



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
UNIDADE ACADÊMICA DE SAÚDE
CURSO BACHARELADO EM FARMÁCIA**

WESLEY MORAIS DE ARAÚJO

**SUBSTRATOS GASTOS DE *Pleurotus* spp. COMO UMA NOVA ABORDAGEM DE
SAÚDE ÚNICA PARA COMBATER *Aspergillus flavus* MICOTOXIGÊNICOS**

**CUITÉ - PB
2025**

WESLEY MORAIS DE ARAÚJO

**SUBSTRATOS GASTOS DE *Pleurotus* spp. COMO UMA NOVA ABORDAGEM DE
SAÚDE ÚNICA PARA COMBATER *Aspergillus flavus* MICOTOXIGÊNICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Bacharelado em
Farmácia do Centro de Educação e Saúde da
Universidade Federal de Campina Grande –
Campus Cuité, como requisito obrigatório para
obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira

CUITÉ-PB

2025

A663s Araújo, Wesley Morais de.

Substratos gastos de *Pleurotus* spp. como uma nova abordagem de saúde única para combater *Aspergillus flavus* micotoxigênicos. / Wesley Morais de Morais. - Cuité, 2025.

65 f.: il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, 2025.

"Orientação: Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira".

Referências.

1. Atividade antifúngica. 2. Resistência antifúngica. 3. Saúde única. 4. Segurança alimentar. 5. Milho - plantio. 6. *Aspergillus flavus*. 7. Fungicida agrícola. 8. Centro de Educação e Saúde. I. Pereira, Fillipe de Oliveira. II. Título.

CDU 635.8(043)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CNPJ nº 05.055.128/0001-76

UNIDADE ACADEMICA DE SAUDE - CES
Sítio Olho D'água da Bica, - Bairro Zona Rural, Cuité/PB, CEP 58175-000
Telefone: (83) 3372-1900 - Email: uas.ces@setor.ufcg.edu.br

DECLARAÇÃO

Processo nº 23096.012719/2025-33

WESLEY MORAIS DE ARAÚJO

**SUBSTRATOS GASTOS DE Pleurotus spp. COMO UMA NOVA ABORDAGEM DE SAÚDE ÚNICA PARA O
MANEJO DE Aspergillus flavus MICOTOXIGÊNICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Farmácia da Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Aprovado em: 19/03/2025.

BANCA EXAMINADORA

Profª Fillipe de Oliveira Pereira

Orientador(a)

Profª Toshiyuki Nagashima Junior

Avaliador(a)

Profª Artur Alves Rodrigues da Silva

Avaliador(a)



Documento assinado eletronicamente por **FILLIPE DE OLIVEIRA PEREIRA, PROFESSOR(A) DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 01/04/2025, às 15:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **ARTUR ALVES RODRIGUES DA SILVA, TECNICO DE LABORATORIO AREA**, em 01/04/2025, às 17:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **TOSHIYUKI NAGASHIMA JUNIOR, PROFESSOR 3 GRAU**, em 02/04/2025, às 10:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ufcg.edu.br/autenticidade>, informando o código verificador **5350767** e o código CRC **760450A0**.

Referência: Processo nº 23096.012719/2025-33

SEI nº 5350767

Aos meus pais Carlos e Judélia, que sempre fizeram o possível e o impossível por mim e que mesmo com medo, deixaram eu seguir meu sonho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, por todo o discernimento, todas orações atendidas e por tudo que me foi concedido.

Aos meus pais, Carlos Alberto de Araújo e Judélia Moraes da Silva Araújo, por sempre me apoiarem e incentivarem, por sempre me encorajarem a seguir em frente e buscar conquistar meus sonhos, sem os quais eu nada conseguiria. À minha avó, que sempre se preocupou comigo e que sempre me abençoou. À minha irmã Tamires e meus sobrinhos Enzo Gabriel e Ianne Gabrielle, que sempre acreditaram em mim. Juntos, me ajudaram em cada passo para realizar esta meta.

Ao meu orientador e amigo, prof. Fillipe de Oliveira Pereira, que mesmo sem saber, quando nem eu mesmo acreditava em mim, ele me apresentou ao grupo de pesquisa, acreditou e depositou a confiança de que eu conseguiria realizar este trabalho. Tenho grande admiração pela pessoa e profissional.

À todos os integrantes do Grupo de Pesquisa em Fungos (FUNGI). Todos foram indispensáveis, agradeço por todo o apoio e ensinamento, em especial à Emanuel, Gessymara, Renata e Niellyson (Niel), que me acolheram e me ensinaram desde o primeiro dia no grupo. Assim, gostaria de agradecer a todos os membros dos laboratórios parceiros que colaboraram com a pesquisa.

Aos meus colegas de turma e amigos, que juntamente a mim, surtaram, aproveitaram e viveram intensamente cada período. Mesmo após a pandemia, com o retorno complicado às aulas, tiraram o peso de tudo que estava acontecendo, meu muito obrigado Glória, Lucas, estes estão comigo até o último período no estágio, Joicy, Eziane, Geovanna, Laura, Brena, Maria Eduarda, Luana, Laíse, Anna Júlia, José Neto, Yanka. E a todos os amigos que conquistei ao decorrer do curso.

À minha família do Tambor, todos os que ainda estão no Tambor e aos que já terminaram o curso, mas, umas vez do Tambor, sempre do Tambor. Aos da velha guarda Matteus Pio, Emily, Isa e aos novos integrantes, Gabryel, Caio, Raul, Arthur e Bia. Muito obrigado por todos os cafés da tarde e desabafos.

Ao meu grande amigo e irmão Iago Aragão, muito obrigado por todas as conversas até altas horas, conselhos, desabafos, consideração e por toda paciência. Umas das melhores pessoas que conheci em Cuité e que guardarei sempre na memória os bons momentos.

À todo o corpo docente do curso de Farmácia por todo o conhecimento passado, em especial a Francinalva Medeiros, Bruna Dantas, Toshiyuki Nagashima e Igara Lima, por

contribuírem diretamente com o meu interesse pela pesquisa. Agradeço ainda a Toshiyuki e Artur Alves por aceitarem o convite, pelo tempo e contribuições feitas a este trabalho.

Aos grupos de pesquisa parceiros que tornaram possível este trabalho sendo eles o Observatório de Câncer do Curimataú (OCC), Saúde Planetária, Grupo de Pesquisa & Produção de Cogumelos Comestíveis (GPEC - UFPB), como também a *Universidad Nacional de Asunción* (UNA) no Paraguai, a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e a Universidade Federal de Campina Grande a qual desenvolvi minha pesquisa. Por fim, agradeço a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

A perda de alimentos é uma preocupação global crítica, impactando diretamente a segurança alimentar e a sustentabilidade da produção agrícola. *Aspergillus flavus* desempenha um papel central nesse problema, pois contamina plantações de milho com aflatoxinas, representando riscos à saúde pública e à economia agrícola. O fungicida agrícola carboxin (CBX) enfrenta desafios significativos devido ao surgimento de cepas fúngicas resistentes, exigindo alternativas mais sustentáveis e eficazes. Este estudo buscou investigar a eficácia antifúngica de substratos de cogumelos usados (*Spent Mushroom Substrate* – SMS) de *Pleurotus ostreatus* (SGPo) e *P. djamor* (SGPd), cultivados em folhas de bananeira, quando combinados com CBX no combate a cepas de *A. flavus* isoladas de milho. O estudo envolveu a obtenção e preparo de substratos à base de folhas de bananeira para cultivo dos cogumelos *P. ostreatus* e *P. djamor*. Os cogumelos foram cultivados em condições controladas e seus extratos foram obtidos por maceração em solução hidroalcoólica. O perfil químico dos extratos foi analisado por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN de ^1H), enquanto a presença de amins biogênicas foi avaliada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para análise da atividade antifúngica, os extratos foram testados contra diferentes cepas de *A. flavus*, isoladamente e em associação com Carboxin, utilizando testes de microdiluição para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM). Estudos adicionais avaliaram o efeito dos extratos na germinação de conídios, crescimento micelial e potencial irritante por meio do teste HET-CAM. Os extratos de SGPo e SGPd apresentaram baixos níveis de amins biogênicas e um perfil global analisado por RMN de ^1H , evidenciando a presença de óleos voláteis, ácidos graxos insaturados, polissacarídeos, oligossacarídeos, taninos e flavonoides. As cepas de *A. flavus* analisadas demonstraram resistência à anfotericina B e ao itraconazol. No entanto, SGPo e SGPd exibiram atividade fungicida contra todas as cepas testadas, com valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) variando de 1024 a 2048 mg/L. CBX também demonstrou atividade fungicida, com valores de CIM entre 32 e 512 mg/L. Nenhum antagonismo foi observado entre as combinações CBX+SGPd e CBX+SGPo. Além disso, SGPo e SGPd inibiram significativamente a germinação de conídios e o crescimento micelial, sendo que as combinações CBX+SGPd e CBX+SGPo foram mais eficazes do que os agentes testados individualmente ($p < 0,05$). A redução na germinação de conídios e no crescimento micelial ultrapassou 70% quando os substratos foram aplicados. O potencial de irritação dos agentes foi avaliado por meio do modelo HET-CAM, classificando SGPo e SGPd como irritantes moderados. Os achados deste estudo indicam que SGPo e SGPd podem contribuir para a redução das dosagens e da frequência de aplicação de CBX, promovendo um tratamento antifúngico mais sustentável, com menores riscos ambientais e menor pressão seletiva para o desenvolvimento de resistência. Esses resultados estão alinhados com a abordagem de saúde única, que busca soluções integradas para saúde humana, animal e ambiental.

PALAVRAS-CHAVE: atividade antifúngica, resistência antifúngica, saúde única.

ABSTRACT

Food loss is a critical global concern, directly impacting food security and the sustainability of agricultural production. *Aspergillus flavus* plays a central role in this issue by contaminating maize crops with aflatoxins, posing risks to public health and the agricultural economy. The agricultural fungicide carboxin (CBX) faces significant challenges due to the emergence of resistant fungal strains, highlighting the need for more sustainable and effective alternatives. This study investigates the antifungal efficacy of spent mushroom substrates (*Spent Mushroom Substrate* – SMS) from *Pleurotus ostreatus* (SPoS) and *P. djamor* (SPdS), cultivated on banana leaves, when combined with CBX against *A. flavus* strains isolated from maize. The study involved the preparation of banana leaf-based substrates for the cultivation of *P. ostreatus* and *P. djamor* mushrooms. The mushrooms were grown under controlled conditions, and their extracts were obtained through maceration in a hydroalcoholic solution. The chemical profile of the extracts was analyzed by Proton Nuclear Magnetic Resonance (^1H NMR), while the presence of biogenic amines was assessed using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). For the antifungal activity analysis, the extracts were tested against different *A. flavus* strains, both individually and in combination with Carboxin, using microdilution assays to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC). Additional studies evaluated the effect of the extracts on conidial germination, mycelial growth, and their irritant potential through the HET-CAM test. SPoS and SPdS extracts exhibited low levels of biogenic amines and a global profile analyzed by ^1H NMR, revealing the presence of volatile oils, unsaturated fatty acids, polysaccharides, oligosaccharides, tannins, and flavonoids. The analyzed *A. flavus* strains showed resistance to amphotericin B and itraconazole. However, SPoS and SPdS demonstrated fungicidal activity against all tested strains, with Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values ranging from 1024 to 2048 mg/L. CBX also exhibited fungicidal activity, with MIC values between 32 and 512 mg/L. No antagonism was observed between CBX+SPdS and CBX+SPoS combinations. Moreover, SPoS and SPdS significantly inhibited conidial germination and mycelial growth, with CBX+SPdS and CBX+SPoS proving to be more effective than individual agents ($p < 0.05$). The reduction in conidial germination and mycelial growth exceeded 70% when substrates were applied. The irritation potential of these agents was assessed using the HET-CAM model, classifying SPoS and SPdS as moderate irritants. The findings of this study suggest that SPoS and SPdS could contribute to reducing CBX dosages and application frequency, promoting a more sustainable antifungal treatment with lower environmental risks and reduced selective pressure for resistance development. These results align with the *One-Health* approach, which seeks integrated solutions for human, animal, and environmental health.

KEYWORDS: antifungal activity; antifungal resistance, *One-Health*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação do *One Health*.

Figura 2 - *Aspergillus flavus* cultivado em placa de Ágar Sabouraud.

Figura 3 - Estruturas químicas das aflatoxinas .

Figura 4 - Estrutura química do Carboxin.

Figura 5 - Esquema ilustrativo do procedimento de preparação dos extratos.

Figura 6 - Esquema ilustrativo do procedimento de preparação do inóculo fúngico.

Figura 7 - Esquema ilustrativo do procedimento da determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

Figura 8 - Esquema ilustrativo do procedimento da determinação da concentração fungicida mínima (CFM).

Figura 9 - Esquema ilustrativo do procedimento de estudo de associação.

Figura 10 - Esquema ilustrativo do procedimento de estudo de germinação de conídios.

Figura 11 - Esquema ilustrativo do procedimento de estudo de crescimento micelial.

Figura 12 - Esquema ilustrativo do procedimento de análise do potencial irritante.

Figura 13 - Espectros de RMN de ^1H de (A) Substrato Gasto de *Pleurotus djamor* (SGPd) e (B) Substrato Gasto de *Pleurotus ostreatus* (SGPo) cultivados em substratos de folhas de bananeira.

Figura 14 - Espectros de RMN de ^1H do Substrato Gasto *Pleurotus djamor* (SGPd). R1. Região entre 0,5-1,7 ppm. R2. Região entre 1,8-2,9 ppm. R3. Região entre 3,0-5,5 ppm. R4. Região entre 5,6-8,5 ppm.

Figura 15 - Espectros de RMN de ^1H do Substrato Gasto *Pleurotus ostreatus* (SGPo). R1. Região entre 0,5-1,7 ppm. R2. Região entre 1,8-2,9 ppm. R3. Região entre 3,0-5,5 ppm. R4. Região entre 5,6-8,5 ppm.

Figura 16 - Efeitos do Substrato Gasto de *Pleurotus djamor* (SGPd), Substrato Gasto de *Pleurotus ostreatus* (SGPo), Carboxin (CBX) e combinações na taxa de germinação de conídios de *Aspergillus flavus* AS27 (A) e *Aspergillus flavus* AS118 (B).

Figura 17 - Efeitos do Substrato Gasto de *Pleurotus djamor* (SGPd), Substrato Gasto de *Pleurotus ostreatus* (SGPo), Carboxin (CBX) e combinações no crescimento radial micelial de *Aspergillus flavus* AS27 (A) e *Aspergillus flavus* AS118 (B).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características das cepas de <i>Aspergillus flavus</i> utilizadas neste estudo.....	27
Tabela 2 - Graus de fenômenos vasculares observados na membrana corioalantóica até o momento do aparecimento.....	30
Tabela 3 - Grau final segundo o potencial de irritabilidade no método HET-CAM.....	31
Tabela 4 - Conteúdo de aminas biogênicas nos Substratos Gastos de <i>Pleurotus djamor</i> (SGPd), Substratos Gastos de <i>Pleurotus ostreatus</i> (SGPo).....	35
Tabela 5 - Perfil de sensibilidade de antifúngicos convencionais usados na prática clínica contra <i>Aspergillus flavus</i>	35
Tabela 6 - Valores de CIM e CFM (g/L) do Substrato Gasto de <i>Pleurotus djamor</i> (SGPd), Substrato Gasto de <i>Pleurotus ostreatus</i> (SGPo) e Carboxin (CBX) contra <i>Aspergillus flavus</i>	37
Tabela 7 - Estudo de associação do Substrato Gasto de <i>Pleurotus djamor</i> (SGPd) ou Substrato Gasto de <i>Pleurotus ostreatus</i> (SGPo) com Carboxin (CBX) contra <i>Aspergillus flavus</i>	38
Tabela 8 - Potencial irritante do Substrato Gasto de <i>Pleurotus djamor</i> (SGPd), Substrato Gasto de <i>Pleurotus ostreatus</i> (SGPo) e Carboxin (CBX) sozinhos e em combinação.....	42

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Percentual
®	Marca Registrada
<	Menor que
°C	Grau Celsius
µL	Microlitro
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
µm	Micrômetro
mm	Milímetro
cm	Centímetro
h	Hora
g	Grama
g/L	Grama por Litro
mg/L	Miligrama por Litro
mg/Kg	Miligrama por Quilograma
ASG	Ágar Sabouraud Glicose
atm	Pressão Atmosférica
ppm	Partes por Milhão
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
CES	Centro de Educação e Saúde
CCM	<i>Colección de Cultivos de Microorganismos</i>
UNA	<i>Universidad Nacional de Asunción</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionada
CBX	Carboxin

DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>et al.</i>	e Colaboradores
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônia por Mililitro
SGPd	Substrato Gasto de <i>Pleurotus djamor</i>
SGPo	Substrato Gasto de <i>Pleurotus ostreatus</i>
AFB	Aflatoxina B
AFM	Aflatoxina M
AFG	Aflatoxina G

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
3.1 ONE-HEALTH.....	17
3.2 FUNGOS CONTAMINANTES DE ALIMENTOS.....	18
3.2.1 <i>Aspergillus flavus</i>	19
3.3 CONTROLE DAS INFECÇÕES FÚNGICAS NOS ALIMENTOS.....	21
3.4 SUBSTRATO GASTO DE COGUMELO (SMS).....	23
4 METODOLOGIA.....	25
4.1 OBTENÇÃO DO SGPo E SGPd.....	25
4.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DE SGPo E SGPd.....	25
4.3 PERFIL QUÍMICO GLOBAL DE EXTRATOS DE SGPd E SGPo.....	26
4.4 ANÁLISE DE AMINAS BIOGÊNICAS.....	26
4.5 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	27
4.5.1 DROGAS.....	27
4.5.2 INÓCULO FÚNGICO.....	27
4.5.3 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	29
4.5.4 CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM).....	30
4.5.5 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO.....	31
4.5.6 GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS.....	31
4.5.7 CRESCIMENTO MICELIAL.....	32
4.5.8 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IRRITANTE.....	33
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
5 RESULTADOS.....	36
6 DISCUSSÃO.....	47
7 CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS.....	53
APÊNDICE A.....	63
APÊNDICE B.....	64

1 INTRODUÇÃO

A perda de alimentos é uma preocupação global urgente que demanda atenção e ação imediata. A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação estima que 1,3 bilhão de toneladas de alimentos são perdidas ou desperdiçadas a cada ano, sendo cerca de 13% dos alimentos produzidos perdidos entre a colheita e o varejo. Os fungos na agricultura são considerados uma das principais ameaças bióticas à perda global de alimentos, particularmente em culturas essenciais de calorias e commodities. (Fones *et al.*, 2020; Gai; Wang, 2024).

