

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia

Ocorrência, susceptibilidade a antifúngicos e fatores de virulência de leveduras oportunistas isoladas de praias dos estados do Rio de Janeiro e Paraná

Natália Oliveira Pereira Maciel

Belo Horizonte

2014

Natália Oliveira Pereira Maciel

Ocorrência, susceptibilidade a antifúngicos e fatores de virulência de leveduras oportunistas isoladas de praias do Rio de Janeiro e Paraná

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de doutora em Microbiologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Susana Johann

CO-ORIENTADOR: Dr. Patrick Van Dijck

Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por cada passo dado até chegar aqui. Eu sei que todas as conquistas em minha vida são graças a Ele. Agradeço também por tantas pessoas queridas que Ele colocou em minha vida, tanto em casa quanto no trabalho, e que foram fundamentais durante o percorrer deste caminho.

Agradeço ao professor Dr. Carlos Rosa pelo acolhimento no laboratório desde a iniciação científica e pela oportunidade única de crescimento e aprendizagem. Agradeço também por todo suporte, orientação, amizade e confiança.

À professora Dra. Susana Johann, agradeço pela orientação e por toda disponibilidade em ajudar e a discutir o projeto, pelo apoio, pela confiança e amizade.

Ao professor Dr. Patrick Van Dijck, agradeço por ter me acolhido em seu laboratório e por todo suporte dado durante minha estadia em Leuven. Agradeço também pela experiência e pelo importante aprendizado adquirido durante os oito meses de doutorado sanduíche.

À professora Dra. Franciane Pellizzari, agradeço a importante colaboração e ao suporte recebido durante as coletas realizadas no Paraná.

Ao professor Dr. Daniel de Assis, agradeço pela ajuda e pelo suporte dado em relação aos experimentos *in vivo*. Agradeço também ao Gustavo e ao Leonardo pela importante ajuda na realização dos experimentos envolvendo o uso de animais e a todo o pessoal do laboratório de Micologia pela boa vontade com que me receberam e me orientaram quando tive dúvidas ou precisei de ajuda.

Ao Fred, agradeço pela ajuda com as análises estatísticas e especialmente pelo tempo dedicado, pela boa vontade e pela paciência em tentar responder todas as minhas perguntas.

À Sarah pela importante ajuda durante o preparo para o estágio no exterior, pelo apoio e pela amizade.

Agradeço ao grupo de águas do Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos (Luciana, Lília e Alexandre) tanto pelo auxílio na

realização de alguns experimentos quanto pelas construtivas discussões referentes às partes teóricas e práticas. Agradeço de forma especial à Luciana por todo apoio e pela companhia durante as coletas.

Aos colegas e amigos do MCB Lab, em especial o pessoal do Candida Lab, à Dra. Hélène Tournu e à Dra. Soňa Kucharíková, agradeço o importante apoio, a paciência e o suporte dado na realização dos experimentos durante o período de doutorado sanduíche na KULeuven. Agradeço também à família belga Bruna Trindade, Thiago Sousa, Carolina Gusmão e Rocco pela amizade e pelos momentos de descontração que foram fundamentais para amenizar as saudades do Brasil.

A todos os amigos do laboratório, seja os mais novos ou os mais antigos, agradeço pela agradável convivência e por todo apoio recebido. Sem dúvidas, todos contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho. Às curicas: Alice, Bárbara, Camila Carvalho, Camila Gontijo, Camila Silva, Débora, Fernanda Piló, Francisca, Iara, Jordana, Larissa, Laura, Letícia, Lília, Mariana Costa, Mariana Rocha, Monaliza, Raquel, Renata, Silvana e Vívian. Aos demais amigos e amigas: Ana Raquel, Beatriz, Carla Lara, Carla Pataro, César, Cristiane Bigatti, Denise, Gabriela Breder, Gabriela Montandon, Graziela, Isabel, Jandora, Luciana, Luiz Rosa, Marco Aurélio, Mariana Vieira, Marina Moura, Marina Lima e Valéria.

Agradeço de forma especial à Camila Gontijo e à Alice pela amizade, pelo carinho, pelas conversas, pelos conselhos e pelo apoio em toda e qualquer situação, dentro e fora do laboratório. À Thaís, pela amizade, pelo apoio e por compreender tantos momentos de ausência.

