos isolados IA5C5.3, IA1C2.1, IA1C1.2, IA5C5.2, IA1C2.2, IA5C5.1, IA3C3, IA3C6 e IA1C1, confirmados *Aspergillus fumigatus* através do ensaio de PCR. Não foram isolados a espécie *Aspergillus fumigatus* para as amostras A2 e A4.

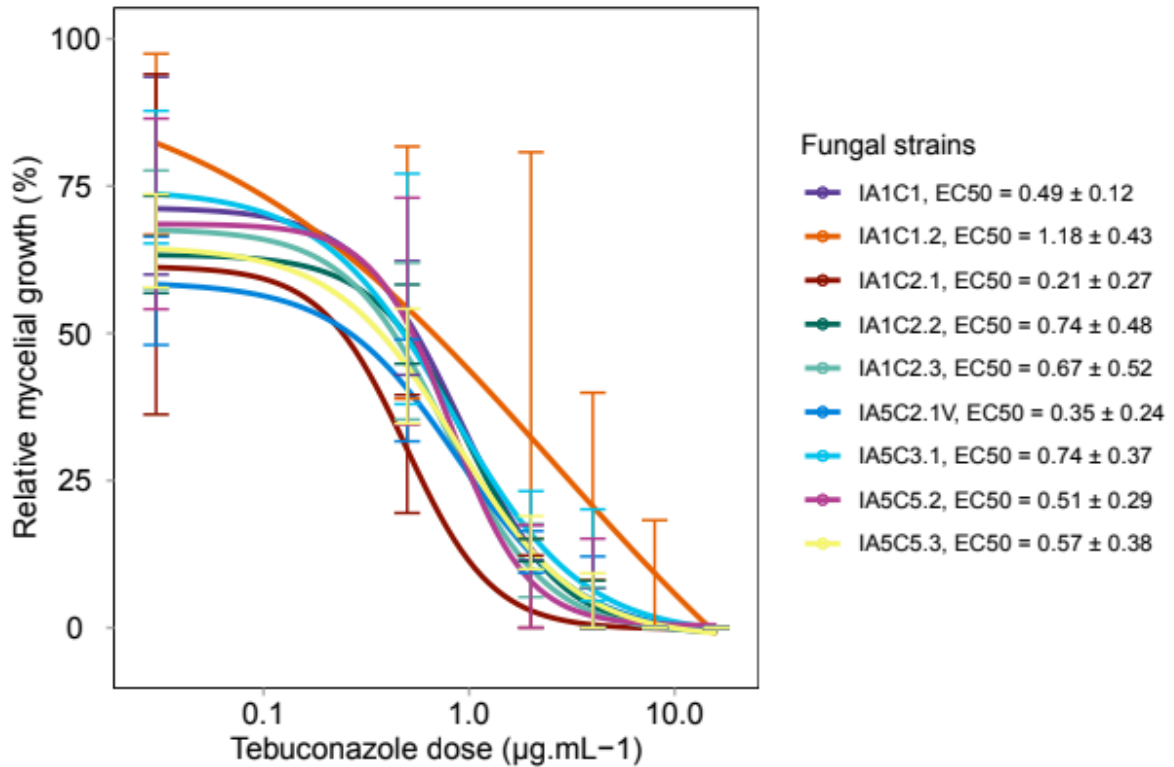
Conforme o protocolo de Brackin *et al.*, (2020) as culturas foram transferidas para placas de petri com meio BDA suplementadas com diferentes concentrações de tebuconazol. Na figura 4 é possível observar o crescimento fúngico do isolado IA5C5.1 nas diferentes concentrações do fungicida.

O gráfico 2 ilustra as curvas dose-resposta para cada isolado. A tendência é que quanto maior for a dose do fungicida, menor o crescimento micelial, confirmando a eficácia do tebuconazol. A inclinação e a posição de cada curva mostram o quão sensível ou resistente cada isolado é.

Comparando quantitativamente os valores de EC50, os isolados com EC50 mais baixos são mais sensíveis ao tebuconazol e isolados com EC50 mais altos são mais resistentes. Considera-se possível resistência ou baixa sensibilidade para o crescimento micelial de *Aspergillus fumigatus* a partir da dose 4 de tebuconazol. Podemos observar que o isolado IA1C1.2, tem um dos maiores EC50s, sugerindo menor sensibilidade ao fungicida. As curvas mostram a redução do crescimento com o aumento da dose de tebuconazol. Isolados com curvas que descem mais cedo e mais rápido (à esquerda), como IA1C2.1 (EC50 = 0.21), são mais sensíveis ao fungicida. Isolados com curvas que descem mais tarde (à direita), como IA1C1.2 (EC50 = 1.18), são mais resistentes. A variação entre os isolados pode indicar diversidade na sensibilidade ao fungicida, algo importante em estudos de controle de patógenos.