As espécies de *Aspergillus*, são uma parte significativa desse problema. A sua capacidade de impactar a qualidade sensorial e nutricional dos produtos alimentícios, estão à mercê visto sua capacidade de prosperar em qualquer ponto da cadeia alimentar e em diversas condições. *Aspergillus flavus* é um patógeno oportunista que pode infectar uma variedade de grãos, incluindo milho, amendoim, arroz e nozes. (Abbas *et al.*, 2009). Juntamente a isso, sua capacidade de produzir aflatoxinas resistentes a várias etapas do processamento de alimentos, representando uma grave preocupação com a segurança alimentar. Dentre seus compostos tóxicos, destacam-se muitos análogos e derivados de aflatoxinas, sendo as aflatoxinas B1, B2, G1, G2 e M1 as que representam maior risco alimentar devido aos seus efeitos mutagênicos e cancerígenos. (Ayofemi Olalekan Adeyeye, 2020; Jallow *et al.*, 2021).

Várias estratégias são empregadas para minimizar a contaminação por aflatoxinas, incluindo a utilização de sistemas alternativos de cultivo e agroquímicos (fungicidas), sendo estes a principal ferramenta para controlar populações fúngicas e reduzir a densidade do inóculo, o que justifica sua utilização no manejo de *A. flavus* na agricultura (Abbas *et al.*, 2009; Gibellato *et al.*, 2021).

Nessa perspectiva, o Carboxin (5,6-diidro-2-metil-1,4-oxatiína-3-carboxanilida) é um fungicida agrícola heterocíclico comumente utilizado contra *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus* pela disfunção da succinato desidrogenase e da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial em células fúngicas (Yang *et al.*, 2011). Embora o carboxin (CBX) tenha atividade de amplo espectro, ele apresenta um risco médio-alto de surgimento de cepas resistentes. O uso extensivo de fungicidas na agricultura, incluindo CBX, ftalimidas, QoIs/estrobilurinas, imidazóis e triazóis, expõe fungos ambientais a agentes antifúngicos, promovendo a evolução e o desenvolvimento de resistência (Fisher *et al.*, 2022).

Em consequência, os consumidores ficam expostos a um risco significativo de ingerir vestígios de resíduos de fungicidas, além de organismos resistentes a medicamentos, o que pode afetar diretamente os tratamentos clínicos, tornando-os ineficazes e representando uma grave ameaça à saúde pública (Verweij *et al.*, 2022). O aumento de microrganismos resistentes é um componente essencial da abordagem de saúde única, principalmente considerando a relação entre o uso de fungicidas na agricultura e o surgimento de cepas resistentes a antifúngicos que afetam animais e humanos. As infecções causadas por espécies de *Aspergillus* resistentes a azólicos podem ser intratáveis com os medicamentos disponíveis atualmente, resultando em taxas elevadas de morbidade e mortalidade. (Jørgensen *et al.*, 2021; Sen *et al.*, 2022). À vista disso, visando alcançar uma abordagem de saúde única, vê-se a aplicação de produtos sustentáveis e naturais para controlar a infecção por *A. flavus*: o substrato gasto de cogumelo (SMS) de *Pleurotus ostreatus* (SGPo) e *P. djamor* (SGPd) cultivados em folhas de bananeira.

O substrato gasto de cogumelo (SMS) é um subproduto do cultivo de cogumelos comestíveis, cuja sua composição pode variar, podendo ser a base de resíduos agrônômicos, como folhas de bananeira, bagaço de cana-de-açúcar, palha de arroz, restolho de milho, borra de café, etc. (Caballero *et al.*, 2024; Carrasco-Cabrera; Bell; Kertesz, 2019). Grandes quantidades de subprodutos de SMS podem ser geradas, e o seu descarte inadequado pode levar a problemas ambientais, como contaminação do solo, poluição do ar e da água, ressaltando a importância de métodos de descarte adequados (Mohd Hanafi *et al.*, 2018).

No presente, o cultivo de cogumelos, quando inserido em um sistema de economia circular, busca ofertar alternativas plausíveis de uso que busquem minimizar os impactos ambientais. (Cunha Zied *et al.*, 2020; El-Ramady *et al.*, 2022). Juntamente a isto, para atingir uma abordagem de saúde única, busca-se apresentar pela primeira vez a aplicação de produtos sustentáveis e naturais para controlar a infecção por *A. flavus*: o substrato de cogumelo gasto (SMS) de *Pleurotus ostreatus* (SGPo) e *P. djamor* (SGPd) cultivados em folhas de bananeira, o qual sua aplicação biotecnológica como agente antifúngico ainda não foi amplamente estudada.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação antifúngica dos extratos de substratos gastos de cogumelos comestíveis (SMS) *P. ostreatus* e *P. djamor*, assim como seu potencial efeito modulador frente ao carboxin contra *Aspergillus flavus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

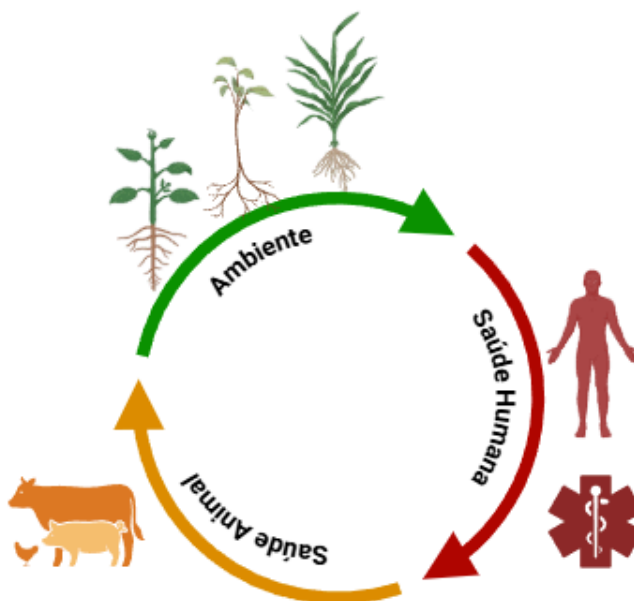
- Obter os extratos hidroalcóolicos das amostras de substratos gastos de *P. ostreatus* e *P. djamor* cultivados em substratos feitos de folhas de bananeira;
- Caracterizar quimicamente os extratos de SGPo e SGPd;
- Mensurar o potencial irritante dos extratos de SGPo e SGPd;
- Avaliar a associação dos SGPo e SGPd com Carboxin;
- Avaliar a atividade antifúngica dos extratos de SGPo e SGPd contra *Aspergillus flavus*.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 ONE-HEALTH

O termo *One-Health* tem sido difundido através dos anos e se refere à interconectividade entre a saúde ambiental, animal e humana, sendo uma abordagem colaborativa, multissetorial e interdisciplinar para definir e enfrentar problemas globais (Jeleff *et al.*, 2022), como mostrado na Figura 4. Tais problemas estão associados a doenças emergentes e reemergentes influenciadas pelas perturbações climáticas e pelo aumento na variedade de hospedeiros, como doenças tóxicas negligenciadas e doenças zoonóticas, impactando a segurança alimentar global, como também a saúde do meio ambiente compartilhado.

Figura 1 - Representação do *One Health*.



Fonte: Adaptado de Woods; Mcalister; Geddes-Mcalister, 2023.

Animais significativos para a agricultura, como bovinos, suínos e aves, também estão propensos a infecções fúngicas pelo fato da exposição a reservatórios de solo que abrigam componentes fúngicos. O ar dos cultivos contém concentrações aumentadas de esporos fúngicos, colocando tanto os trabalhadores como os animais em risco de infecção (White *et al.*, 2021). Nestes casos, as infecções fúngicas são comumente tratadas com polienos e antifúngicos azólicos havendo a necessidade de esquemas terapêuticos prolongados

combinados com a natureza fungistática do antifúngico, representando um fator ao desenvolvimento de resistência (Bermas; Geddes-mcalister, 2020).

A eficácia dos medicamentos antifúngicos é ativamente prejudicada pelo desenvolvimento de resistência dentro dos patógenos fúngicos (Woods; Mcalister; Geddes-Mcalister, 2023). Visto que o ambiente representa o maior risco de exposição para os humanos à fúngicos invasivos, onde a disseminação das células fúngicas ocorre por todo o corpo, levando a infecções sistêmicas e doenças fatais. Tais tendências demonstram a vasta transição de cepas antifúngicas suscetíveis para cepas antifúngicas resistentes na clínica, que apresentam obstáculos para o tratamento eficaz de infecções, o que fornece uma base para explorar a relação entre o ambiente, como é o exemplo das culturas agrícolas tratadas com fungicidas e a saúde das águas residuais contaminadas com antifúngicos comerciais (Stevenson *et al.*, 2022).

3.2 FUNGOS CONTAMINANTES DE ALIMENTOS

Os fungos são o segundo grupo de organismos mais rico em espécies e desempenham papéis importantes nos ecossistemas como decompositores, mutualistas e patógenos (Wu *et al.*, 2019). Compreendem um reino morfologicamente, metabolicamente e ecologicamente diverso, sendo essenciais para a saúde ambiental, assim como exercem funções bioquímicas primordiais no cultivo e produção de alimentos e bebidas, ao mesmo passo, os fungos também representam sérias ameaças à saúde ambiental e à segurança alimentar (Horianopoulos *et al.*, 2021).

A ocorrência de doenças fúngicas em cultivos agrícolas têm efeitos diretos e indiretos na saúde humana e na produtividade de alimentos, visto que os fungos patogênicos são responsáveis por epidemias que reduzem o rendimento de grandes culturas, como arroz, trigo e milho, que alimentam bilhões de pessoas (Woods; Mcalister; Geddes-Mcalister, 2023). O desequilíbrio ecológico causado pelas infecções fúngicas na saúde animal também ocasiona crises agrícolas, onde muitas dessas dependem de animais polinizadores para sua mediação (Almeida; Rodrigues; Coelho, 2019).

As infecções fúngicas na agricultura resultam da produção de metabólitos tóxicos, os quais contaminam grãos usados para ração animal, impactando a saúde e o bem-estar do gado bem como a contaminação de alimentos processados para consumo humano (Woods; Mcalister; Geddes-Mcalister, 2023). Essa contaminação ocorre porque uma grande variedade

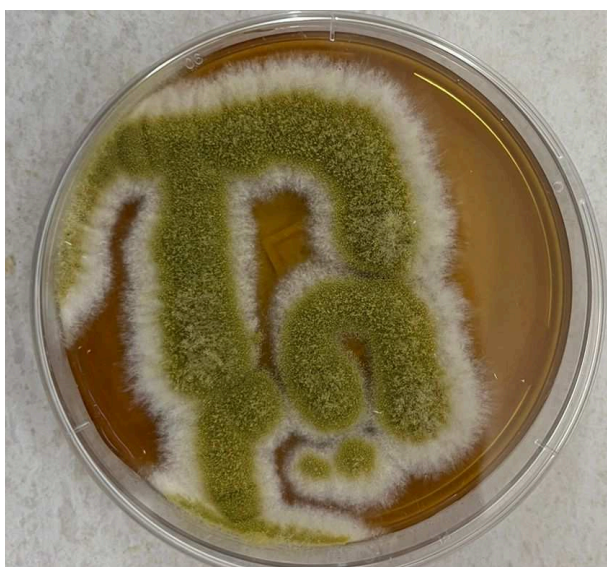
de fungos produz micotoxinas, que são utilizadas como mecanismos de defesa em diferentes condições ambientais. (Eskola *et al.*, 2020).

As micotoxinas podem estar presentes na mais variada gama de produtos agrícolas e alimentícios, sendo mais comum os humanos estarem expostos à alimentos como cereais, produtos a base de cereais e alimentos produzidos por animais expostos a estas micotoxinas (Kochiieru *et al.*, 2020). Entretanto, a contaminação pode ocorrer desde os estágios pré-colheita até os pós-colheita ao longo da cadeia de manejo alimentar, onde estima-se que cerca de 25% das matérias-primas produzidas pela agricultura em todo o mundo estejam contaminadas por fungos e micotoxinas (Leyva Salas *et al.*, 2017).

3.2.1 *Aspergillus flavus*

O gênero *Aspergillus* inclui centenas de espécies as quais podem ser encontradas em ambientes internos e externos, sendo os patógenos clinicamente mais relevantes causadores de infecções fúngicas e produção de micotoxinas (Cadavell *et al.*, 2019; Arastehfar *et al.*, 2020). Destaca-se o *Aspergillus flavus*, por ser um patógeno oportunista que prospera principalmente em culturas de sementes oleaginosas, incluindo nozes, algodão, amendoim e milho, destacando-se como um dos maiores produtores de aflatoxinas (Hamad *et al.*, 2022), mostrados na Figura 2.

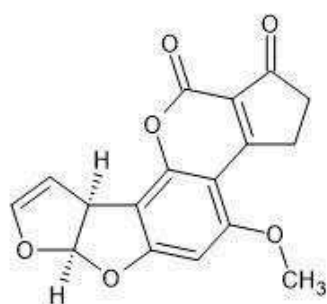
Figura 2 - *Aspergillus flavus* cultivado em placa de Ágar Sabouraud.



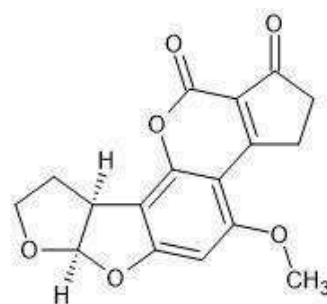
Fonte: Autoria própria.

As aflatoxinas são compostos que podem causar toxicidade aguda, demonstrando ser imunossupressores, mutagênicos, teratogênicos e cancerígenos (Van Egmond; Schothorst; Jonker, 2007). Com isso, a exposição a aflatoxinas pode causar mutações (mutagênese) e cânceres (carcinogênese), especialmente carcinoma hepatocelular. Os impactos oriundos da ingestão de toxinas, como imunossupressão e interferência nutricional, estão atrelados ao impacto da exposição a baixas doses de aflatoxinas por longos períodos de tempo (Ahmed; Bacha; Alhazari, 2019), cujas suas estruturas químicas podem ser visualizadas nas Figuras 3.

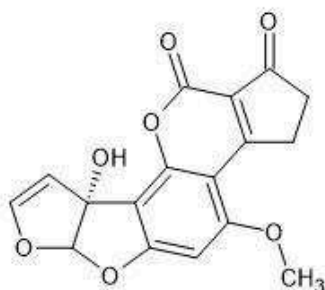
Figura 3 - Estruturas químicas das aflatoxinas .



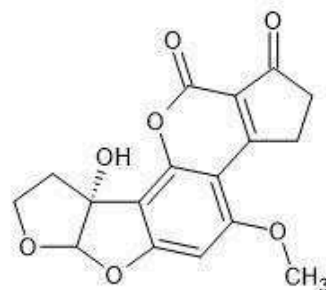
Aflatoxina B1



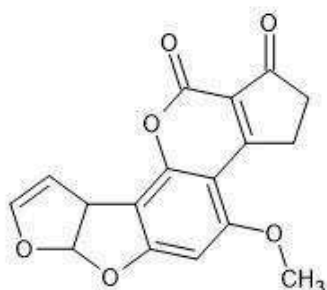
Aflatoxina B2



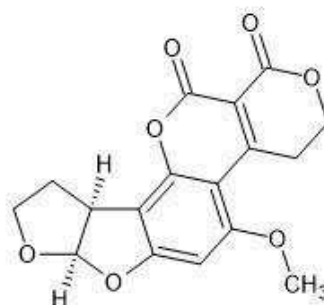
Aflatoxina M1



Aflatoxina M2



Aflatoxina G1



Aflatoxina G2

Fonte: Autoria própria.

A composição das aflatoxinas englobam vinte estruturas policíclicas relacionadas pertencentes a uma classe de compostos conhecidos como furanocumarinas, dentre estas, destacam-se a AFB1 que é uma micotoxina hepatocarcinogênica forte, sendo detectada principalmente em cereais, nozes, grãos e rações, tendo como precursora a esterigmatocistina, a qual é um metabólito tóxico pertencente a poliquetídeos fúngicos (Nevale *et al.* 2021).

AFB1 e AFB2 podem ser convertidas (0,5 - 5%) em AFM1 e AFM2, através da hidroxilação do carbono terciário do anel de difuranocumarina, com isso, o grupo hidroxila (-OH) promove o aumento da solubilidade em água, acarretando a fácil excreção através do leite, após a ingestão por animais de ração contaminada. (Hamad *et al.*, 2023; Awuchi *et al.*, 2021; Nevale *et al.* 2021; Becker-Algeri *et al.*, 2016).