Agradeço à Dra. Beatriz Borelli, Dra. Jovita Gazzinelli, Dra. Rachel Caligiorne e Dra. Raquel Vilela por terem aceitado o convite para compor a banca examinadora da minha defesa de doutorado. Tenho certeza que todas terão importantes contribuições a oferecer durante à discussão deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), agradeço o auxílio financeiro.

E por fim, agradeço à minha família que é o bem maior que Deus me deu. À minha mãe e ao meu pai por tudo o que me ensinaram e por todo o apoio e

amor incondicional que me dedicaram. Às minhas irmãs que amo muito, Andréia e Denise, pelo carinho, pelo apoio e pela amizade. À minha vizinha querida, Marizita, pelo amor, pela torcida, pelo cuidado e pelas orações. E à minha vizinha Ana, pela mãe que foi. À dona Cléa, Leiquinha, Adriano e Artur por me fazerem me sentir uma pessoa muito querida com todo o carinho e cuidado que demonstram, e por todas as orações. E ao meu marido e companheiro de todas as horas, Cuca, pelo amor, pelo apoio constante, pela paciência e compreensão e por todos os momentos juntos. Amo muito a todos vocês!

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho o meu muito obrigada!

RESUMO

O objetivo principal deste trabalho foi determinar a ocorrência de *Candida albicans* e outras leveduras oportunistas em amostras de água e areia de praias dos estados do Rio de Janeiro e Paraná, buscando correlacionar estes micro-organismos com os indicadores convencionais de poluição fecal. Além disso, o potencial patogênico destas leveduras foi avaliado por meio da pesquisa de fatores de virulência e da susceptibilidade aos antifúngicos usuais. Durante o ano de 2010, foram coletadas 72 amostras de água e 144 de areia. Para o isolamento de leveduras, as amostras de água e os lavados das amostras de areia foram filtrados através de membranas estéreis que foram depositadas sobre a superfície de três diferentes meios. Para a determinação de leveduras totais, foi utilizado o ágar Extrato de Malte-Extrato de Levedura que foi incubado a 25°C. Para isolamento diferencial de espécies de *Candida* potencialmente patogênicas foi utilizado o CHROMagar-Candida que foi incubado a 37°C. O isolamento de possíveis leveduras *C. albicans* foi feito a 37°C em ágar mCA. As leveduras foram identificadas por meio do sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA. Isolados de espécies oportunistas foram submetidos a testes de susceptibilidade aos antifúngicos fluconazol, itraconazol e anfotericina B e avaliados quanto à presença de fatores de virulência como a produção de proteinase, a adesão a células epiteliais bucais, a capacidade de sofrer morfogênese e a capacidade de formar biofilme em fragmentos de cateter *in vitro* e *in vivo*. Por fim, foram selecionadas linhagens para a realização de testes de virulência *in vivo* utilizando camundongos BALB/c como modelo animal. Para a quantificação de *Escherichia coli* foi utilizado o método do substrato definido, utilizando o reagente COLILERT. As contagens de leveduras variaram de 0 a 408 UFC/g para as areias e de 0 a 172UFC/100mL para as águas. Não foram encontradas correlações significativas entre as densidades de leveduras e de bactérias indicadoras nas amostras avaliadas. Dentre as 96 diferentes espécies de leveduras isoladas em CHROMagar-Candida, *C. parapsilosis* foi a mais prevalente, seguida de *Rhodotorula mucilaginosa* e *Meyerozyma guilliermondii*. Em ágar mCA, apenas três dos 74 isolados foram identificados como *C. albicans*. Sessenta e um por cento das 144 leveduras testadas quanto à susceptibilidade aos antifúngicos apresentaram resistência ou sensibilidade dose-dependente a pelo menos uma das drogas avaliadas. Quanto à produção de proteinase, 41% das 144 linhagens

avaliadas apresentaram formação de halo em meio contendo albumina de soro bovino, sendo assim consideradas positivas. As espécies que apresentaram maiores índices de adesão às células epiteliais bucais (CEBs) foram *C. albicans*, com uma média de 146 leveduras aderidas a cada 50 CEBs, e *Kodamaea ohmeri*, com 286 leveduras aderidas a cada 50 CEBs. Todas as linhagens de *C. albicans* testadas foram capazes de sofrer morfogênese e formar biofilme em fragmentos de cateter tanto em experimentos *in vitro* quanto *in vivo*. Além disso, foi possível confirmar o potencial patogênico de três destas linhagens durante o ensaio de infecção disseminada. A identificação de diversas espécies de leveduras oportunistas isoladas a partir das amostras de água e areia coletadas em praias do Rio de Janeiro e Paraná, bem como a presença de fatores de virulência e a ocorrência de resistência aos antifúngicos entre as mesmas, sugerem um risco potencial à saúde de pessoas, principalmente imunocomprometidas, que utilizam estes ambientes para recreação.