Os dados mostram que há variação na sensibilidade ao tebuconazol entre os isolados de *Aspergillus fumigatus* provenientes do café verde. Essa variação é evidenciada pelas diferenças nos valores de EC50 e nas curvas de crescimento. Alguns isolados, como IA1C1.2, apresentam maior resistência, exigindo doses mais elevadas do fungicida para inibir o crescimento, enquanto outros, como IA1C2.1, são altamente sensíveis.

**Gráfico 2** – Crescimento relativo vs dose de Tebuconazol a temperatura 37°C. Cada linha colorida representa um isolado fúngico específico, com o valor de EC50 e o erro padrão indicados na legenda.



**Fonte:** Elaboração do próprio autor.

A análise estatística avaliou a temperatura 37°C, amostra e seus residuais, foi observado diferenças significativas na frequência de aparecimento de gêneros fúngicos para os dados analisados em Temperatura e Amostra x Temperatura ( $p > 0,05$ ) demonstrados na Tabela 4, evidenciando impacto principalmente em *Aspergillus* sp; onde o crescimento foi favorecido à 25°C e 37°C. Portanto o gênero fúngico mais evidente no café verde foi o *Aspergillus* spp., caracterizado por possuir alta adaptabilidade a diversas condições climáticas e ambientais, podendo crescer em altas temperaturas e/ou atividade de água reduzida (Abdel-Azeem *et al.*, 2016).

## 5. DISCUSSÕES

### 5.1 Análise microbiológica das amostras de café verde

A presença dos gêneros *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp. nas amostras de café verde analisadas representa um potencial risco, especialmente na ausência de padrões microbiológicos estabelecidos especificamente para esses fungos. Embora a Instrução Normativa nº 126, de 2022, estabeleça limites microbiológicos para cafés, chás e produtos destinados à infusão, não há valores de referência definidos para esses gêneros identificados no trabalho, dificultando a avaliação sanitária precisa das amostras (Anvisa, 2022).

Os gêneros fúngicos encontrados neste trabalho corroboram os resultados reportados por Suárez-Quiroz *et al.* (2004), que observaram contaminação durante diferentes etapas do processamento do café verde, com predominância de *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., além da presença de leveduras e outros fungos adaptados a condições de elevada umidade. De forma semelhante, o estudo conduzido por Culliao e Barcelo (2015) com amostras de café, também evidenciou elevada frequência de contaminação por *Aspergillus* spp., reforçando a recorrência desse gênero em cadeias produtivas de café.

Em Jaén e San Ignacio, na Cajamarca o pesquisador Tirado *et al.*, (2022) observou grãos de café pergaminho e de café verde, isolando fungos pertencentes principalmente aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, reconhecidos por seu potencial ocratoxigênico. As espécies identificadas incluíram *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. tamaritii*, *A. fumigatus* e *Penicillium citrinum*. Em contraste, nas amostras de café torrado não foi observado crescimento fúngico, o que os autores atribuem ao efeito do processamento térmico e à ação antifúngica da cafeína, que pode inibir o desenvolvimento de diversos fungos associados ao café.

Em relação ao gênero, temperatura e amostra (Tabela 4), foi possível observar que há diferença significativa, bem como a influência específica da temperatura, de forma independente, sobre o crescimento e a ocorrência do gênero. De modo que a interação sugere que o efeito de temperatura varia entre as amostras, evidenciando uma ação conjunta entre os dois fatores, representados na tabela 4, isso possivelmente se deve ao fato de que os membros do gênero *Aspergillus*, que apareceram com mais frequência, comumente encontrados em produtos secos e possuem crescimento rápido em uma ampla faixa de temperatura (ABDEL-AZEEM, 2016).

## 5.2 Teste de sensibilidade ao tebuconazol

Nos resultados de teste de sensibilidade ao tebuconazol, pode-se 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 50% em atividade do patógeno, sendo  $1,18 \mu\text{g.mL}^{-1}$  a mais alta (Gráfico 2).