3.3 CONTROLE DAS INFECÇÕES FÚNGICAS NOS ALIMENTOS

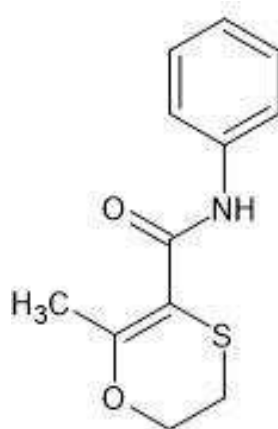
A importância de buscar reduzir ao máximo as perdas de alimentos através do controle da contaminação fúngica em todas as etapas das cadeias de processamento de alimentos é cada vez mais necessária (Leyva Salas *et al.*, 2017). Dentre as distintas classes de pesticidas, os fungicidas incluem tanto agentes físicos, como químicos e/ou biológicos destinados a combater microrganismos fúngicos em manejos de culturas, além de utilizar outras técnicas como rotação de culturas, uso de cultivares resistentes e preparo do solo (Krupinsky *et al.*, 2002; James, 2015).

O uso de fungicidas contra doenças fúngicas de plantas melhora o rendimento, a qualidade e a vida útil das culturas (Lucas; Hawkins; Fraaije, 2015). Como principais agentes antifúngicos utilizados na agricultura podem ser citados benzimidazóis, ditiocarbamatos, estrobilurinas e especialmente triazóis (E Ribas, 2016; Hof 2001). Os triazóis são absorvidos e translocados na planta, onde agem preventivamente (antes da infecção) ou curativamente (na presença de sintomas) afetando diretamente no crescimento micelial, inibindo a biossíntese do ergosterol, um componente fundamental da membrana celular dos fungos, o que interfere no seu crescimento e reprodução (Buchenauer, 1987).

Fungicidas da classe do Ditiocarbamato, diferentemente dos triazóis, consistem em pesticidas não sistêmicos os quais possuem mecanismo de ação através do contato, onde acabam por interferir no metabolismo celular dos fungos (Fanjul-Bolado *et al.*, 2020). Além destes, os fungicidas de estrobilurina se ligam especificamente ao sítio de oxidação do quinol (Qo) do Citocromo B bloqueando a transferência de elétrons e, consequentemente, impedindo a produção de energia necessária para o crescimento do microrganismo (Feng *et al.*, 2020).

O tratamento com fungicidas sistêmicos é uma prática de manejo integrado de diversas culturas agrícolas (Ayesha *et al.*, 2021). O Carboxin (5,6-di-hidro-2-metil-1,4-oxatiina-3-carboxanilida), mostrado na Figura 4, foi o primeiro fungicida desta classe, sendo um fungicida sistêmico heterocíclico, o qual foi introduzido no mercado em 1966 para prevenir e controlar as doenças das plantas (Brauer *et al.*, 2019). O Carboxin possui mecanismo de ação o qual causa disfunção da succinato desidrogenase (SDH) no ciclo tricarboxílico e na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, inibindo assim a respiração celular nas células fúngicas (Yang *et al.*, 2011).

Figura 4 - Estrutura química do Carboxin.



Fonte: Autoria própria.

O Carboxin pertence a uma classe de drogas que possuem uma atividade de amplo espectro, sendo amplamente utilizado no controle de diversas doenças fúngicas que afetam culturas agrícolas. No entanto, essa característica também o torna suscetível ao desenvolvimento de resistência por parte dos patógenos, uma vez que sua ação se baseia em inibidores que atuam em um único local, tornando-o classificado como um fungicida de risco médio-alto para o surgimento de cepas resistentes (Brauer *et al.*, 2019). Diante disso, a aquisição e o surgimento de resistência aos antifúngicos não são eventos isolados, mas sim uma resposta evolutiva direta à pressão seletiva imposta pelo uso contínuo do medicamento. Isso ocorre porque os fungos que apresentam mutações vantajosas conseguem sobreviver à ação do fungicida, proliferando e tornando-se predominantes na população. (Fisher *et al.*, 2022).

3.4 SUBSTRATO GASTO DE COGUMELO (SMS)

Após a produção do cogumelo, o substrato gasto do cogumelo (SMS) é o principal subproduto do setor da fungicultura. (Cunha Zied *et al.*, 2020; He *et al.*, 2016). O SMS, em parte dos países, é descartado como um resíduo após a colheita do cogumelo. O descarte de grandes quantidades da biomassa pós-cultivo é problemático e insustentável, visto o dilema de poder resultar em impactos ambientais através da contaminação do solo, poluição do ar e da água, representando um desafio significativo para a indústria de cogumelos, pois envolve alto custo e requer um local de descarte apropriado (Zakil *et al.*, 2022).

A composição do substrato gasto consiste principalmente de micélio fúngico residual, uma grande variedade de biomassa lignocelulósica desintegrada, à exemplo da serragem, sabugo de milho, casca de semente de algodão, cama de gado e esterco, palha, cavacos de madeira, e aditivos como gesso, turfa e cal, além de nutrientes, bem como alto nível de matéria orgânica e enzimas (Najafi *et al.*, 2019). Tal composição propicia uma variada gama de aplicações biotecnológicas, como a alternativa para fertilizantes e corretivos de solo, alimentos para animais e em vermicompostagem (Pérez-Chávez; Mayer; Albertó, 2019).

Além disso, o SMS pode ser empregado como matéria-prima para a produção de biocombustíveis, no controle da poluição por ser capaz de biorremediar o solo poluído por contaminantes, como também melhorar a saúde do solo, auxiliando assim na recuperação de terrenos e na revegetação (Ahlawat; Gupta; Kumar, 2007). Devido à sua capacidade de degradar compostos semelhantes à lignina, o SMS também provou ser um agente de biorremediação adequado para corantes, metais pesados, hidrocarbonetos (especialmente hidrocarbonetos aromáticos policíclicos), pesticidas, contaminantes emergentes (ECs) e outros (Leong *et al.*, 2022).

Diante disso, o micélio fúngico excreta várias substâncias úteis para o seu desenvolvimento e, por isso, é provável que esses compostos também estejam presentes no SMS. A exemplo do *P. ostreatus*, segundo maior cogumelo comestível cultivado mais importantes, o qual apresenta uma enzima que suprime o crescimento do micélio aéreo, impedindo o desenvolvimento de diversos fungos patogênicos (Ocimati *et al.*, 2021; Sánchez, 2010). A biomassa resultante do cultivo de *P. ostreatus* também demonstrou um alto potencial em suprimir o impacto da infecção por *Fusarium* na bananeira, não somente de forma competitiva, mas também através de mecanismos de antibiose e predação (Ocimati *et al.*, 2021).

Esses achados indicam que os extratos de SGPo e SGPd podem ser uma fonte promissora para o controle de fungos deteriorantes de alimentos, oferecendo uma alternativa mais segura em comparação com fungicidas químicos encontrados no mercado. Contudo, não foram encontrados estudos sobre a atividade antifúngica do SMS de *P. djamor* e *P. ostreatus* contra *Aspergillus flavus*.

4 METODOLOGIA

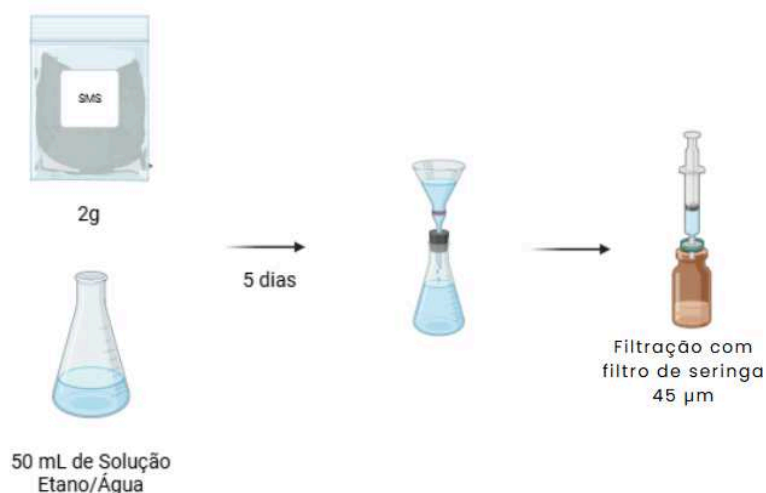
4.1 OBTENÇÃO DO SGPo E SGPd

Inicialmente, os substratos foram preparados com folhas de bananeira (*Musa × Paradisiaca*) com suplementos (10% de serragem e 10% de farelo de trigo) conforme descrito por Medeiros *et al.* (2024), obtidas de produtores locais da cidade de Areia-PB. Eles foram separadamente colhidos, secos à temperatura ambiente até atingirem o estágio quebradiço, triturados em forrageira, peneirados em tela de 2 mm e embalados em sacos de nylon próprio para alimentos. A produção dos cogumelos *P. ostreatus* e *P. djamor* ocorreu em colaboração com o Grupo de Pesquisa Produção de Cogumelos Comestíveis da UFPB (Campus II - Areia-PB). O processo de produção ocorreu nas seguintes condições: as unidades produtivas com os substratos foram inoculados com o micélio fúngico em câmara de fluxo laminar. Em seguida, permaneceram na sala de colonização, sob ausência de luz, por 15 dias. Após a completa colonização micelial, as unidades produtivas foram transferidas para área de indução/frutificação, para ativar o crescimento dos cogumelos. O tempo total de colheita foi de 120 dias, com temperatura (± 28 °C), UR ($\pm 92\%$) e luminosidade (8,5 lumens) (Zárate-Salazar *et al.*, 2020). O material resultante desta etapa de cultivo resultou nos SGPo e SGPd.

4.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DE SGPo E SGPd

Amostras de 2g de SGPo e SGPd frescos foram extraídas por maceração com 50 mL de solução etanol/água (70:30 v/v). O processo de extração aconteceu em temperatura ambiente por 5 dias. Em seguida, os extratos foram submetidos à filtração simples com papel de filtro qualitativo, seguido de filtração com filtro de seringa modelo Nylon 0,45µm, e armazenados sob refrigeração sob abrigo de luz. Os extratos hidroalcólicos de SGPd e SGPo foram concentrados em rota evaporador (Evaporador Rotativo SL-126), acoplado a bomba de vácuo (Exipump), para evaporação do solvente por 7h na temperatura de 50 °C até obtenção do extrato hidroalcoólico bruto (Martínez-Flores; Contreras-Chávez; Garnica-Romo, 2021).

Figura 5 - Esquema ilustrativo do procedimento de preparação dos extratos.



Fonte: Autoria própria.

4.3 PERFIL QUÍMICO GLOBAL DE EXTRATOS DE SGPd E SGPo

A análise foi realizada no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA - UFPB), por Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN de ^1H), de acordo com o método proposto por (Medeiros *et al.*, 2024). Três alíquotas de cerca de 30 mg de cada extrato foram pesadas e solubilizadas com 550 μL de dimetilsulfóxido (DMSO- d_6 , 99,96 átomos % D, contém 0,03% (v/v) TMS). A solução foi transferida para um tubo de RMN (diâmetro interno: 5 mm, comprimento: 7 polegadas) para análise espectral de RMN de ^1H . Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos em um espectrômetro Bruker ASCEND 500 MHz (Bruker, Coventry, Reino Unido) usando os seguintes parâmetros: número de varreduras (8), ganho (101,0), atraso de relaxamento (4,6100), taxa de pulso (8,0000), frequência de pré-saturação (3,36150), tempo de aquisição (3,2768). Os deslocamentos químicos para todas as amostras foram referenciados ao sinal do solvente DMSO- d_6 , 2,50 ppm. Os espectros foram processados usando o *software* MestReNova[®] (MNova) versão 14.2.0. Os espectros de RMN de ^1H foram pré-processados usando os seguintes procedimentos: referenciamento pelo sinal do solvente, correção da linha de base, correção de fase, alinhamento, normalização pela área total do espectro e remoção do sinal do solvente.

4.4 ANÁLISE DE AMINAS BIOGÊNICAS

A princípio, a extração de aminas de SGPd e SGPo frescos foi realizada usando ácido tricloroacético a 5%. (Cirilo *et al.*, 2003; Vale; Glória, 1997). A separação das aminas foi

conduzida via cromatografia de par iônico em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e quantificação pós-coluna com o-ftalaldeído, seguida de detecção de fluorescência em excitação de 340 nm e emissão de 450 nm. A análise foi realizada em parceria com a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e foram analisadas a presença de dez aminas biogênicas livres: espermina, espermidina, agmatina, putrescina, cadaverina, tiramina, triptamina, feniletilamina, histamina e serotonina. Todos os fármacos padrões serão obtidos da Sigma-Aldrich® (Brasil).

4.5 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

4.5.1 DROGAS

Para a realização deste trabalho, foram utilizados os seguintes antifúngicos: Carboxin, Anfotericina B, Ciclopirox, Griseofulvina, Terbinafina, Fluconazol, Cetoconazol, Itraconazol e Miconazol, sendo todos os antifúngicos obtidos da Sigma-Aldrich® (Brasil). Os antifúngicos convencionais e os extratos de SGPd e SGPo foram diluídos no momento do teste, dissolvendo-os primeiramente em 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e água destilada estéril para obter uma concentração inicial de 4096 mg/L (SPdS e SPoS) e 512 mg/L (antifúngicos convencionais). Em seguida, foram feitas diluições seriadas em meio RPMI 1640 a partir desta concentração para atingir concentrações menores.

4.5.2 INÓCULO FÚNGICO

Para os ensaios de atividade antifúngica, foram utilizadas as seguintes cepas fúngicas: *A. flavus* AS27, *A. flavus* AS29, *A. flavus* AS35, *A. flavus* AS101, *A. flavus* AS103 e *A. flavus* AS118. Essas cepas foram obtidas da “*Colección de Cultivos de Microorganismos de la Universidad Nacional de Asunción*” (CCM-UNA, Paraguai). A caracterização e o perfil micotoxigênico das cepas estão descritos na Tabela 1 (Moura-Mendes *et al.*, 2023). As cepas fúngicas foram mantidas em ágar batata dextrose (Difco®) a 35 °C por cinco dias. Colônias fúngicas frescas foram cobertas com solução salina estéril (0,9% NaCl) contendo 0,1% de Tween 20® e agitadas suavemente. A separação das estruturas fúngicas (hifas e conídios) foi obtida por meio de sedimentação por 15 minutos, e a parte superior da suspensão foi usada para testes de suscetibilidade. Os inóculos foram ajustados com água destilada estéril para $2-5 \times 10^6$ conídios/mL usando um espectrofotômetro a 625 nm com transmitância variando de 70 a 80% e absorbância de 0,08 a 0,13. (Arendrup *et al.*, 2020b).

Tabela 1 - Características das cepas de *Aspergillus flavus* utilizadas neste estudo.

Espécie	Fonte	Código	Origem	ITS	Calmodulin	Perfil Micotoxigênico (MALDI-TOF MS)	
						AFB	AFG
<i>Aspergillus flavus</i>	Grãos de milho avatí-m oroĩ	AS 27	Paraguai	MN48 1412	MN604185	AFB2	AFG1
<i>Aspergillus flavus</i>	Grãos de milho avatí-m oroĩ	AS29	Paraguai	MN48 1413	MN604186	AFB1	ND
<i>Aspergillus flavus</i>	Grãos de milho avatí-m oroĩ	AS35	Paraguai	MN48 1414	MN604187	AFB1	ND
<i>Aspergillus flavus</i>	Grãos de milho avatí-m oroĩ	AS84	Paraguai	MN42 3342	MN393232	ND	AFG1
<i>Aspergillus flavus</i>	Grãos de milho avatí-m oroĩ	AS96	Paraguai	MN42 3340	MN416021	ND	AFG1
<i>Aspergillus flavus</i>	Grãos de milho avatí-m oroĩ	AS101	Paraguai	MN47 8362	MN443169	ND	AFG2
<i>Aspergillus flavus</i>	Grãos de milho avatí-m	AS103	Paraguai	MN47 8363	MN443170	ND	AFG1

	oroï						
<i>Aspergillus flavus</i>	Grãos de milho avati-m oroï	AS118	Paraguai	MN47 8364	MN443171	AFB1	ND

ND: não detectado. AFB: Aflatoxina B. AFG: Aflatoxina G.

Fonte: Moura-Mendes *et al.*, 2023.

Figura 6 - Esquema ilustrativo do procedimento de preparação do inóculo fúngico.

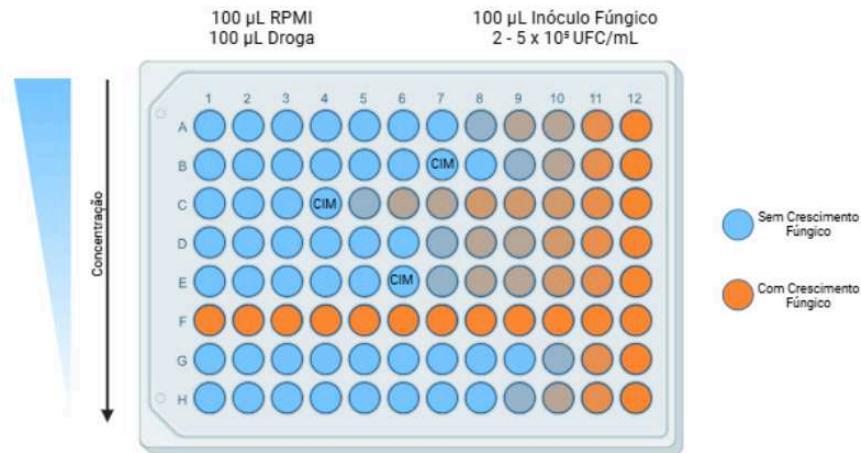


Fonte: Autoria própria.

4.5.3 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A determinação da CIM das drogas-teste, sendo elas isoladas CBX, SGPo, SGPd, e em associação SGPo + CBX e SGPd + CBX, onde foi realizada a técnica de microdiluição (Arendrup *et al.*, 2020b). A suspensão foi então diluída 1:10 em RPMI 1640 para obter a concentração de trabalho do inóculo de $2-5 \times 10^5$ UFC/mL. Em cada linha da placa, foram adicionados 100 μ L das drogas-teste duplamente concentradas e diluídas em RPMI 1640. Em cada cavidade da placa, foram adicionados 100 μ L do inóculo previamente preparado. Um controle negativo (RPMI 1640 + inóculo), um controle com DMSO (DMSO + inóculo + RPMI 1640) foram realizados. As placas foram seladas e incubadas a 36 °C por até 48 horas para a realização da leitura. A CIM é definida como a menor concentração das drogas capaz de inibir completamente o crescimento fúngico quando comparadas às cavidades do controle.