ABSTRACT

The main objective of this work was to determine the occurrence of *Candida albicans* and other opportunistic yeasts in sand and water samples from beaches in Brazil and try to correlate these microorganisms with the conventional indicators of fecal pollution. Pathogenic potential of these yeasts was also assessed by the research of virulence factors and the susceptibility to usual antifungal drugs. A total of 72 water samples and 144 sand samples were collected during the year 2010. Sand suspensions and water samples were filtered through sterile membranes and the filters were placed onto three different culture media. To determine the total yeast counts, it was used the YM agar plates that were incubated at 25°C. For the differential isolation of *Candida* species, it was used the CHROMagar-Candida plates that were incubated at 37°C. The isolation of possible *C. albicans* strains was performed on mCA agar at 37°C. Yeasts were identified by sequencing of the D1/D2 variable domains of the large-subunit of the gene of the rRNA. Yeast isolates belonging to opportunistic species were evaluated regarding their susceptibility to fluconazole, itraconazole and amphotericin B. The presence of virulence factors such proteinase production, adhesion to buccal epithelial cells, morphogenesis, and the *in vitro* and *in vivo* biofilm formation on catheter pieces were also investigated. Finally, strains were selected for carrying out virulence tests using Balb/c mice as model. *Escherichia coli* and total coliforms were enumerated by using the defined substrate technology (Colilert). Yeast counts ranged from 0 to 408CFU/g for sand and from 0 to 172CFU/100mL for water. There were no significant correlations between yeast and indicator bacteria densities in the collected samples. Among the 96 different yeast species isolated in CHROMagar-Candida, *C. parapsilosis* was the most prevalent, followed by *Rhodotorula mucilaginosa* and *Meyerozyma guilliermondii*. Only three of 74 yeast isolates in mCA agar were identified as *C. albicans*. Sixty one percent of the 144 evaluated yeasts presented resistance or dose-dependent sensibility to at least one tested drug. Regarding the proteinase production, 41% of the 144 evaluated strains showed halo formation on medium containing bovine serum albumin, and thus were considered positive. Species that presented the highest rates of adhesion to buccal epithelial cells (BEC) were *C. albicans* with an average of 146 yeasts every 50 BECs, and *Kodamaea ohmeri* with 286 yeasts every 50 BECs. All *C. albicans* strains that were tested were able to undergo

morphogenesis and form biofilm on the catheter fragments in experiments both *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, it was possible to confirm the pathogenic potential of three of these strains during the disseminated infection test. The identification of several opportunistic yeast species isolated from water and sand samples collected from beaches in Rio de Janeiro and Paraná states, and the presence of virulence factors and the occurrence of antifungal resistance among them, suggest a potential risk to health of people who use these environments for recreational purposes.

SUMÁRIO

1 – RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	1
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 – Leveduras em ecossistemas aquáticos	3
2.1.1 Introdução à ecologia de leveduras.....	3
2.1.2 Ocorrência e diversidade de leveduras em ambientes aquáticos	5
2.1.3 Ocorrência e diversidade de leveduras em sedimentos de praias.....	7
2.2 Poluição das águas e areias em ecossistemas litorâneos	8
2.2.1 Riscos à saúde associados à recreação em praias impactadas pela poluição antrópica.....	9
2.2.2 Indicadores de poluição fecal em ecossistemas aquáticos	12
2.2.3 Aplicação de leveduras como indicadoras microbiológicas de qualidade da água em ambientes naturais.....	14
2.2.4 Padrões microbiológicos adotados para a análise da qualidade de águas e sedimentos de praias.....	16
2.3 <i>Candida</i> spp. e outras leveduras oportunistas.....	18
2.3.1 <i>Candida</i> spp. e outras leveduras oportunistas	18
2.3.2 Fatores de virulência de leveduras oportunistas	21
2.3.3 Susceptibilidade de leveduras a agentes antifúngicos	22
2.3.4 <i>Candida</i> spp. e outras leveduras oportunistas no ambiente	24
3 – OBJETIVOS	26
3.1 – Objetivo geral.....	26
3.2 – Objetivos específicos	26
4 – MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 – Coleta.....	28
4.1.1 Área de estudo.....	29
4.1.2 Amostragem	31
4.2 – Isolamento de leveduras	32
4.3 – Identificação de leveduras	33
4.3.1 – Identificação molecular	33