No trabalho realizado por Meireles *et al.*, (2025) foi exposto *Aspergillus fumigatus* ao tebuconazol a fim de analisar respectivas adaptações dos microrganismos aos triazóis clínicos, visto que ambos (tanto agrícolas quanto medicinais) favorecem uma possível resistência cruzada. Observou-se um aumento significativo no MIC50 (concentração inibitória mínima para inibir 50% do patógeno), sendo 128 vezes maior para o itraconazol após a exposição ao tebuconazol. Corroborando com nossos estudos, Meireles *et al.*, (2025) também identificou a necessidade de um aumento de concentração de até 4 vezes de tebuconazol para inibir o crescimento do fungo. O MIC50 para esses isolados varia de 1 a  $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$  demonstrando adaptação e tolerância ao fungicida agrícola, assim como em nossa pesquisa representada pelo isolado IA1C1.2 cuja EC50 foi a mais alta.

Enquanto Allizond *et al.*, (2021) demonstraram que a exposição prolongada ao tebuconazol pode induzir a resistência cruzada, nossos isolados de café verde avaliados nesta pesquisa apresentaram tanto baixos valores de EC50 quanto maiores, isso indica que há em alguns isolados elevada sensibilidade ao fungicida, porém em alguns isolados a sensibilidade é menor e a tolerância é significativa. De modo que não foram identificadas mutações que conferem a resistência desses isolados e que os EC50 baixos sugerem que as concentrações necessárias para reduzir o crescimento micelial são inferiores às concentrações associadas à seleção de resistência descritas na literatura.

Em contrapartida, alguns resultados contrastam em estudos experimentais que demonstram aumento progressivo das concentrações inibitórias mínimas após exposição prolongada ao tebuconazol, culminando em fenótipos de resistência cruzada a azóis clínicos. Dessa forma, os dados obtidos indicam que, embora o ambiente cafeeiro possa atuar como reservatório potencial para *A. fumigatus*, os isolados analisados não apresentam, no momento da avaliação, sinais de adaptação ou tolerância elevada ao tebuconazol. Contudo, considerando o uso recorrente de fungicidas azólicos na cadeia produtiva do café, esses ambientes podem representar uma condição favorável à seleção futura de isolados menos sensíveis, reforçando a importância do monitoramento contínuo da sensibilidade antifúngica.

A pesquisa de Nganou *et al.*, (2020) observou uma alta diversidade de fungos após a secagens do café, principalmente *Aspergillus fumigatus*, sendo o ar e o solo como vias de contaminação. Culliao e Barcelos (2015) já mencionados neste trabalho avaliaram a

contaminação por fungos em café verde e cerejas, sendo *Coffea arabica*, *Coffea canephora* var. robusta nas Filipinas, encontrando 75% de contaminação na colheita e 100% na pós-colheita devido à etapa de secagem solar, já que *A. fumigatus* cresce melhor em climas quentes. O armazenamento de alimentos após a colheita é uma etapa importante para a segurança alimentar, no entanto, essa etapa é vulnerável por essas questões de contaminação.

Dito isso, é de extrema importância desenvolver medidas preventivas contra essas contaminações fúngicas, visto que o crescimento desses microrganismos que causam doenças em humanos, animais e plantas atingem uma alta taxa de mortalidade por aspergiloses entre 50% a 100%, devido ao número limitado de antifúngicos eficazes.

### 5.3 Possíveis mutações e resistência

Os antifúngicos azólicos atuam inibindo a enzima esterol 14 $\alpha$ -desmetilase (Cyp51), essencial para a biossíntese do ergosterol, componente fundamental para a manutenção da estrutura e da permeabilidade da membrana celular fúngica. Na espécie *A. fumigatus*, o gene Cyp51A é o principal alvo dos azóis, e diversas cepas desenvolveram resistência em decorrência de mutações nesse gene, nossos estudos não detectaram nenhuma mutação que confere a resistência ao fungicida agrícola tebuconazol.

Em nossa pesquisa não foi encontrada nenhuma mutação que confere a resistência em amostras de café verde. Porém, é importante ressaltar que há presença de *Aspergillus fumigatus* em grãos durante as etapas pós-colheita e de processamento, sugerindo que os esporos fúngicos podem persistir durante a secagem e o armazenamento. De modo que a infusão em altas temperaturas possa reduzir a viabilidade do fungo, necessita de mais pesquisas para determinar se a exposição do consumo de café apresenta riscos significativos à saúde (Castro-Ríos *et al.*, 2025). A presença de *Aspergillus fumigatus* em ambientes agrícolas, como em plantações de café tem sido amplamente documentada. Kouadio *et al.*, (2013) isolaram e identificaram fungos presentes em grãos de café encontrando várias espécies de *Aspergillus* spp. De forma semelhante, Viegas *et al.*, (2017) ao avaliarem 28 amostras de grãos de café verde provenientes da África, América Central e do Sul e Ásia, observaram alta contaminação pela mesma espécie.