Figura 7 - Esquema ilustrativo do procedimento da determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

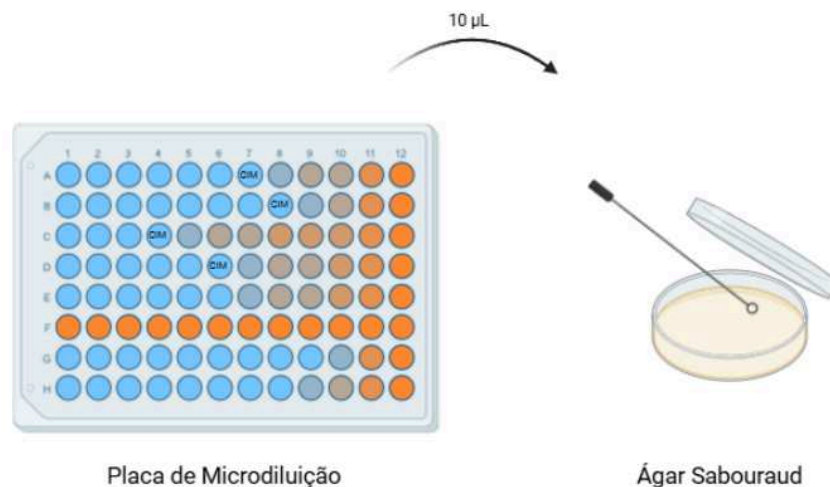


Fonte: Autoria própria.

4.5.4 CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

Para obter a CFM, volumes de 10 µL foram retirados de cada poço sem crescimento fúngico (concentrações maiores que a CIM) em placas de ágar Sabouraud glicose (ASG). As colônias de fungos foram contadas após incubação das placas a 28 °C até 7 dias. A CFM foi a concentração de droga mais baixa que resultou em nenhum crescimento ou em menos de três colônias (99,9% de morte) (De Quadros *et al.*, 2011). A droga possuirá ação fungicida se a proporção de CFM/CIM não exceder um valor de 4, enquanto será considerada fungistática quando CFM/CIM for maior que 4 (Rocha *et al.*, 2024). Os extratos com maior atividade nesta etapa foram usados nas etapas posteriores.

Figura 8 - Esquema ilustrativo do procedimento da determinação da concentração fungicida mínima (CFM).

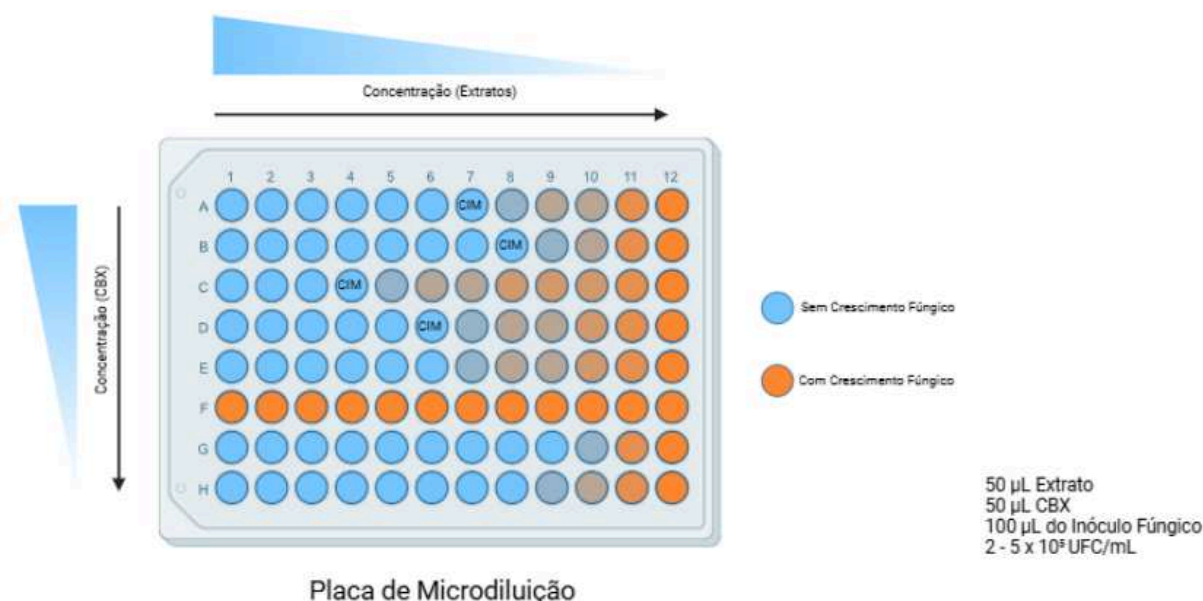


Fonte: Autoria própria.

4.5.5 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO

Etapa realizada conforme descrito por Doern, 2014. Diluições das soluções das drogas-teste (8xCIM, 4xCIM, 2xCIM, CIM, 1/2CIM, 1/4CIM e 1/8CIM) foram feitas em RPMI 1640, com as associações de SGPo + CBX e SGPd + CBX. Após isto, uma alíquota de 50 µL de um dos extratos foi adicionada nos poços da placa no sentido vertical e, em seguida, 50 µL de carboxin foram adicionados no sentido horizontal da placa. Por fim, foram adicionados 100 µL do inóculo. Desta maneira, foram obtidas misturas de diversas concentrações de ambas as drogas. As placas foram seladas e incubadas a 36°C por 48 horas para determinar a CIM. O índice da concentração inibitória fracionada (ICIF) foi calculado através da soma: $CIF^A + CIF^B$, onde A representa o extrato e B o Carboxin. O $CIF^A = CIM^A_{\text{combinado}}/CIM^A_{\text{sozinho}}$, enquanto que $CIF^B = CIM^B_{\text{combinado}}/CIM^B_{\text{sozinho}}$. O ICIF foi interpretado da seguinte maneira: Sinergismo ($< 0,5$), Aditividade ($0,5-1,0$), Indiferença ($> 1,0$ e $< 4,0$) ou Antagonismo ($> 4,0$) (Doern, 2014). As menores CIM das drogas associadas foram utilizadas para os ensaios subsequentes.

Figura 9 - Esquema ilustrativo do procedimento de estudo de associação.



Fonte: Autoria própria.

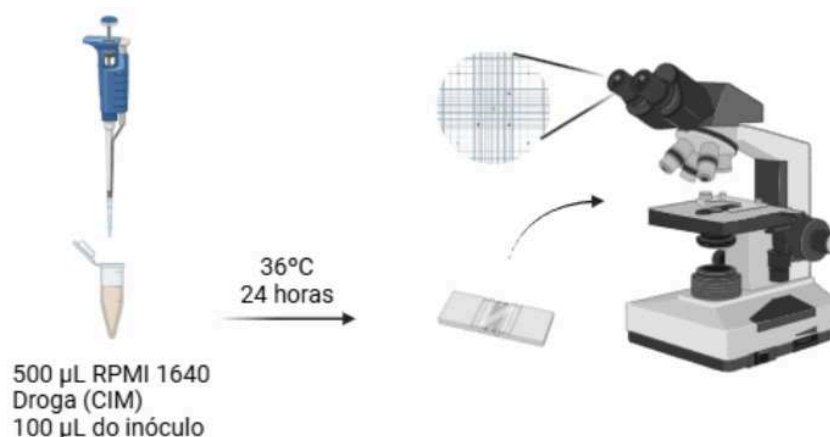
4.5.6 GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS

Para os testes de germinação de conídios, tubos *ependorf* estéreis com 0,5 mL de RPMI 1640 foram misturados com as drogas-teste associadas. Após, 100 µL do inóculo foi adicionado aos tubos e homogeneizados. Os tubos foram incubados a 36°C por 24 horas. Um experimento controle sem adição das drogas foi realizado. As quantidades de conídios

germinados e conídios não germinados foram determinados usando um hemocitômetro. A taxa de germinação foi calculada para cada grupo testado (De Oliveira Pereira; Mendes; De Oliveira Lima, 2013).

$$\text{Taxa de Germinação de Conídios} = \frac{N^{\circ} \text{ de Germinados}}{N^{\circ} \text{ de Germinados e Não Germinados}} \times 100$$

Figura 10 - Esquema ilustrativo do procedimento de estudo de germinação de conídios.

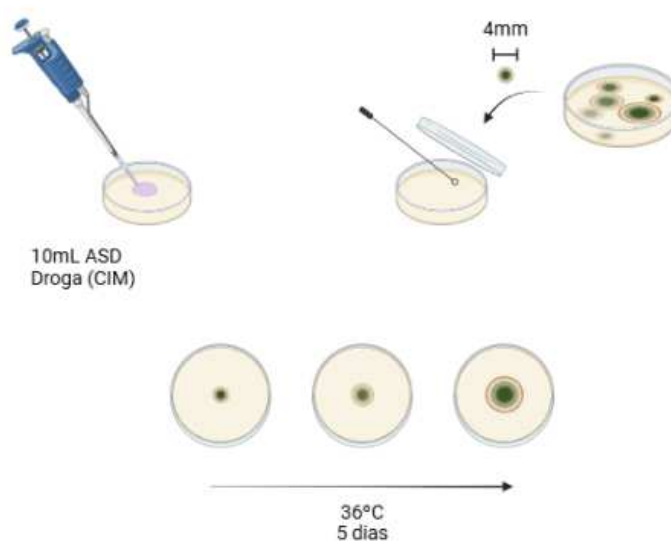


Fonte: Autoria própria.

4.5.7 CRESCIMENTO MICELIAL

O crescimento foi analisado pela técnica de crescimento micelial radial em meio sólido (de Oliveira Lima *et al.*, 2017). Em placas de Petri com 10 mL de ASG fundido em aproximadamente 35 °C, foram adicionadas as drogas associadas. Após solidificação do meio, colônias recém cultivadas em ASG (4 mm de diâmetro) foram colocadas na superfície do meio. Um experimento controle sem adição das drogas foi realizado. As placas foram incubadas a 36°C por até 5 dias e o diâmetro do crescimento radial dos fungos foi registrado diariamente. Os resultados foram expressos em diâmetro da colônia (mm) em função do tempo de incubação.

Figura 11 - Esquema ilustrativo do procedimento de estudo de crescimento micelial.



Fonte: Autoria própria.

4.5.8 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IRRITANTE

A avaliação do potencial irritante foi conduzida de acordo com o método do teste do ovo de galinha na membrana corioalantóica (HET-CAM), conforme descrito por Luepke (1985), com pequenas modificações. Ovos fertilizados e livres de patógenos de *Gallus gallus domesticus* foram adquiridos, higienizados individualmente com etanol 70% e mantidos horizontalmente em uma incubadora com sistema de rotação automática (Chocadeiras Golden®, Brasil) a $37,5 \pm 0,5$ °C e $50 \pm 1\%$ de umidade relativa. Após 9 dias de incubação, a rotação foi interrompida e os ovos foram removidos da incubadora e inspecionados usando ovoscopia para selecionar os ovos fertilizados. Os ovos viáveis foram então reinseridos na incubadora verticalmente, com a câmara de ar voltada para cima. No 10º dia de incubação, uma abertura circular foi feita na casca do ovo na região da câmara de ar; a membrana da casca do ovo foi umedecida com 1 mL de NaCl (0,9%) e cuidadosamente removida para expor a membrana corioalantóica completamente.

Alíquotas de 300 µL das drogas foram aplicadas na superfície da membrana corioalantóica da seguinte forma: SGPd (CIM), SGPo (CIM), CBX (CIM), CBX+SGPd (1/2CIM + 1/2CIM), CBX+SGPo (1/2CIM + 1/2CIM). Após 20 segundos de exposição, a membrana corioalantóica foi enxaguada com 5 mL de NaCl (0,9%), e a ocorrência de fenômenos vasculares como hemorragia (He), hiperemia (Hi) e coagulação (opacidade e/ou trombose) (Co) foi monitorada por 5 minutos. NaOH (0,1N) foi usado como controle positivo, e NaCl (0,9%) como controle negativo. Cada evento vascular detectado foi

classificado com base em seu tempo de aparecimento, conforme indicado na Tabela 2, adaptada de França (1996). A equação a seguir calcula o escore médio de irritação (MIS). Os subscritos indicam a réplica avaliada. Hi denota hiperemia, He denota hemorragia e Co denota coagulação.

$$MIS = \frac{(He1 + Hi1 + Co1) + (He2 + Hi2 + Co2) + (He3 + Hi3 + Co3) + (He4 + Hi4 + Co4)}{4}$$

Tabela 2 - Graus de fenômenos vasculares observados na membrana corioalantóica até o momento do aparecimento.

Fenômenos Vasculares	Tempo		
	$T \leq 30 \text{ seg}$	$30 \text{ seg} \leq T \leq 2 \text{ min}$	$2 \text{ min} \leq T \leq 5 \text{ min}$
Hiperemia	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação (opacidade e/ou trombose)	9	7	5

Fonte: Adaptada de França (1996).

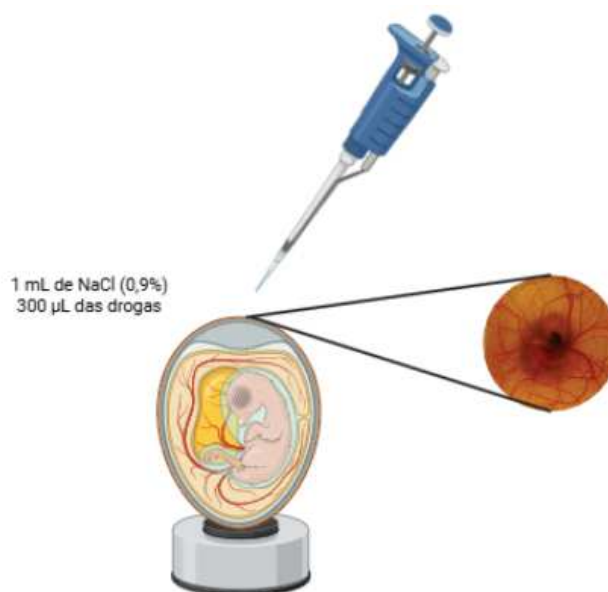
O grau final dos medicamentos foi determinado com base na média aritmética dos escores de irritação obtidos, conforme descrito na Tabela 3, adaptada de Luepke (1985). Todos os embriões foram sacrificados seguindo as Diretrizes da AVMA para a Eutanásia de Animais (Underwood; Anthony, 2020). Isso foi obtido congelando todos os óvulos a -20 °C, seguido de descarte apropriado.

Tabela 3 - Grau final segundo o potencial de irritabilidade no método HET-CAM.

Escore de Irritação	Grau Final
0,0 - 0,9	Praticamente não irritante
1,0 - 4,9	Irritante leve
5,0 - 8,9	Irritante moderado
9,0 - 21,0	Irritante grave

Fonte: Adaptada de Luepke (1985).

Figura 12 - Esquema ilustrativo do procedimento de análise do potencial irritante.



Fonte: Autoria própria.

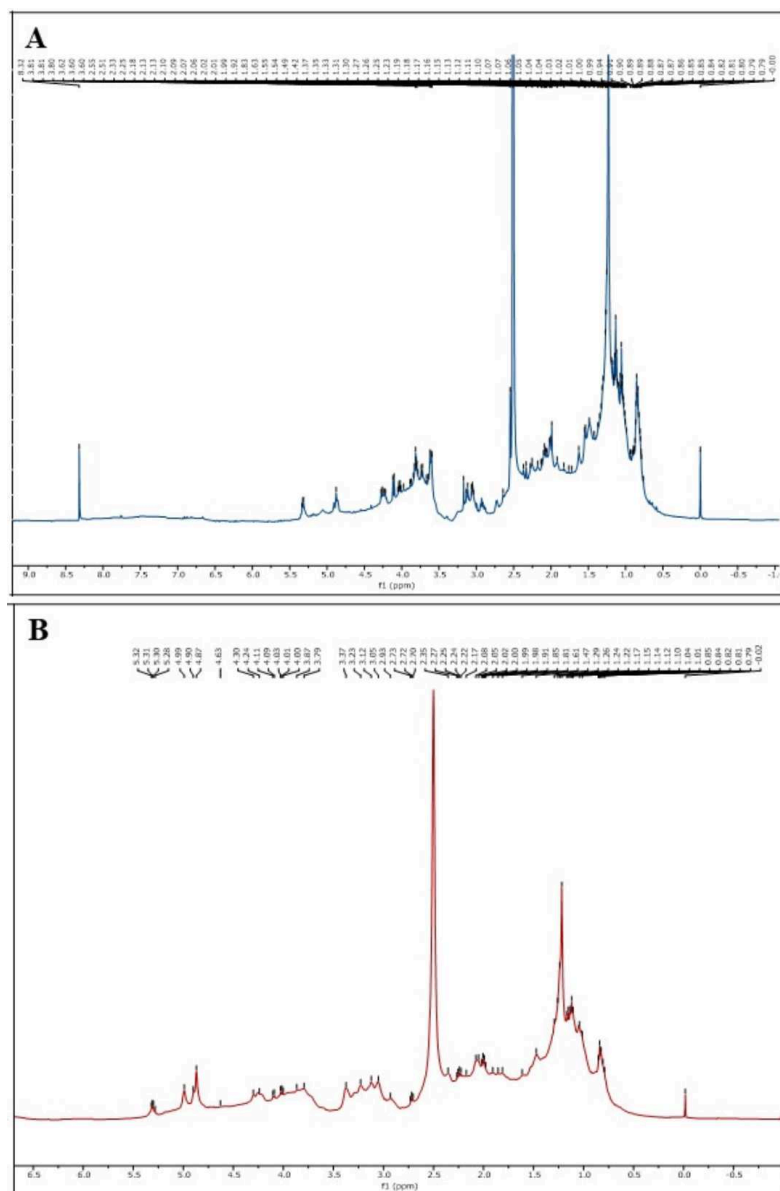
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram realizados em três experimentos independentes. Os valores de CIM e CFM foram expressos como moda, e os resultados da taxa de germinação de conídios e crescimento micelial foram expressos como média $\pm$ DP (desvio padrão). Inicialmente, foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk para normalidade e o teste de Laveine para homogeneidade de variância como pressupostos. Foi realizado ANOVA unidirecional com teste de Tukey post hoc para ensaio de germinação de conídios para determinar diferenças significativas entre os tratamentos. Foi feito ANOVA mista com correção do teste de Bonferroni para o ensaio de crescimento micelial. Foi considerado que houve diferença estatística quando $p < 0,05$. O intervalo de confiança foi de 95%. O tratamento dos dados foi realizado no R 4.1.0 na interface RStudio, e usamos o pacote ggplot2 para visualização dos dados.