4.3.1.1 - Extração de DNA	33
4.3.1.2 - Impressão digital de DNA de leveduras basidiomicéticas utilizando o iniciador (GTG) ₅	34
4.3.1.3 - Impressão digital de DNA de leveduras ascomicéticas utilizando o iniciador EI1	35
4.3.1.4 - Sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA	35
4.4 – Teste de sensibilidade de leveduras oportunistas a antifúngicos	36
4.5 – Pesquisa de fatores de virulência.....	38
4.5.1 – Testes de produção de proteinase por leveduras oportunistas	38
4.5.2 – Teste de adesão a células epiteliais bucais de leveduras oportunistas	39
4.5.3 – Pesquisa de fatores de virulência de linhagens de <i>C. albicans</i>	40
4.5.3.1 Estudo da morfogênese de linhagens de <i>C. albicans</i>	40
4.5.3.2 – Teste da capacidade de formação de biofilme de linhagens de <i>C. albicans</i>	41
4.5.3.3 - Ensaio de virulência de linhagens de <i>C. albicans in vivo</i>	43
4.6 – Quantificação de coliformes totais e <i>E. coli</i>	43
4.7 – Análises estatísticas	44
<u>5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	<u>45</u>
5.1 – Quantificação de coliformes totais e <i>E. coli</i>	45
5.2 – Quantificação de leveduras totais	51
5.3 – Parâmetros físico-químicos	53
5.4 – Isolamento e identificação de leveduras crescidas em Chromagar-Candida	55
5.5 – Isolamento e identificação de leveduras crescidas em ágar mCA.....	64
5.6 – Teste de sensibilidade de leveduras oportunistas a antifúngicos	67
5.7 – Pesquisa de fatores de virulência.....	74
5.7.1 – Testes de produção de proteinase por leveduras oportunistas	74
5.7.2 – Adesão a células epiteliais bucais de leveduras oportunistas	76
5.7.3 – Pesquisa de fatores de virulência de linhagens de <i>C. albicans</i>	78
5.7.3.1 Estudo da morfogênese de linhagens de <i>C. albicans</i>	79
5.7.3.2 Teste da capacidade de formação de biofilme de linhagens de <i>C. albicans</i>	84
5.7.3.3 Ensaio de virulência de linhagens de <i>C. albicans in vivo</i>	88
<u>6- CONCLUSÕES</u>	<u>90</u>
<u>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</u>	<u>92</u>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Pontos de coleta nas praias de Ipanema e Copacabana na cidade do Rio de Janeiro/RJ.....	28
Figura 2 – Pontos de coleta nos municípios de Pontal do Paraná e Matinhos no estado do Paraná.	29
Figura 3 – Esquema de amostragem de água e areia em cada ponto de coleta.	32
Figura 4 – Boxplot das densidades de coliformes totais em amostras de areia em função das zonas onde estas amostras foram coletadas.....	46
Figura 5 – Boxplot das densidades de <i>E. coli</i> em amostras de areia em função das zonas onde estas amostras foram coletadas.....	48
Figura 6 – Boxplot das densidades de leveduras em amostras de areia em função das zonas onde estas amostras foram coletadas.....	52
Figura 7 – Colônias de leveduras crescidas sobre membranas de nitrocelulose utilizando o meio CHROMagar-Candida durante o processo de isolamento.....	56
Figura 8 – Colônias de leveduras crescidas sobre membranas de nitrocelulose utilizando o meio mCA durante o processo de isolamento.....	65
Figura 9 – Teste de produção de proteinase por leveduras isoladas a partir de amostras de água e areia de praias dos estados do Rio de Janeiro e Paraná.	74
Figura 10 - Células de <i>Candida albicans</i> aderidas a uma célula epitelial bucal.....	78