O crescimento observado nos isolados em concentrações superiores a 4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  indica a necessidade de investigações adicionais sobre o perfil de sensibilidade da espécie aos azólicos, apontando um alerta de que essa linhagem possa se tornar um problema no futuro.

Santos *et al.*, (2020) não identificou mudança significativa após exposição aos fungicidas, mas o valor de MIC foram diferentes, entre sensíveis e baixa sensibilidade. Esses

achados sugerem uma pressão seletiva exercida pelo uso de azóis, que podem favorecer o surgimento de fenótipos resistentes. A faixa de concentração testada variou entre 0,03 a 16 mg/L, com 100% de inibição do crescimento após 24h a 35°C.

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).

Como demonstrado anteriormente, a resistência de *Aspergillus fumigatus* a fungicidas azólicos agrícolas é uma questão importante, de modo que essa espécie de fungo é um patógeno significativo que pode causar doenças graves como aspergiloses. Portanto, é necessário pesquisas para compreender a relação entre a resistência de *Aspergillus fumigatus* a azóis agrícolas e as possíveis causas dessa resistência.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente pesquisa revelou que as amostras de café verde proveniente de cinco cidades de Minas Gerais apresenta alta taxa de contaminação fúngica, com predominância do gênero *Aspergillus* spp, principalmente a espécie *Aspergillus fumigatus*, correspondendo com os dados da literatura onde apontam o café como um importante reservatório ambiental de fungos termotolerantes e potencialmente patogênicos. A presença desse gênero reforça a influência das etapas de processamento, em pós-colheita e especialmente secagem e armazenamento, que são críticas para contaminação microbiológica, uma vez que estão em contato direto com o solo, ar e condições ambientais ótimas para o crescimento do fungo.

Os resultados demonstraram um efeito significativo que a temperatura exerce, de forma isolada, quanto em interação com as amostras analisadas, beneficiando o desenvolvimento de *Aspergillus* spp., em concordância com a elevada capacidade desse gênero a locais quentes e de baixa umidade. Portanto, a ausência de limites microbiológicos para a espécie na legislação vigente dificulta a avaliação sanitária do café verde, representando uma brecha frente aos riscos à saúde pública.

Além da importância desse fungo como contaminante alimentar, o estudo demonstrou-o como agente de relevância clínica, especialmente em contextos de exposição ocupacional. O teste de sensibilidade ao fungicida tebuconazol revelou a variação entre os

isolados, com valores distintos de EC50, indicando perfis diferentes de sensibilidade. Embora a maioria dos isolados apresentaram sensibilidade ao fungicida, foi observada um crescimento micelial em concentrações superiores a  $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , sugerindo a presença de fenótipos com tolerância aumentada.

Mesmo que não tenha sido detectadas mutações associadas à resistência ao tebuconazol nos isolados testados, os dados obtidos indicam que o ambiente cafeeiro pode atuar como um local favorável à seleção natural de linhagens menos sensíveis, sobretudo considerando o uso recorrente de fungicidas triazóis na agricultura. Ressaltando a emergência de uma possível resistência cruzadas aos azóis clínicos, gerando um problema significativo para a saúde humana.