5 RESULTADOS

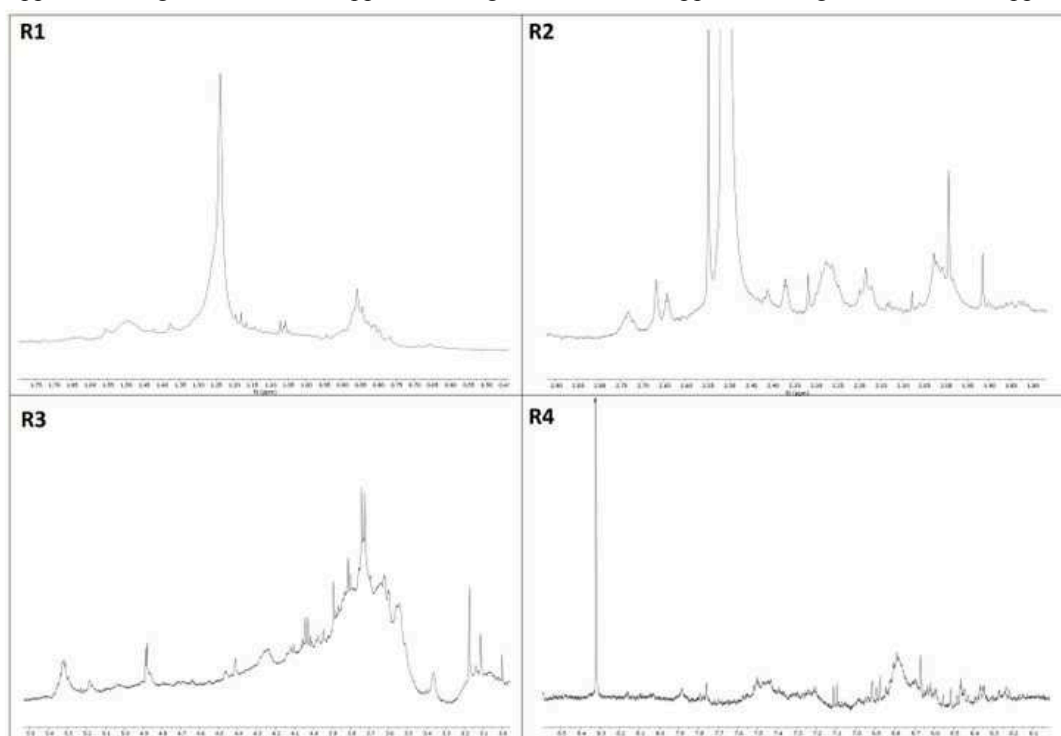
Inicialmente, os extratos de SGPd e SGPo foram caracterizados quimicamente por seu perfil químico global (Figuras 13, 14 e 15) e aminas biogênicas (Tabela 4). Regiões não úteis dos espectros de RMN de ^1H de SGPd e SGPo foram removidas para evitar interferência na análise de dados. Nenhuma distorção dos sinais espectrais foi observada após o alinhamento dos espectros no novo conjunto de dados, demonstrando que os deslocamentos de pico foram corrigidos satisfatoriamente (Figura 13A). Os espectros foram divididos em quatro regiões: R1, R2, R3 e R4 (Figuras 14 e 15). Cabe salientar que os espectros apresentaram uma similaridade visual. Foi observada a presença de sinais intensos entre 0,5-1,7 ppm (R1), correspondendo à presença de prótons alquil de grupos metil (CH_3) ou metileno (CH_2)_n não ligados a anéis aromáticos ou grupos carboxílicos (Figuras 14 e 15; Tabela 4). Observou-se a presença de sinais na região entre 1,8-2,9 ppm (Figuras 14 e 15; R2), estando relacionados a prótons ligados a carbonos ligados a anéis aromáticos e/ou grupos funcionais, como carbonilas de ácidos graxos, por exemplo (Figuras 14 e 15; Tabela 4). Houve uma sobreposição significativa de sinais na região entre 3,0-5,5 ppm (R3) e sinais entre 5,6-8,5 ppm (R4) (Figuras 14 e 15; Tabela 4). Esses sinais são característicos de prótons de álcoois, éteres ligados a carbonos oxigenados, prótons anoméricos e prótons pertencentes a unidades glicosídicas. Por fim, taninos e flavonoides mostram sinais ressonantes nessas regiões de espectros mais desprotegidas. Dentre as aminas analisadas, somente putrescina, cadaverina e agmatina foram detectadas. A agmatina foi a mais abundante em SGPd e SGPo, com valores de 9,55 mg/kg e 0,81 mg/kg, respectivamente.

Figura 13 - Espectros de RMN de ^1H de (A) Substrato Gasto de *Pleurotus djamor* (SGPd) e (B) Substrato Gasto de *Pleurotus ostreatus* (SGPo) cultivados em substratos de folhas de bananeira.



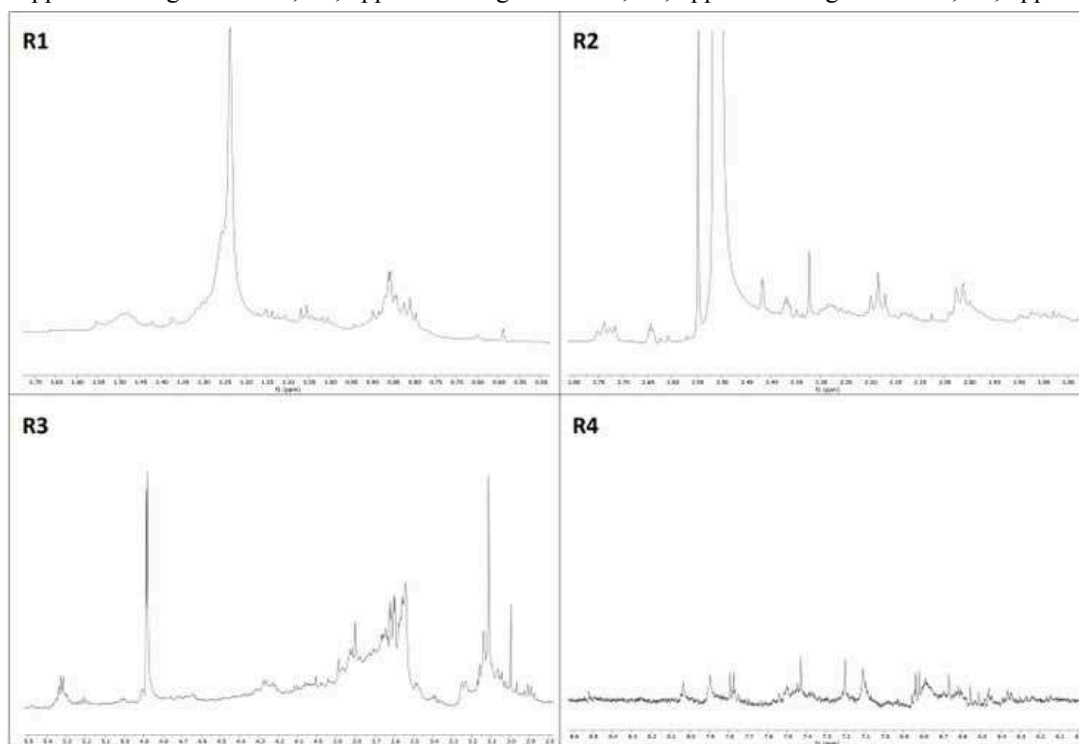
Fonte: Autoria própria.

Figura 14 - Espectros de RMN de ^1H do Substrato Gasto *Pleurotus djamor* (SGPd). R1. Região entre 0,5-1,7 ppm. R2. Região entre 1,8-2,9 ppm. R3. Região entre 3,0-5,5 ppm. R4. Região entre 5,6-8,5 ppm



Fonte: Autoria própria.

Figura 15 - Espectros de RMN de ^1H do Substrato Gasto *Pleurotus ostreatus* (SGPo). R1. Região entre 0,5-1,7 ppm. R2. Região entre 1,8-2,9 ppm. R3. Região entre 3,0-5,5 ppm. R4. Região entre 5,6-8,5 ppm



Fonte: Autoria própria.

Tabela 4 - Conteúdo de aminas biogênicas nos Substratos Gastos de *Pleurotus djamor* (SGPd), Substratos Gastos de *Pleurotus ostreatus* (SGPo).

Aminas	Concentração (mg/kg)	
	SGPo	SGPd
Putrescina	0,40	ND
Cadaverina	1,58	ND
Tiramina	ND	ND
Histamina	ND	ND
Serotonina	ND	ND
Agmatina	9,55	0,81
Espermidina	ND	ND
Feniletilamina	ND	ND
Espermina	ND	ND
Triptamina	ND	ND

ND: Não detectado (Limite de detecção: 0,4 mg/kg).

Fonte: Autoria própria.

A Tabela 5 apresenta o perfil de sensibilidade das cepas de *A. flavus* testadas. Griseofulvina e fluconazol não inibiram as cepas nas concentrações testadas. Cetoconazol e miconazol inibiram 100% das cepas a 8 mg/L e 16 mg/L, respectivamente. As cepas apresentaram maior sensibilidade ao itraconazol, com uma CIM de 4 mg/L para 4 das testadas. A anfotericina B inibiu a maioria das cepas a 2 mg/L. O ciclopirox apresentou uma CIM de 16 mg/L para todas as cepas. Terbinafina apresentou os menores valores de CIM (0,5 mg/L).

Tabela 5 - Perfil de sensibilidade de antifúngicos convencionais usados na prática clínica contra *Aspergillus flavus*.

Antifúngico	Cepas						
		AS 27	AS 29	AS 35	AS 101	AS 103	AS 118
Cetoconazol	CIM	8	8	4	4	4	4
	CFM	16	8	8	4	4	8
	CFM/CIM	2	1	2	1	1	2
		fungicida	fungicida	fungicida	fungicida	fungicida	fungicida

Miconazol	CIM	16	16	16	16	16	16
	CFM	32	16	16	16	16	16
	CFM/CIM	2 fungicida	1 fungicida	1 fungicida	1 fungicida	1 fungicida	1 fungicida
Fluconazol	CIM	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
	CFM						
	CFM/CIM						
Itraconazol	CIM	4	4	4	4	32	8
	CFM	4	4	4	4	32	8
	CFM/CIM	1 fungicida	1 fungicida	1 fungicida	1 fungicida	1 fungicida	1 fungicida
Anfotericina B	CIM	4	2	2	2	2	2
	CFM	4	4	8	8	2	4
	CFM/CIM	1 fungicida	2 fungicida	4 fungicida	4 fungicida	1 fungicida	2 fungicida
Ciclopirox	CIM	16	16	16	16	16	16
	CFM	16	16	32	128	64	32
	CFM/CIM	1 fungicida	1 fungicida	2 fungicida	8 fungistática	4 fungicida	2 fungicida
Griseofulvina	CIM	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
	CFM						
	CFM/CIM						
Terbinafina	CIM	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	CFM	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	CFM/CIM	1 fungicida	1 fungicida	1 fungicida	1 fungicida	1 fungicida	1 fungicida

AS: *Aspergillus flavus*; CIM: Concentração Inibitória Mínima; CFM: Concentração Fungicida Mínima; N/D: Não Detectado.

Fonte: Autoria própria.

A Tabela 6 apresenta os valores de CIM e CFM de SGPo e SGPd. Os substratos exibiram atividade fungicida contra todas as cepas testadas, com valores de CIM variando de 1024 a 2048 mg/L. CBX demonstrou atividade fungicida e teve o efeito inibitório mais potente contra as cepas, com valores de CIM variando de 32 a 512 mg/L.

Tabela 6 - Valores de CIM e CFM (mg/L) do Substrato Gasto de *Pleurotus djamor* (SGPd), Substrato Gasto de *Pleurotus ostreatus* (SGPo) e Carboxin (CBX) contra *Aspergillus flavus*.

Cepas	SGPo			SGPd			CBX		
	CIM	CFM	CFM/CIM	CIM	CFM	CFM/CIM	CIM	CFM	CFM/CIM
AS27	2048	2048	1 (fungicida)	1024	2048	2 (fungicida)	32	32	1 (fungicida)
AS29	1024	4096	4 (fungicida)	1024	2048	2 (fungicida)	32	32	1 (fungicida)
AS35	1024	4096	4 (fungicida)	1024	1024	1 (fungicida)	32	64	2 (fungicida)
AS101	1024	4096	4 (fungicida)	1024	1024	1 (fungicida)	512	2048	4 (fungicida)
AS103	2048	2048	1 (fungicida)	1024	1024	1 (fungicida)	512	2048	4 (fungicida)
AS118	2048	4096	2 (fungicida)	2048	2048	1 (fungicida)	512	2048	4 (fungicida)

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CFM: Concentração Fungicida Mínima.

Fonte: Autoria própria.

Considerando o perfil de sensibilidade das cepas aos extratos, conduzimos um estudo sobre a combinação de SGPo e SGPd com CBX. Com base nos resultados, foi calculado o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) e determinado o efeito da combinação de CBX com SGPo e SGPd. Os valores de CIM para as drogas sozinhas, em combinação e o ICIF podem ser vistos na Tabela 7. Os efeitos inibitórios das drogas combinadas foram maiores do que os das drogas individuais para 83,3% das cepas. Aditividade foi observada em 4 cepas (66,7%), enquanto sinergismo foi observado em 2 cepas (33,3%). Nenhum antagonismo foi observado entre as drogas. Selecionou-se as cepas AS27 e AS118 para estágios subsequentes porque elas mostraram sinergismo em pelo menos uma das combinações.

Tabela 7 - Estudo de associação do Substrato Gasto de *Pleurotus djamor* (SGPd) ou Substrato Gasto de *Pleurotus ostreatus* (SGPo) com Carboxin (CBX) contra *Aspergillus flavus*.

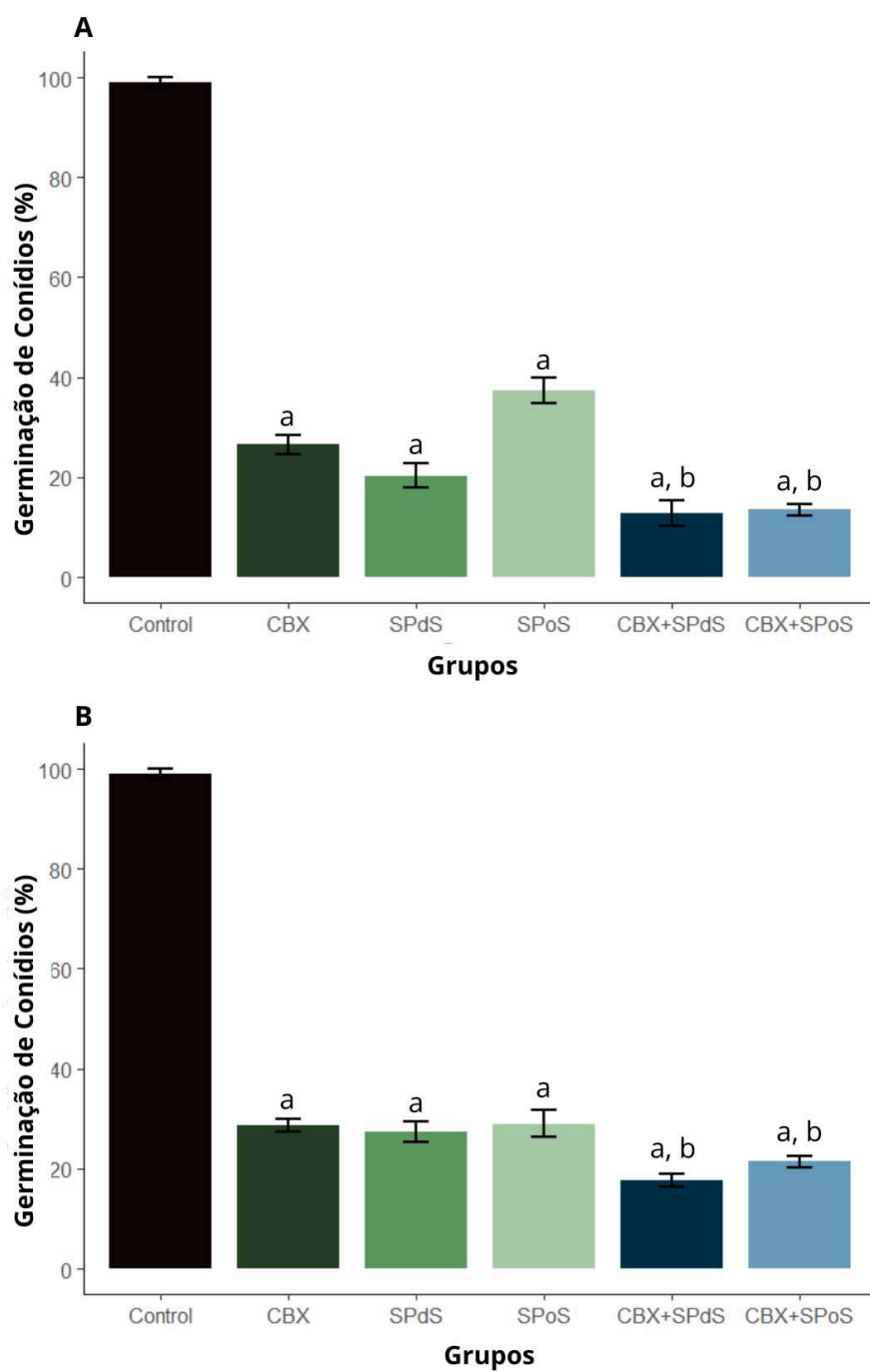
Cepas	CIM sozinho (g/L)			CIM em combinação (g/L)			CIM em combinação (g/L)		
	SGPd	SGPo	Carboxin	SGPd	Carboxin	ICIF (interação)	SGPo	Carboxin	ICIF (interação)
AS27	2048	1024	32	256	8	0,38 (sinergismo)	512	16	1,00 (aditividade)
AS29	1024	1024	32	128	16	0,63 (aditividade)	256	16	0,75 (aditividade)
AS35	2048	1024	32	512	16	0,75 (aditividade)	128	64	2,13 (indiferença)
AS101	1024	1024	512	256	128	0,50 (aditividade)	1024	512	2,00 (indiferença)
AS103	2048	1024	512	1024	512	1,50 (indiferença)	1024	512	2,00 (indiferença)
AS118	2048	2048	512	256	128	0,38 (sinergismo)	256	128	0,38 (sinergismo)

CIM: Concentração Inibitória Mínima; ICIF: Índice da Concentração Inibitória Fracionada.