Figura 11 – Imagens obtidas com auxílio de microscópio óptico (40x) das linhagens de <i>Candida albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> (FIC3S.1) e <i>Kodamaea ohmeri</i> (BP11.4) em meio YPD líquido acrescido de soro fetal bovino (10%).....	83
Figura 12 – Adesão de linhagens de <i>Candida albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> e <i>Kodamaea ohmeri</i> a fragmentos de cateter de poliuretano.....	84
Figura 13 – Formação de biofilme por linhagens de <i>Candida albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> e <i>Kodamaea ohmeri</i> sobre fragmentos de cateter de poliuretano.....	85
Figura 14 – Formação de biofilme por linhagens de <i>Candida albicans</i> e <i>Kodamaea ohmeri</i> sobre fragmentos de cateter de poliuretano implantados sob a pele de camundongos Balb/C.....	87
Figura 15 – Curva de sobrevivência obtida pelo método de Kaplan-Meier para os grupos de camundongos desafiados com as diferentes linhagens de <i>Candida albicans</i> (SC5314, PHM3.1, LPM1.6 e SLM1.1) e com a linhagem de <i>Kodamea ohmeri</i> (BP11.4).	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Padrões microbiológicos exigidos pela Resolução do CONAMA nº. 274/2000 para balneabilidade em águas brasileiras (NMP/100mL).	16
Tabela 2 - Padrões microbiológicos para classificação das areias das praias determinados pela Secretaria Municipal do Meio Ambiente do Rio de Janeiro por meio da Resolução nº. 468/10.....	17
Tabela 3 - Parâmetros microbiológicos a serem avaliados em amostras de areia de praia segundo o relatório divulgado pela Associação Bandeira Azul da Europa e os respectivos valores recomendados e admissíveis (ABAE, 2002; 2011).	18
Tabela 4 – Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) utilizadas como referência em testes de susceptibilidade <i>in vitro</i> para linhagens de <i>Candida</i>	38
Tabela 5 – Densidades de leveduras, coliformes totais e <i>Escherichia coli</i> em amostras de água e areia coletadas em praias recreacionais do estado do Rio de Janeiro.	49
Tabela 6 – Densidades de leveduras e <i>Escherichia coli</i> em amostras de água e areia coletadas em praias recreacionais do estado do Paraná.	50
Tabela 7 – Valores médios de pH, salinidade e temperatura das amostras de água e areia coletadas em praias dos estados do Rio de Janeiro e Paraná.	55
Tabela 8 - Número de leveduras isoladas em meio Chromagar-Candida.....	55
Tabela 9 – Espécies de leveduras isoladas em Chromagar-Candida a partir de amostras de água e areia coletadas em praias dos estados do Rio de Janeiro e Paraná com as respectivas ocorrências e contagens.	60
Tabela 10 - Número de leveduras isoladas em meio ágar mCA.....	64
Tabela 11 – Espécies de leveduras isoladas em ágar mCA a partir de amostras de água e areia coletadas em praias dos estados do Rio de Janeiro e Paraná com as respectivas ocorrências e contagens.	Error! Bookmark not defined.
Tabela 12 - Resultado geral dos testes de susceptibilidade a antifúngicos.....	67
Tabela 13 – Concentração inibitória mínima dos antifúngicos fluconazol, itraconazol e anfotericina B para leveduras associadas a humanos e produção de proteinase por estas últimas.....	71
Tabela 14 - Adesão de leveduras isoladas de amostras de água e areia de praias dos estados do Rio de Janeiro e Paraná.	77
Tabela 15 – Morfologia das colônias das linhagens de <i>Candida albicans</i> e demais leveduras avaliadas em diferentes meios indutores de filamentação.	81