Portanto, os resultados deste trabalho ressaltam a importância de um monitoramento contínuo de contaminações fúngicas e testes de sensibilidade em grãos de café verde, bem como a adoção de boas práticas agrícolas.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-AZEEM, A. M. et al. Biodiversity of the genus *Aspergillus* in different habitats. In: GUPTA, V. K. *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering*. Amsterdam: Elsevier, 2016. p. 3–28.
- ALLIZOND, V. et al. Exposure to the agricultural fungicide tebuconazole promotes *Aspergillus fumigatus* cross-resistance to clinical azoles. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v. 26, p. 1–8, 2021.
- ALVINDIA, D. G. et al. Survey of Philippine coffee beans for the presence of ochratoxigenic fungi. *Mycotoxin Research*, v. 32, n. 2, p. 61–67, 2016.
- ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada n. 60, de 2019. Brasília, 2019.
- ARASTEHFAR, A. et al. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis: from basics to clinics. *Studies in Mycology*, v. 100, p. 100115, 2021.
- AZEVEDO, B. C. Qualidade de bebida e contaminações por fungos em grãos de *Coffea arabica* em diferentes sistemas de colheita e pós-colheita sob manejo orgânico. 2019. Dissertação (Mestrado em Agricultura Orgânica) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2019.
- 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.
- CAMPOS, C. A. P. Fungicidas agrícolas azólicos e pressão seletiva de fenótipos resistentes em *Aspergillus fumigatus*. 2019.
- CASAS-JUNCO, P. P. et al. Determination of potentially mycotoxigenic fungi in coffee (*Coffea arabica* L.). *Food Science and Biotechnology*, v. 27, n. 3, p. 891–898, 2017.
- CASTELLA, G. et al. Molecular characterization of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 25, n. 1, p. 74–83, 2002.
- CASTRO-RÍOS, K. et al. *Aspergillus fumigatus* na cadeia de produção de alimentos e resistência a azóis. *Journal of Fungi*, v. 11, n. 4, p. 252, 2025.
- CULLIAO, A. G. L.; BARCELO, J. M. Fungal and mycotoxin contamination of coffee beans. *Food Additives & Contaminants*, v. 32, n. 2, p. 250–260, 2015.
- DE MORAIS, S. S.; BADIN, R. C. Isavuconazol: um novo fármaco para o tratamento da aspergilose invasiva. *Revista Brasileira de Revisão de Saúde*, v. 4, p. 16644–16655, 2022.
- DURIS, D. et al. Ochratoxin A contamination of coffee batches from Kenya. *Food Additives & Contaminants*, v. 27, n. 6, p. 836–841, 2010.
- FRAAIJE, B. et al. The multi-fungicide resistance status of *Aspergillus fumigatus*. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, 2020.

- GÓMEZ-SALAZAR, J. A. et al. Postharvest strategies for decontamination of aflatoxins. *Food Reviews International*, 2021.
- HAMDOUCHE, Y. Discriminação dos processos de processamento pós-colheita de cacau e café por análise da ecologia microbiana. 2015. Tese (Doutorado) – Universidade de Montpellier II, Montpellier, 2015.
- JAMOVI. The jamovi project. Versão 1.2. 2020.
- KANO, R. et al. Does farm fungicide use induce azole resistance in *Aspergillus fumigatus*? *Medical Mycology*, v. 53, n. 2, p. 174–177, 2014.
- KOUADIO, I. A. et al. Effect of Robusta coffee cherries drying on contamination by fungi. *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, n. 6, p. 1969–1979, 2012.
- NAKAJIMA, M. et al. Survey of aflatoxin B1 and ochratoxin A in coffee beans. *Food and Agricultural Immunology*, v. 9, n. 2, p. 77–83, 1997.
- NGANOU, N. D. et al. Fungal diversity and evaluation of ochratoxin A. *Journal of Food Quality*, 2020.
- O’GORMAN, C.; FULLER, H.; DYER, P. Discovery of a sexual cycle in *Aspergillus fumigatus*. *Nature*, v. 457, p. 471–474, 2009.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. *Fungi and food spoilage*. New York: Springer, 2009.
- SANTOS, J. S. et al. Identificação de espécies fúngicas anemófilas de potencial patogênico. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso – Biomedicina.
- Shiroma Buri MC, Castro-Ríos K, Ramalho da Cruz AD, Claudio TM, Ceresini PC. A One Health Perspective on *Aspergillus fumigatus* in Brazilian Dry Foods: High Genetic Diversity and Azole Susceptibility. *Journal of Fungi*. 2026; 12(1):72. <https://doi.org/10.3390/jof12010072>
- SUÁREZ-QUIROZ, M. et al. Study of ochratoxin A-producing strains in coffee processing. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 39, n. 5, p. 501–507, 2004.
- TIRADO, J.; LUJÁN, M. Fungos potencialmente ocratoxigênicos isolados de café. *Revista Científica Dékamu Agropec*, v. 3, n. 2, p. 1–13, 2022.
- VIEGAS, C. et al. Fungal contamination in green coffee beans. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, v. 80, n. 13–15, p. 719–728, 2017.
- ZHANG, J. et al. Azole-resistance development in *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Fungi*, v. 7, n. 8, p. 599, 2021.