Fonte: Autoria própria.

O efeito antifúngico de CBX, SGPo, SGPd, CBX+SGPd e CBX+SGPo foi avaliado por meio de ensaios de germinação de conídios e crescimento micelial de AS27 (Figuras 16A e 17A) e AS118 (Figuras 16B e 17B). Todos os fármacos, individualmente e em combinação, inibiram significativamente a germinação de conídios AS27 e AS118 ($p < 0,05$). Além disso, CBX+SGPd e CBX+SGPo foram mais potentes do que as drogas individuais ($p < 0,05$). Em média, as drogas isoladas inibiram a germinação de conídios AS27 em 71,40%, enquanto a combinação das drogas atingiu 86,49%. As drogas isoladas e combinadas inibiram a germinação de conídios AS118 em uma média de 71,37% e 88,36%, respectivamente.

Figura 16 - Efeitos do Substrato Gasto de *Pleurotus djamor* (SGPd), Substrato Gasto de *Pleurotus ostreatus* (SGPo), Carboxin (CBX) e combinações na taxa de germinação de conídios de *Aspergillus flavus* AS27 (A) e *Aspergillus flavus* AS118 (B).

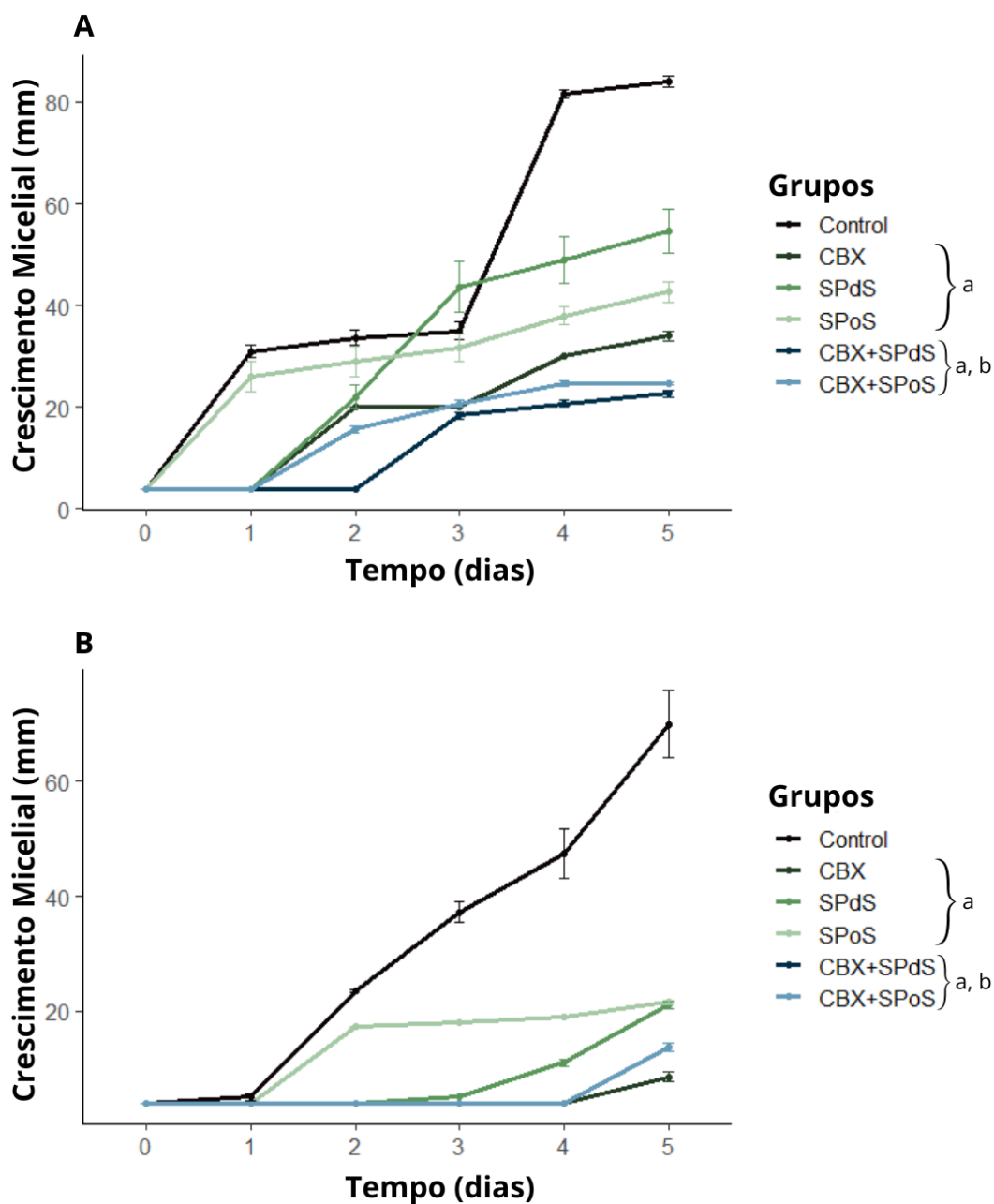


SGPd (CIM), SGPo (CIM), CBX (CIM), CBX+SGPd (1/2CIM + 1/2CIM), CBX+SGPo (1/2CIM + 1/2CIM). Os resultados são as médias $\pm$ DP de três experimentos independentes. Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao controle de crescimento sem drogas (a) e às drogas sozinhas (b).

Fonte: Autoria própria.

Uma ANOVA mista usada no ensaio de crescimento micelial revelou efeitos significativos do tempo ($p < 0,05$) e uma interação entre tratamento e tempo ($p < 0,05$) nos ensaios de crescimento micelial (Figuras 17A e B). Comparações pareadas subsequentes indicaram mudanças no crescimento micelial de AS27 e AS118 no grupo controle ao longo do tempo. O grupo controle mostrou crescimento progressivo a partir do dia 2 ($p < 0,05$). Em sua maioria, o micélio fúngico apresenta desenvolvimento significativo após dois dias de incubação na presença de SGPd e SGPo ($p < 0,05$). Na presença de CBX e drogas associadas, esse efeito foi observado apenas após 4 dias de incubação. Ao final do tempo de incubação, houve diferenças nos resultados com as drogas em comparação ao controle ($p < 0,05$). CBX+SGPd e CBX+SGPo apresentaram maior eficiência do que as drogas isoladas ($p < 0,05$). Em média, as drogas isoladas reduziram o crescimento micelial do AS27 em 48,56%, enquanto as drogas associadas atingiram 71,23%. As drogas isoladas e associadas reduziram o crescimento micelial do AS118 em uma média de 76,20% e 85,03%, respectivamente.

Figura 17 - Efeitos do Substrato Gasto de *Pleurotus djamor* (SGPd), Substrato Gasto de *Pleurotus ostreatus* (SGPo), Carboxin (CBX) e combinações no crescimento radial micelial de *Aspergillus flavus* AS27 (A) e *Aspergillus flavus* AS118 (B).



SGPd (CIM), SGPo (CIM), CBX (CIM), CBX+SGPd (1/2CIM + 1/2CIM), CBX+SGPo (1/2CIM + 1/2CIM). Os resultados são as médias $\pm$ DP de três experimentos independentes. Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao controle de crescimento sem drogas (a) e às drogas sozinhas (b) no dia 5.

Fonte: Autoria própria.

Os resultados referentes ao potencial irritante de SGPd, SGPo e CBX isolados e combinados são apresentados na Tabela 8. Os dados indicam que NaCl (0,9%) apresentou leve coagulação e foi classificado como praticamente não irritante ($MIS = 0,6 \pm 1,1$). Por outro lado, a aplicação de NaOH (0,1 N) na membrana corioalantóica causou intensas reações vasculares irritantes, classificadas como irritantes graves ($MIS = 18,0 \pm 1,0$). CBX, SGPd, CBX+SGPd e CBX+SGPo induziram hiperemia, hemorragia e reações de coagulação na membrana corioalantóica e foram classificados como irritantes moderados. SGPd causou eventos vasculares intensos. Embora SGPd ($MIS = 9,8 \pm 1,6$) tenha apresentado valores de MIS menores que NaOH (controle positivo), foi classificado como irritante grave devido às intensas reações vasculares observadas nos ensaios.

Tabela 8 - Potencial irritante do Substrato Gasto de *Pleurotus djamor* (SGPd), Substrato Gasto de *Pleurotus ostreatus* (SGPo) e Carboxin (CBX) sozinhos e em combinação.

Droga	Escore de Irritação				Grau Final
	Hiperemia	Hemorragia	Coagulação	MIS	
SGPd	2.0 ± 1.2	2.7 ± 2.5	5.2 ± 2.6	9.8	Irritante grave
SGPo	1.6 ± 1.3	0.8 ± 1.9	4.9 ± 3.0	7.3	Irritante moderado
CBX	1.5 ± 1.2	2.1 ± 2.6	3.3 ± 3.5	6.9	Irritante moderado
CBX + SGPd	1.7 ± 1.2	1.5 ± 2.3	5.6 ± 2.0	8.7	Irritante moderado
CBX + SGPo	1.1 ± 1.2	0.4 ± 1.4	5.0 ± 2.5	6.5	Irritante moderado
NaCl 0,9%	0.1 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.6 ± 2.0	0.6	Praticamente não irritante
NaOH 0,1N	5.0 ± 0.0	7.0 ± 0.0	6.3 ± 1.0	18.0	Irritante grave

Os resultados são expressos como média $\pm$ DP (n = 4). MIS (pontuação média de irritação).

Fonte: Autoria própria.

6 DISCUSSÃO

Pesquisas sobre novos antifúngicos podem representar um avanço promissor na proteção alimentar e na saúde humana nos próximos anos. Embora os fungicidas sejam essenciais na agricultura e na conservação de grãos de milho, seu uso excessivo traz desafios, como (1) a aplicação em larga escala na produção de alimentos, (2) a toxicidade residual resultante de altos níveis desses compostos nos alimentos consumidos e (3) o surgimento de cepas fúngicas resistentes no ambiente. Sob a perspectiva de saúde única, esses fatores impactam negativamente a saúde de animais, humanos e o ambiente compartilhado. Os resultados demonstraram que SGPo e SGPd apresentam atividade antifúngica contra cepas de *Aspergillus flavus* produtoras de aflatoxinas, atuando como fungicidas. Além disso, esses compostos potencializaram a atividade antifúngica da CBX *in vitro*, reduzindo sua concentração efetiva. Por fim, os testes HET-CAM classificaram SGPd, SGPo e CBX como irritantes moderados quando combinados, sugerindo que sua aplicação futura na proteção de alimentos pode ser viável e relativamente segura.

Recentemente, o EUCAST revisou os pontos de interrupção antifúngicos para espécies de *Aspergillus* e *Candida* (Arendrup, *et al.*, 2020a). No caso de *Aspergillus*, foram estabelecidos os pontos de interrupção e as categorias de suscetibilidade para os antifúngicos anfotericina B, isavuconazol, itraconazol, posaconazol e voriconazol. Neste estudo, testamos a suscetibilidade a medicamentos de diferentes classes, incluindo anfotericina B e itraconazol, ambos analisados pelo EUCAST. Os resultados indicaram que as cepas de *A. flavus* não eram suscetíveis a esses fármacos, que são aprovados para o tratamento de infecções sistêmicas ou graves por *Aspergillus*. Observou-se também crescimento fúngico na presença de fluconazol e griseofulvina nas concentrações testadas (Tabela 5). Esses achados são preocupantes, pois o perfil de resistência das cepas analisadas reforça a gravidade da resistência aos azóis em *Aspergillus*, condição associada a um aumento significativo na mortalidade (Berman & Krysan, 2020; Sabino, 2022).

Até o momento, não há relatos sobre o grau de exposição das cepas à carboxin nem sobre como essa pressão antifúngica pode ter contribuído para o surgimento de cepas com esse perfil de sensibilidade. No entanto, a literatura destaca dois aspectos fundamentais que reforçam a preocupação levantada no estudo. Primeiramente, o CBX é amplamente utilizado na agricultura como fungicida no cultivo de milho e outros grãos em diversas regiões do mundo (Brauer *et al.*, 2019). Em segundo lugar, os fungos podem desenvolver resistência ou tolerância a antifúngicos devido ao uso extensivo de compostos da mesma classe ou de

classes diferentes, um fenômeno conhecido como resistência cruzada (Bastos *et al.*, 2021). Os impactos da exposição a fungicidas na resistência fúngica a azóis já foram estudados em *Aspergillus fumigatus*, especialmente em relação à presença de resíduos de azóis na agricultura. Contudo, pesquisas indicam o surgimento de cepas resistentes à CBX devido a mutações nos genes que codificam subunidades do complexo succinato desidrogenase (Cao *et al.*, 2021; Shima *et al.*, 2009).

Visando garantir a qualidade e a segurança dos alimentos, agências reguladoras estabeleceram limites específicos para o uso do CBX. A Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar, por exemplo, determina um limite máximo de 0,03 mg/kg para vegetais (EFSA, 2017), enquanto no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária permite um máximo de 0,05 mg/kg em grãos de milho (ANVISA, 2023). Devido ao seu uso na agricultura, o CBX pode se acumular no solo, resultando na formação de resíduos tóxicos que afetam negativamente a saúde e a diversidade microbiana do ambiente (Li *et al.*, 2024). Estudos indicam que o carboxin pode causar toxicidade significativa no desenvolvimento e cardiotoxicidade em embriões de peixe-zebra, reforçando as preocupações com a segurança alimentar e ambiental (Huang *et al.*, 2022). Diante desse cenário, torna-se essencial adotar uma abordagem de saúde única, focada na busca por doses eficazes mais baixas de fungicidas como a CBX na produção de alimentos. Essa estratégia pode contribuir para reduzir a pressão seletiva e minimizar o risco de desenvolvimento de resistência em campos agrícolas.

A abordagem de saúde única busca utilizar fontes naturais no controle de doenças fúngicas agrícolas e micotoxicose, reduzindo, ao mesmo tempo, a seleção para resistência induzida pela pressão antifúngica (Woods; Mcalister; Geddes-Mcalister, 2023). Com base nesse conceito, direcionou-se o estudo para avaliar as propriedades antifúngicas de produtos naturais, devido ao seu potencial preventivo na inibição de *Aspergillus flavus*. O potencial antifúngico do SMS de cogumelos comestíveis é raramente explorado na literatura, apesar de ser um produto complexo, promissor e sustentável. A partir dessa perspectiva, foram produzidos extratos de SGPo e SGPd, que demonstraram capacidade moduladora na atividade antifúngica do CBX contra cepas micotoxigênicas de *A. flavus*. Os resultados indicaram que a combinação de SGPo e SGPd com CBX apresentou efeitos mais promissores do que os compostos testados isoladamente (Tabela 4). Esses efeitos podem ser classificados como sinérgicos, quando uma droga potencializa a ação da outra, tornando a combinação mais eficaz do que os agentes separados, ou aditivos, quando os efeitos individuais de cada composto são simplesmente somados. A combinação de antifúngicos é uma estratégia inovadora no combate à resistência antifúngica, e os produtos naturais representam uma fonte

promissora para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (Fuentefria *et al.*, 2018; Roberts, Gibbs, 2018).

Para dar suporte a essa avaliação, foram utilizados modelos *in vitro* para analisar o desenvolvimento fúngico em dois estágios principais de crescimento: germinação de conídios e formação micelial (Figuras 8 e 9). Esses modelos, amplamente empregados na pesquisa, simulam condições controladas de crescimento fúngico e permitem avaliar os efeitos de diferentes substâncias nesse processo. Os fungos, especialmente na forma de conídios dispersos pelo ar, podem se estabelecer e proliferar no campo, no período pós-colheita, durante o processamento, armazenamento e o manuseio dos alimentos pelo produtor, atacadista, varejista e consumidor (Leyva Salas *et al.*, 2017). Assim, a inibição da germinação de conídios ou do desenvolvimento micelial de *A. flavus* representa um efeito promissor dos extratos de SGPo e SGPd, especialmente quando combinados com CBX. Essa abordagem abre perspectivas para a redução do uso de fungicidas na agricultura, contribuindo para um modelo de produção mais sustentável e ambientalmente responsável.