1 – RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

As águas marinhas costeiras contêm uma grande diversidade de micro-organismos, entre bactérias, fungos e vírus, que podem ou não ser patogênicos. As leveduras fazem parte desta microbiota, contribuindo com um grande número de espécies, sendo a maioria alóctone, isto é, introduzida neste ambiente por meio de efluentes de esgotos e do uso intensivo por banhistas, ou simplesmente pelo aporte de material terrestre. Assim, há uma correlação entre o nível de poluição local e a densidade e o número de espécies de leveduras presentes no mar. Como muitas destas espécies de leveduras encontradas em águas poluídas são consideradas patógenos oportunistas, as atividades recreativas nestes locais podem resultar no desenvolvimento de doenças, como infecções de ouvido, olhos, garganta e pele nos banhistas. Esta diversidade de micro-organismos também é encontrada nas areias das praias e sofre influência direta das comunidades presentes nas águas do mar.

Como são poucos os estudos com linhagens de *C. albicans* e outras leveduras oportunistas obtidas a partir de amostras ambientais, o conhecimento sobre a virulência destes micro-organismos ainda é restrito. Muitas vezes estes fungos são isolados de ambientes utilizados para recreação, estando em contato direto com humanos, sejam adultos saudáveis ou mesmo crianças, idosos e indivíduos imunossuprimidos, o que torna necessária uma maior investigação destas linhagens, até mesmo para avaliar o risco de exposição às mesmas.

Assim, a avaliação e o monitoramento da qualidade das águas e areias das praias de recreação são extremamente importantes a fim de se estabelecer o risco de exposição dos usuários aos contaminantes encontrados nestes locais. Entretanto, em países tropicais e subtropicais, os indicadores microbiológicos de poluição fecal hoje utilizados nem sempre desempenham o papel desejado, pois populações destes micro-organismos muitas vezes podem permanecer viáveis no ambiente por longos períodos de tempo, além de não apresentarem uma boa correlação com a presença de alguns patógenos. Outros micro-organismos poderiam ser utilizados como indicadores de poluição de forma complementar aos tradicionalmente empregados, entretanto, ainda não há um consenso entre os pesquisadores sobre qual grupo ou qual organismo atenderia bem a esta finalidade.

Assim, este trabalho tem como objetivo determinar a ocorrência de leveduras em águas e areias de algumas praias do Rio de Janeiro e do Paraná, bem como,

buscar uma correlação entre as espécies encontradas com os indicadores convencionais de poluição fecal. Além disso, pretende-se avaliar o potencial patogênico das leveduras isoladas por meio da pesquisa de fatores de virulência, do perfil de susceptibilidade aos antifúngicos usuais e da capacidade de causar doença em camundongos.

2.1 – Leveduras em ecossistemas aquáticos

2.1.1 Introdução à ecologia de leveduras

As leveduras correspondem a um grupo heterogêneo de fungos ascomicéticos e basidiomicéticos que possuem como características comuns um crescimento vegetativo predominantemente unicelular e a formação de estágios sexuais não incluídos em corpos de frutificação (KURTZMAN & FELL, 1998). Estes micro-organismos são considerados ubíquos, fazendo parte da maioria dos ecossistemas naturais. Uma ampla diversidade de leveduras ocorre no solo, em águas doces e marinhas, e em associação com plantas e animais (DEAK, 2006). Atualmente, há cerca de 1500 espécies descritas, pertencentes a 149 gêneros, sendo que as estimativas sugerem que este número represente apenas cerca de 1% das espécies existentes na natureza (KURTZMAN & FELL, 2006; KURTZMAN et al., 2011).

Uma variedade de fatores bióticos e abióticos exerce influência na vida das leveduras. Assim, o conjunto de condições prevalentes em cada ambiente irá definir a atividade metabólica, o crescimento e a sobrevivência das mesmas (DEAK, 2006; WALKER, 2011). A temperatura é uma das principais propriedades físicas que regem o crescimento destes fungos. A maioria das leveduras é mesófila e cresce bem entre 20 e 30°C. Leveduras psicrófilas, com temperaturas ótimas de crescimento abaixo de 20°C, também têm sido isoladas de regiões mais frias como, por exemplo, de águas antárticas. No entanto, espécies termofílicas são raras (VAZ et al., 2011; WALKER, 2011).