A análise do perfil global de compostos realizada neste estudo revelou que SGPd e SGPo contêm uma variedade de compostos que contribuem para suas propriedades antimicrobianas, em concordância com dados já descritos na literatura para espécies do gênero *Pleurotus* (Martinez-Flores; Contreras-Chávez; Garnica-Romo, 2022). Os sinais observados em R1 (Figuras 6 e 7) são característicos de extratos de cogumelos, refletindo seu alto teor de proteínas, gorduras, carotenóides, óleos voláteis, compostos fenólicos, tocoferóis e vitaminas, que também agregam valor nutricional significativo (Rathore; Prasad; Sharma, 2017). Substâncias voláteis como 1-Octen-3-ona e 1-Octen-3-ol, identificadas em *P. ostreatus* e *P. djamor*, apresentam sinais ressonantes nessa região e demonstram forte atividade antimicrobiana contra bactérias relacionadas a alimentos e fungos patogênicos (Yin *et al.*, 2019). A presença abundante de ácidos graxos insaturados (Figuras 2 e 3, R2) nos extratos líquidos de micélio e culturas de *Pleurotus* spp. tem sido associada à atividade antifúngica desses cogumelos (Owaid; Al-Saeedi; Al-Assaffii, 2016). Já os sinais em R3 (Figuras 6 e 7) indicam uma alta concentração de polissacarídeos e oligossacarídeos, corroborando estudos anteriores sobre extratos de outras espécies de cogumelos (Medeiros *et al.*, 2024). Os extratos metanólicos e aquosos de *P. florida* demonstram atividade antifúngica, frequentemente atribuída à presença de flavonoides e taninos (Owaid; Al-Saeedi; Al-Assaffii, 2016). Compostos orgânicos, como o p-anisaldeído, são produzidos por *P. ostreatus* como mecanismo de defesa contra outros organismos, enquanto bioativos como quitina (quitosana)

e pleurotina apresentam sinais em regiões aromáticas mais desprotegidas e são reconhecidos por suas propriedades antifúngicas e antibacterianas (Törös *et al.*, 2023).

Dessa forma, pode-se inferir que o SMS naturalmente contém compostos antifúngicos, uma vez que, durante o crescimento micelial, as células fúngicas secretam diversas substâncias que inibem o desenvolvimento de outros organismos no substrato. Em apoio a essa hipótese, verificou-se que o SMS de *P. ostreatus* cultivado em resíduos de sementes de algodão apresentou alto potencial para inibir *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, tanto em ensaios *in vitro* quanto em plantas cultivadas em vasos (Ocimati *et al.*, 2021). Da mesma forma, extratos aquosos de *Pleurotus eous* cultivados em folhas de arroz foram empregados em estudos sobre atividade antifúngica contra *Fusarium* sp., *Alternaria* spp., *Phytophthora* spp. e *Aspergillus* spp., com testes de difusão em meio sólido demonstrando inibição do crescimento de *Aspergillus* spp., com zonas de inibição entre 8,2 e 16,6 mm. Os compostos voláteis emitidos por SMS de *Hypsizygus marmoreus*, *Pholiota microspora*, *Lyophyllum decastes* e *Auricularia polytricha* demonstraram a capacidade de suprimir a formação de lesões foliares induzidas por *Alternaria brassicicola* (Fujita *et al.*, 2021). Também foram isolados do SMS de *Lentinula edodes* três ácidos fenólicos com características estruturais semelhantes ao ácido salicílico e potencial antifúngico. No entanto, o presente estudo representa a primeira evidência sobre o potencial do substrato gasto de cogumelo de *P. djamor* e *P. ostreatus* no controle de *A. flavus* micotoxigênico.

Estudos indicam que o SMS de espécies do gênero *Pleurotus* pode ser aproveitado com segurança para diversos fins. O SMS suplementado com farelo de trigo e farinha de soja demonstrou alta eficiência de bioconversão ao permitir um segundo ciclo de cultivo de *P. ostreatus* e *P. pulmonarius*, sugerindo seu potencial como um recurso nutricionalmente rico (Economou; Philippoussis; Diamantopoulou, 2020). O SMS dessas espécies também pode ser utilizado como uma fonte segura e nutritiva na alimentação animal, especialmente para ruminantes (Mhlongo; Mnisi; Mlambo, 2021). Por outro lado, quando empregado como fertilizante orgânico, o SMS pode representar riscos à saúde, uma vez que pode favorecer o aumento da resistência a antibióticos e a presença de genes relacionados a doenças humanas (Zou *et al.*, 2022). Esses achados ressaltam que, embora o SMS tenha aplicações promissoras na agricultura e na produção de alimentos, é essencial avaliar cuidadosamente sua segurança e seus impactos ambientais.

Diante disso, avaliou-se o perfil de aminas biogênicas e o potencial de irritação de SGPo e SGPd para investigar suas possíveis aplicações práticas. Os resultados indicaram níveis insignificantes de aminas biogênicas nos extratos (Tabela 4). Observa-se que tanto

SGPo quanto SGPd, isoladamente ou em combinação com CBX, foram classificados como irritantes moderados no modelo HET-CAM. Utilizamos o HET-CAM como um modelo alternativo para prever a toxicidade de SGPo e SGPd, bem como sua combinação com CBX, que apresenta potencial promissor para aplicações alimentícias. Esse modelo tem sido amplamente empregado em diversas áreas, como desenvolvimento de medicamentos, cosméticos e toxicologia alimentar, sendo uma ferramenta adequada para investigar o potencial de irritação e toxicidade de substâncias e formulações (Sandner *et al.*, 2022). Estudos anteriores demonstraram a aplicabilidade do HET-CAM na avaliação da toxicidade de diferentes produtos, incluindo um biossurfactante produzido por *Saccharomyces cerevisiae* URM6670 para biscoitos e muffins (Ribeiro *et al.*, 2023), resina de goma *Dorema ammoniacum* para a indústria alimentícia (Tavakkoli *et al.*, 2020) e β -glucano do cogumelo *Ganoderma lucidum* (Vaithanomsat *et al.*, 2022).

7 CONCLUSÃO

Este estudo destaca o potencial do substrato gasto de *P. ostreatus* e *P. djamor* no aumento da ação do CBX como uma estratégia eficaz para controlar o crescimento de cepas micotoxigênicas de *A. flavus*. A relevância desses achados sugere que o SMS pode desempenhar um papel essencial na mitigação de contaminações fúngicas em ambientes agrícolas e alimentares. Para validar e expandir esses resultados, recomenda-se a realização de estudos de campo adicionais que explorem a interação do SMS com outros agentes fúngicos, bem como sua aplicabilidade em diferentes modelos de produção agrícola e conservação de alimentos. Além disso, este trabalho representa uma contribuição significativa para a abordagem de saúde única, uma vez que o SMS pode ser obtido de maneira sustentável a partir da produção de cogumelos *P. ostreatus* e *P. djamor* cultivados em resíduos agrícolas. Esse aspecto reforça a viabilidade ambiental e econômica do uso desses substratos, promovendo práticas agrícolas mais sustentáveis e alinhadas a princípios de economia circular. O estudo também abre caminho para novas aplicações biotecnológicas do SMS, que podem beneficiar tanto pequenos produtores quanto grandes indústrias do setor alimentício. Ao demonstrar a eficácia desse substrato na potencialização da atividade antifúngica do CBX, este trabalho sugere uma alternativa viável para reduzir a dependência de fungicidas sintéticos, melhorando a segurança alimentar e diminuindo impactos ambientais adversos.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, H; WILKINSON, J; ZABLOTOWICZ, R; ACCINELLI, C; ABEL, C; BRUNS, H; WEAVER, M. Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. **Toxin reviews**, v. 28, n. 2-3, p. 142-153, 2009.
- AHLAWAT, O. P.; GUPTA, P; KUMAR, S. Spent mushroom substrate—a tool for bioremediation. **Mushroom Science and Biotechnology**, p. 341-366, 2007.
- AHMED, S. A. M.; BACHA, N.; ALHARAZI, T. Detection of Total Aflatoxins in Groundnut and Soybean Samples in Yemen Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Journal of food quality**, v. 2019, n. 1, p. 1614502, 2019.
- ALMEIDA, F.; RODRIGUES, M. L.; COELHO, C. The still underestimated problem of fungal diseases worldwide. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 214, 2019.
- ANVISA. C05 – Carboxina (Monografia). Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa 2023.
- ARASTEHFAR, A.; GABALDÓN, T.; GARCIA-RUBIO, R.; JENKS, J. D.; HOENIGL, M.; SALZER, H. J. F.; ILKIT, M.; LASS-FLÖRL, C.; PERLIN, D. S. Drug-resistant fungi: an emerging challenge threatening our limited antifungal armamentarium. **Antibiotics**, v. 9, n. 12, p. 877, 2020.
- ARENDRUP, M. C.; FRIBERG, N.; MARES, M.; KAHLMETER, G.; MELETIADIS, J.; GUINEA, J. How to interpret MICs of antifungal compounds according to the revised clinical breakpoints v. 10.0 European committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST). **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 11, p. 1464-1472, 2020a.
- ARENDRUP, M. C., MELETIADIS, J; MOUTON, J. W; LAGROUS, K; HAMAL, P; GUINEA, J; Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST Definitive Document E.DEF 9.3.2: **Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds**, 2020b.
- AWUCHI, C. G.; ONDARI, E. N.; OGBONNA, C. U.; UPADHYAY, A. K.; BARAN, K.; OKPALA, C. O. R.; KORZENIOWSKA, M.; GUINÉ, R. P. F. Mycotoxins affecting animals, foods, humans, and plants: Types, occurrence, toxicities, action mechanisms, prevention, and detoxification strategies—A revisit. **Foods**, v. 10, n. 6, p. 1279, 2021.

- AYESHA, M. S.; SURYANARAYANAN, T. S.; NATARAJA, K. N.; PRASAD, S. R.; SHAANKER, R. U. Seed treatment with systemic fungicides: time for review. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 654512, 2021.
- AYOFEMI, S. O. A. Aflatoxigenic fungi and mycotoxins in food: a review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 60, n. 5, p. 709-721, 2020.
- BASTOS, R. W.; ROSSATO, L.; GOLDMAN, G. H.; SANTOS, D. A. Fungicide effects on human fungal pathogens: cross-resistance to medical drugs and beyond. **PLoS Pathogens**, v. 17, n. 12, p. e1010073, 2021.
- BECKER-ALGERI, T. A.; CASTAGNARO, D.; DE BORTOLI, K.; DE SOUZA, C.; DRUNKLER, D. A.; BADIALE-FURLONG, E. Mycotoxins in bovine milk and dairy products: A review. **Journal of food science**, v. 81, n. 3, p. R544-R552, 2016.
- BERMAN, J.; KRYSAN, D. J. Drug resistance and tolerance in fungi. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 319-331, 2020.
- BERMAS, A.; GEDDES-MCALISTER, J. Combatting the evolution of antifungal resistance in *Cryptococcus neoformans*. **Molecular microbiology**, v. 114, n. 5, p. 721-734, 2020.
- BRAUER, V. S.; REZENDE, C. P.; PESSONI, A. M.; DE PAULA, R. G.; RANGAPPA, K. S.; NAYAKA, S. C.; GUPTA, V. K.; ALMEIDA, F. Antifungal agents in agriculture: friends and foes of public health. **Biomolecules**, v. 9, n. 10, p. 521, 2019.
- BUCHENAUER, H. Mechanism of action of triazolyl fungicides and related compounds. **Modern selective fungicides**, p. 205-231, 1987.
- CABALLERO, E. N. M.; ZÁRATE-SALAZAR, J. R.; DA SILVA, S. A.; MARTINS, O. G.; SANTOS, M. N.; HERRERA, Á. A. P. Evaluation of agronomic waste disinfection methods for oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus* Jacq. P. Kumm) cultivation. **Proceedings of the Indian National Science Academy**, p. 1-10, 2024.
- CAO, D.; WANG, F.; YU, S.; DONG, S.; WU, R.; CUI, N.; REN, J.; XU, T.; WANG, S.; WANG, M.; FANG, H.; YU, Y. Prevalence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* is highly associated with azole fungicide residues in the fields. **Environmental science & technology**, v. 55, n. 5, p. 3041-3049, 2021.
- CARRASCO-CABRERA, C. P.; BELL, T. L.; KERTESZ, M. A. Caffeine metabolism during cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) with spent coffee grounds. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, p. 5831-5841, 2019.
- CASADEVALL, A.; HEITMAN, J.; HOWLETT, B. J.; COUTINHO, T. A.; HORWITZ, B. A.; KOLATTUKUDY, P. E.. One Health: Fungal Pathogens of Humans, Animals, and Plants.

American Society for Microbiology. American Academy of Microbiology Colloquium held in Washington, DC, 2017.

CIRILO, M. P. G.; COELHO, A. F. S.; ARAÚJO, C. M.; GONÇALVES, F. R. B.; NOGUEIRA, F. D.; GLÓRIA, M. B. A. Profile and levels of bioactive amines in green and roasted coffee. **Food Chemistry**, v. 82, n. 3, p. 397-402, 2003.

CUNHA ZIED, D.; SÁNCHEZ, J. E.; NOBLE, R.; PARDO-GIMÉNEZ, A. Use of spent mushroom substrate in new mushroom crops to promote the transition towards a circular economy. **Agronomy**, v. 10, n. 9, p. 1239, 2020.

DE OLIVEIRA LIMA, M. I.; ARAÚJO DE MEDEIROS, A. C.; SOUZA SILVA, K. V.; CARDOSO, G. N.; DE OLIVEIRA LIMA, E.; DE OLIVEIRA PEREIRA, F. Investigation of the antifungal potential of linalool against clinical isolates of fluconazole resistant *Trichophyton rubrum*. **Journal de mycologie medicale**, v. 27, n. 2, p. 195-202, 2017.

DE OLIVEIRA PEREIRA, F.; MENDES, J. M.; DE OLIVEIRA LIMA, E. Investigation on mechanism of antifungal activity of eugenol against *Trichophyton rubrum*. **Medical Mycology**, v. 51, n. 5, p. 507-513, 2013.

DE QUADROS, A. U.; BINI, D.; PEREIRA, P. A. T.; MORONI, E. G.; MONTEIRO, M. C. Antifungal activity of some cyclooxygenase inhibitors on *Candida albicans*: PGE2-dependent mechanism. **Folia microbiologica**, v. 56, p. 349-352, 2011.

DOERN, C. D. When does 2 plus 2 equal 5? A review of antimicrobial synergy testing. **Journal of clinical microbiology**, v. 52, n. 12, p. 4124-4128, 2014.

ECONOMOU, C. N.; PHILIPPOUSSIS, A. N.; DIAMANTOPOULOU, P. A. Spent mushroom substrate for a second cultivation cycle of *Pleurotus* mushrooms and dephenolization of agro-industrial wastewaters. **FEMS microbiology letters**, v. 367, n. 8, p. fnaa060, 2020.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Review of the existing maximum residue levels for chlorpyrifos according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005. **EFSA Journal**, v. 15, n. 3, p. e04733, 2017.

EL-RAMADY, H.; ABDALLA, N.; FAWZY, Z.; BADGAR, K.; LLANAJ, X.; TÖRÖS, G.; HAJDÚ, P.; EID, Y.; PROKISCH, J. Green biotechnology of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus* L.): A sustainable strategy for myco-remediation and bio-fermentation. **Sustainability**, v. 14, n. 6, p. 3667, 2022.

E RIBAS, A. D. R.; SPOLTI, P.; DEL PONTE, E. M.; DONATO, K. Z.; SCHREKKER, H.; FUENTEFRÍA, A. M. Is the emergence of fungal resistance to medical triazoles related to

their use in the agroecosystems? A mini review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 793-799, 2016.

ESKOLA, M.; KOS, G.; ELLIOTT, C. T.; HAJŠLOVÁ, J.; MAYAR, S.; KRSKA, R. Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25%. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 60, n. 16, p. 2773-2789, 2020.

FANJUL-BOLADO, P.; FOGEL, R.; LIMSON, J.; PURCAREA, C.; VASILESCU, A. Advances in the detection of dithiocarbamate fungicides: opportunities for biosensors. **Biosensors**, v. 11, n. 1, p. 12, 2020.

FENG, Y.; HUANG, Y.; ZHAN, H.; BHATT, P.; CHEN, S. An overview of strobilurin fungicide degradation: current status and future perspective. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 389, 2020.

FISHER, M. C.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; BERMAN, J.; BICANIC, T.; BIGNELL, E. M.; BOWYER, P.; BROMLEY, M.; BRÜGGEMANN, R.; GARBER, G.; CORNELLY, O. A.; GURR, SARAH. J.; HARRISON, T. S.; KUIJPER, E.; RHODES, J.; SHEPPARD, D. C.; WARRIS, A.; WHITE, P. L.; XU, J.; ZWAAN, B.; VERWEIJ, P. E. Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. **Nature reviews microbiology**, v. 20, n. 9, p. 557-571, 2022.

FONES, H. N.; BEBBER, D. P.; CHALONER, T. M.; KAY, W. T.; STEINBERG, G.; GURR, S. J. Threats to global food security from emerging fungal and oomycete crop pathogens. **Nature Food**, v. 1, n. 6, p. 332-342, 2020.

FRANÇA. (1996). ARRÊTÉ du 29 novembre 1996 relatif aux méthodes officielles d'analyse nécessaires aux contrôles des produits cosmétiques. **Journal Officiel de La République Française - JORF**, 300, 19137–19138.

FUENTEFRIA, A. M.; PIPPI, B.; DALLA LANA, D. F.; DONATO, K. K.; DE ANDRADE, S. F. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. **Letters in applied microbiology**, v. 66, n. 1, p. 2-13, 2018.

FUJITA, R.; YOKONO, M.; UBE, N.; OKUDA, Y.; USHIJIMA, S.; FUKUSHIMA-SAKUNO, E.; UENO, K.; OSAKI-OKA, K.; ISHIHARA, A. Suppression of *Alternaria brassicicola* infection by volatile compounds from spent mushroom substrates. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 132, n. 1, p. 25-32, 2021.

GAI, Y.; WANG, H. Plant Disease: A Growing Threat to Global Food Security. **Agronomy**, v. 14, n. 8, p. 1615, 2024.

GIBELLATO, S. L.; DALSÓQUIO, L. F.; DO NASCIMENTO, I. C. A.; ALVAREZ, T. M. Current and promising strategies to prevent and reduce aflatoxin contamination in grains and food matrices. **World Mycotoxin Journal**, v. 14, n. 3, p. 293-304, 2021.

HAMAD, G. M.; EL-MAKAREM, H. A.; ELAZIZ, A.I. ABD; AMER, A. A.; EL-NOGOUMY, B. A.; ABOU-ALELLA, S. A. Adsorption efficiency of sodium & calcium bentonite for ochratoxin A in some Egyptian cheeses: An innovative fortification model, in vitro and in vivo experiments. **World Mycotoxin Journal**, v. 15, n. 3, p. 285-300, 2022.

HAMAD, G. M.; MEHANY, T.; SIMAL-GANDARA, J.; ABOU-ALELLA, S.; ESUA, O. J.; ABDEL-WAHHAB, M. A.; HAFEZ, E. E. A review of recent innovative strategies for controlling mycotoxins in foods. **Food Control**, v. 144, p. 109350, 2023.

HE, P.; LI, F.; HUANG, L.; XUE, D.; LIU, W.; XU, C. Chemical characterization and antioxidant activity of polysaccharide extract from spent mushroom substrate of *Pleurotus eryngii*. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 69, p. 48-53, 2016.

HOF, H. Critical annotations to the use of azole antifungals for plant protection. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 11, p. 2987-2990, 2001.

HORIANOPOULOS, L. C.; GLUCK-THALER, E.; BENOIT GELBER, I.; COWEN, L. E.; GEDDES-MCALISTER, J.; LANDRY, C. R.; SCHWARTZ, I. S.; SCOTT, J. A.; SELLAM, A.; SHEPPARD, D. C.; SPRIBILLE, T.; SUBRAMANIAM, R.; WALKER, A. K.; HARRIS S. D.; SHAPIRO, R. S.; GERSTEIN, A. C. The Canadian Fungal Research Network: current challenges and future opportunities. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 13-22, 2021.

HUANG, Y.; WANG, Z.; PENG, Y.; XU, R.; YAN, J.; XIONG, C.; MA, J.; ZHONG, K.; LU, H. Carboxin can induce cardiotoxicity in zebrafish embryos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 233, p. 113318, 2022.

JALLOW, A.; XIE, H.; TANG, X.; QI, Z.; LI, P. Worldwide aflatoxin contamination of agricultural products and foods: From occurrence to control. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 20, n. 3, p. 2332-2381, 2021.

JAMES, C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2015. **ISAAA brief**, v. 49, 2015.

JELEFF, M.; LEHNER, L.; GILES-VERNICK, T.; DÜCKERS, M. L. A.; NAPIER, A. D.; JIROVSKY-PLATTER, E.; KUTALEK, R. Vulnerability and One Health assessment approaches for infectious threats from a social science perspective: a systematic scoping review. **The Lancet Planetary Health**, v. 6, n. 8, p. e682-e693, 2022.

JØRGENSEN, K. M.; HELLEBERG, M.; HARE, R. K.; JØRGENSEN, L. N.; ARENDRUP, M. C. Dissection of the activity of agricultural fungicides against clinical aspergillus isolates with and without environmentally and medically induced azole resistance. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 3, p. 205, 2021.

KOCHIIERU, Y.; MANKEVIČIENĖ, A.; CESEVIČIENĖ, J.; SEMAŠKIENĖ, R.; DABKEVIČIUS, Z.; JANAVIČIENĖ, S. The influence of harvesting time and meteorological conditions on the occurrence of Fusarium species and mycotoxin contamination of spring cereals. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 7, p. 2999-3006, 2020.

KRUPINSKY, J. M.; BAILEY, K. L.; MCMULLEN, M. P.; GOSSEN, B. D.; TURKINGTON, T. K. Managing plant disease risk in diversified cropping systems. **Agronomy journal**, v. 94, n. 2, p. 198-209, 2002.

LEONG, Y. K.; MA, T.; CHANG, J.; YANG, F. Recent advances and future directions on the valorization of spent mushroom substrate (SMS): A review. **Bioresource technology**, v. 344, p. 126157, 2022.

LEYVA SALAS, M.; MOUNIER, J.; VALENCE, F.; COTON, M.; THIERRY, A.; COTON, E. Antifungal microbial agents for food biopreservation—A review. **Microorganisms**, v. 5, n. 3, p. 37, 2017.

LI, S.; GENG, Y.; BAO, C.; MEI, Q.; SHI, T.; MA, X.; HUA, R.; FANG, L. Complete biodegradation of fungicide carboxin and its metabolite aniline by Delftia sp. HFL-1. **Science of The Total Environment**, v. 912, p. 168957, 2024.

LUCAS, J. A.; HAWKINS, N. J.; FRAAIJE, B. A. The evolution of fungicide resistance. **Advances in applied microbiology**, v. 90, p. 29-92, 2015.

LUEPKE, N. P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. **Food and Chemical Toxicology**, v. 23, n. 2, p. 287-291, 1985.

MARTÍNEZ-FLORES, H. E.; CONTRERAS-CHÁVEZ, R.; GARNICA-ROMO, M. G. Effect of extraction processes on bioactive compounds from Pleurotus ostreatus and Pleurotus djamor: Their applications in the synthesis of silver nanoparticles. **Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials**, v. 31, p. 1406-1418, 2021.

MEDEIROS, R. L. D.; ANDRADE, G. M.; CRISPIM, R. B.; SILVA, N. N. D. S.; SILVA, S. A. D.; SOUZA, H. A. N. D.; ZÁRATE-SALAZAR, J. R.; MEDEIROS, F. D. D.; DANTAS, C. E. A.; VIERA, V. B.; SILVA, A. L. E.; TAVARES, J. F.; PEREIRA, F. D. O. Nutritional and antioxidant potential of Pleurotus djamor (Rumph. ex Fr.) Boedijn produced on agronomic wastes banana leaves and sugarcane bagasse substrates. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1-13, 2024.

MHLONGO, G.; MNISI, C. M.; MLAMBO, V. Cultivating oyster mushrooms on red grape pomace waste enhances potential nutritional value of the spent substrate for ruminants. **PLoS One**, v. 16, n. 2, p. e0246992, 2021.

MOHD HANAFI, F. H.; REZANIA, S.; MAT TAIB, S.; MD DIN, M. F.; YAMAUCHI, M.; SAKAMOTO, M.; HARA, H.; PARK, J.; EBRAHIMI, S. S. ENVIRONMENTALLY SUSTAINABLE APPLICATIONS OF AGRO-BASED. Environmentally sustainable applications of agro-based spent mushroom substrate (SMS): an overview. **Journal of Material Cycles and Waste Management**, v. 20, p. 1383-1396, 2018.

MOURA-MENDES, J.; CAZAL-MARTÍNEZ, C. C.; ROJAS, C.; FERREIRA, F.; PÉREZ-ESTIGARRIBIA, P.; DIAS, N.; GODOY, P.; COSTA, J.; SANTOS, C.; ARRUA, A. Species Identification and Mycotoxigenic Potential of *Aspergillus* Section *Flavi* Isolated from Maize Marketed in the Metropolitan Region of Asunción, Paraguay. **Microorganisms**, v. 11, n. 8, p. 1879, 2023.

NAJAFI, B.; FAIZOLLAHZADEH ARDABILI, S.; SHAMSHIRBAND, S.; CHAU, K. W. Spent mushroom compost (SMC) as a source for biogas production in Iran. **Engineering Applications of Computational Fluid Mechanics**, v. 13, n. 1, p. 967-982, 2019.

NAVALE, V.; VAMKUDOTH, K. R.; AJMERA S.; DHURI, V. *Aspergillus* derived mycotoxins in food and the environment: Prevalence, detection, and toxicity. **Toxicology reports**, v. 8, p. 1008-1030, 2021.

OCIMATI, W.; WERE, E.; TAZUBA, A. F.; DITA, M.; ZHENG, S. J.; BLOMME, G. Spent *Pleurotus ostreatus* substrate has potential for managing *Fusarium* wilt of banana. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 11, p. 946, 2021.

OWAID, M. N.; AL-SAEEDI, S. S. S.; AL-ASSAFFII, I. A. A.. Antifungal activity of cultivated oyster mushrooms on various agro-wastes. **Summa Phytopathologica**, v. 43, n. 1, p. 9-13, 2017.

PÉREZ-CHÁVEZ, A. M.; MAYER, L.; ALBERTÓ, E. Mushroom cultivation and biogas production: A sustainable reuse of organic resources. **Energy for Sustainable Development**, v. 50, p. 50-60, 2019.

RATHORE, H.; PRASAD, S.; SHARMA, S. Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review. **PharmaNutrition**, v. 5, n. 2, p. 35-46, 2017.

RIBEIRO, B. G.; DE SOUZA LEÃO, V. L. X.; GUERRA, J. M. C.; SARUBBO, L. A. Cookies and muffins containing biosurfactant: Textural, physicochemical and sensory analyses. **Journal of Food Science and Technology**, v. 60, n. 8, p. 2180-2192, 2023.

- ROBERTS, A. G.; GIBBS, M. E. Mechanisms and the clinical relevance of complex drug–drug interactions. **Clinical pharmacology: advances and applications**, p. 123-134, 2018.
- ROCHA, M. A. N. D.; SILVA, E. P.; SILVA, R. N. M.; SOUSA, G. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MAIA, M. D. S.; LIMA, A. S.; DE SOUZA-FERRARI, J.; PEREIRA, F. O. Riparin II-type benzamides as novel antibiofilm agents against dermatophytes: chemical synthesis, in vitro, ex vivo and in silico evaluation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 79, n. 3, p. 617-631, 2024.
- SABINO, Raquel. *Aspergillus* and health. **Microorganisms**, v. 10, n. 3, p. 538, 2022.
- SÁNCHEZ, C. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 85, p. 1321-1337, 2010.
- SANDNER, G.; KÖNIG, A.; WALLNER, M.; WEGHUBER, J. Alternative model organisms for toxicological fingerprinting of relevant parameters in food and nutrition. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 62, n. 22, p. 5965-5982, 2022.
- SEN, P.; VIJAY, M.; SINGH, S.; HAMEED, S.; VIJAYARAGHVAN, P. Understanding the environmental drivers of clinical azole resistance in *Aspergillus* species. **Drug Target Insights**, v. 16, p. 25, 2022.
- SHIMA, Y.; ITO, Y.; KANEKO, S.; HATABAYASHI, H.; WATANABE, Y.; ADACHI, Y.; YABE, K. Identification of three mutant loci conferring carboxin-resistance and development of a novel transformation system in *Aspergillus oryzae*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 1, p. 67-76, 2009.
- STEVENSON, E. M.; GAZE, W. H.; GOW, N. A. R.; HART, A.; SCHMIDT, W.; USHER, J.; WARRIS, A.; WILKINSON, H.; MURRAY, A. K. Antifungal exposure and resistance development: defining minimal selective antifungal concentrations and testing methodologies. **Frontiers in Fungal Biology**, v. 3, p. 918717, 2022.
- TAVAKKOLI, H.; DERAKHSHANFAR, A.; MOAYEDI, J.; POOSTFOROOSH FARD, A. Utilization of a chicken embryo membrane model for evaluation of embryonic vascular toxicity of *Dorema ammoniacum*. **Avicenna journal of phytomedicine**, v. 10, n. 2, p. 152, 2020.
- TÖRÖS, G.; EL-RAMADY, H.; PROKISCH, J.; VELASCO, F.; LLANAJ, X.; NGUYEN, D. H. H.; PELES, F. Modulation of the gut microbiota with prebiotics and antimicrobial agents from *Pleurotus ostreatus* mushroom. **Foods**, v. 12, n. 10, p. 2010, 2023.
- UNDERWOOD, W.; ANTHONY, R. AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2020 edition. **Retrieved on March**, v. 2013, n. 30, p. 2020-1, 2020.

VALE, S. R.; GLÓRIA, M. B. A. Determination of biogenic amines in cheese. **Journal of AOAC International**, v. 80, n. 5, p. 1006-1012, 1997.

VAITHANOMSAT, P.; BOONLUM, N.; CHAIYANA, W.; TIMA, S.; ANUCHAPREEDA, S.; TRAKUNJAE, C.; APIWATANAPIWAT, W.; JANCHAI, P.; BOONDAENG, A.; NIMITKEATKAI, H.; JARERAT, A. Mushroom β -glucan recovered from antler-type fruiting body of *ganoderma lucidum* by enzymatic process and its potential biological activities for cosmeceutical applications. **Polymers**, v. 14, n. 19, p. 4202, 2022.

VAN EGMOND, H. P.; SCHOTHORST, R. C.; JONKER, M. A. Regulations relating to mycotoxins in food: perspectives in a global and European context. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 389, p. 147-157, 2007.

VERWEIJ, P. E.; ARENDRUP, M. C.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; GOLD, J. A. W.; LOCKHART, S. R.; CHILLER, T.; WHITE, P. L. Dual use of antifungals in medicine and agriculture: How do we help prevent resistance developing in human pathogens?. **Drug Resistance Updates**, v. 65, p. 100885, 2022.

WHITE, J. K.; NIELSEN, J. L.; POULSEN, J. S.; MADSEN, A. M. Antifungal resistance in isolates of *aspergillus* from a pig farm. **Atmosphere**, v. 12, n. 7, p. 826, 2021.

WOODS, M.; MCALISTER, J. A.; GEDDES-MCALISTER, J. A One Health approach to overcoming fungal disease and antifungal resistance. **WIREs Mechanisms of Disease**, v. 15, n. 4, p. e1610, 2023.

WU, B.; HUSSAIN, M.; ZHANG, W.; STADLER, M.; LIU, X.; XIANG, M. Current insights into fungal species diversity and perspective on naming the environmental DNA sequences of fungi. **Mycology**, v. 10, n. 3, p. 127-140, 2019.

YANG, C.; HAMEL, C.; VUJANOVIC, V.; GAN, Y. Fungicide: modes of action and possible impact on nontarget microorganisms. **International Scholarly Research Notices**, v. 2011, n. 1, p. 130289, 2011.

YIN, C.; FAN, X.; FAN, Z.; SHI, D.; YAO, F.; GAO, H. Comparison of non-volatile and volatile flavor compounds in six *Pleurotus* mushrooms. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 4, p. 1691-1699, 2019.

ZAKIL, F. A.; ISA, R. M.; SUEB, M. S. M.; ISHA, R. Growth performance and mineral analysis of *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom) cultivated on spent mushroom medium mixed with rubber tree sawdust. **Materials Today: Proceedings**, v. 57, p. 1329-1337, 2022.

ZÁRATE-SALAZAR, J. R.; SANTOS, M. N.; CABALLERO, E. N. M.; MARTINS, O. G.; HERRERA, Á. A. P. Use of lignocellulosic corn and rice wastes as substrates for oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus* Jacq.) cultivation. **SN applied Sciences**, v. 2, p. 1-10, 2020.

ZOU, D.; WANG, J.; WANG, W.; YE, X.; YANG, C.; HE, F.; ZHANG, M. Co-occurrences of soil nitrogen cycling and human-disease genes following spent mushroom substrate and nitrification inhibitor applications: A strategy for decreasing health risk. **Land Degradation & Development**, v. 33, n. 15, p. 2769-2782, 2022.

APÊNDICE A

ACS Publishing Center

Powered by ChronosHub

Home

Journals

Author

FP

Fillipe Pereira

fillipe.oliveira@professor.ufcg.edu.br

Article

Under Consideration

One-health approach to managing aflatoxin-producing *Aspergillus flavus* using spent mushroom substrate of *Pleurotus* spp.

ao-2025-008586

Abstract

Food loss represents a critical global concern. *Aspergillus flavus* is central to this issue, contaminating maize crops with aflatoxins. The agricultural fungicide carboxin presents significant challenges due to the rise of resistant fungal strains. This study investigates the antifungal efficacy of spent mushroom substrates from *Pleurotus ostreatus* (SPoS) and *P. djamora* (SPdS) cultivated on banana leaves, combined with carboxin (CBX) against *A. flavus* strains isolated from maize. The SPoS and SPdS extracts showed a low biogenic amine content and a global profile (¹H NMR) of volatile oils, unsaturated fatty acids, polysaccharides, oligosaccharides, tannins, and flavonoids. *A. flavus* strains were not susceptible to amphotericin B and itraconazole. SGPo and SGPd exhibited fungicidal activity against all strains tested, with MIC values ranging from 1024 to 2048 mg/L. CBX demonstrated fungicidal activity with MIC values ranging from 32 to 512 mg/L. No antagonism between CBX+SPdS and CBX+SPoS was observed. SPoS and SPdS showed significant inhibition of conidial germination and mycelial growth, but CBX+SPdS and CBX+SPoS were more potent than individual agents ($p < 0.05$). SPoS and SPdS reduced conidial germination and mycelial growth by more than 70%. The study also assessed the irritation potential of these agents using the HET-CAM model, classifying them as moderate irritants. These findings support that SPdS and SPoS can potentially reduce the required dosages and frequency of application of CBX, leading to more sustainable antifungal treatments with minimized environmental and resistance risks, which aligns with a one-health approach.

Previous Submission

Has this manuscript in whole or in part been previously submitted to this journal?

ACS Omega

ACS Publications

10 YEARS

APÊNDICE B



31/03/2025 08:34 870250025231



29409162334367377

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2025 006319 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE - PB

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 05055128000176

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: AV. APRIGIO VELOSO, 882 - UNIVERSITÁRIO

Cidade: Campina Grande

Estado: PB

CEP: 58429900

País: Brasil

Telefone: (83) 2011601

Fax: (83) 21011601

Email: nitt@ufcg.edu.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 31/03/2025 às 08:34, Petição 870250025231