Outras características que contribuem para a seleção das espécies de um determinado local são (DEAK, 2006):

- o pH - no geral, as leveduras são acidofílicas e crescem muito bem em faixas de pH entre 4,5 e 6,5, mas toleram também valores de pH entre 3 e 10;
- a atividade de água - embora muitas espécies sejam capazes de suportar condições de baixa atividade de água, a maior parte não se desenvolve bem em atividades de água inferiores a 0,80;

- a concentração de oxigênio - a maioria das leveduras é aeróbica e mesmo as espécies anaeróbicas facultativas, capazes de realizar fermentação, não crescem bem sob condições de completa anaerobiose, uma vez que o oxigênio é um fator de crescimento necessário na biossíntese de esteróis e ácidos graxos da membrana;
- as interações entre micro-organismos – quando há a sobreposição de diferentes populações de micro-organismos em uma mesma comunidade, é natural que haja interações entre as mesmas. Estas interações podem favorecer ou prejudicar a adaptação de determinada espécie de levedura em um local particular.

Na abordagem dos ecossistemas aquáticos, outros dois fatores ambientais devem ser levados em consideração: a radiação solar e a pressão hidrostática. As poucas observações que foram feitas em relação aos efeitos da luz solar sobre as leveduras apontam para um efeito fungicida de determinados comprimentos de onda ultravioleta. Isto ajudaria a explicar a relativa abundância de espécies pigmentadas na superfície de plantas e em águas oligotróficas com altos índices de transparência. Em relação à pressão, já foram isoladas leveduras de sedimentos e organismos bentônicos a profundidades de 2.000 a 6.500m. Dentre aquelas isoladas de locais profundos, há uma prevalência de leveduras vermelhas (DEAK, 2006).

Por fim, uma importante questão que interfere diretamente na manutenção e na reprodução das células de leveduras é a disponibilidade de nutrientes. São necessárias fontes de carbono, nitrogênio e sais minerais. Além disso, algumas leveduras podem requerer fontes externas de vitaminas ou outros fatores de crescimento. As fontes mais importantes de carbono e energia são os carboidratos, principalmente os açúcares tais como as hexoses e os oligossacarídeos. Embora muitas leveduras possuam a capacidade de fermentar determinados açúcares simples, cerca da metade das espécies conhecidas realiza exclusivamente a oxidação aeróbica (DEAK, 2006; RODRIGUES et al., 2006). Todas as leveduras são capazes de utilizar fontes inorgânicas de nitrogênio e muitas espécies podem utilizar também fontes orgânicas. Já foram descritas mais de 50 diferentes fontes de nitrogênio para estes fungos incluindo L-aminoácidos, D-aminoácidos, pirimidinas, purinas, poliaminas, aminas, nitratos e nitritos. O padrão de utilização destes compostos varia com a espécie (MESSENGUY et al., 2006).

A diversidade de perfis bioquímicos e fisiológicos dentre as leveduras torna estes micro-organismos mais versáteis ao permitir a utilização de uma ampla variedade de nutrientes disponíveis e, conseqüentemente, ampliando os possíveis

nichos de colonização (DEAK, 2006). Um importante papel das leveduras na natureza, similar aos dos demais fungos heterotróficos, é o de atuar como decompositoras por meio da conversão de uma variedade de materiais orgânicos complexos em compostos orgânicos simples e moléculas inorgânicas. Assim, carbono, nitrogênio, fósforo e outros elementos fundamentais tornam-se novamente disponíveis no ambiente para outros organismos vivos (PRESCOTT et al., 1999; KUTTY & PHILIP, 2008).

2.1.2 Ocorrência e diversidade de leveduras em ambientes aquáticos

As leveduras encontram-se distribuídas em quase todos os ambientes naturais aquáticos, ou seja, em oceanos e mares, estuários, lagos e rios. Nas últimas décadas, vários estudos têm sido desenvolvidos visando caracterizar as populações de leveduras presentes nestes locais (HAGLER & MENDONÇA-HAGLER, 1981; ROSA et al., 1990; GADANHO et al., 2003; VOGEL et al., 2007; LOUREIRO et al., 2005; WANG et al., 2008; CHEN et al., 2009; BRANDÃO et al., 2010; FRANCIS, 2013). Os dados gerados por estes trabalhos permitiram aos pesquisadores a observação de características gerais que se adequam à maioria dos ambientes estudados e que serão discutidas a seguir.

Em relação às densidades de leveduras, nota-se uma maior contagem em águas doces do que em águas marinhas, embora isso varie com o nível de poluição e com a presença de florescimentos de algas e de vegetais. Além disso, há um decréscimo na quantidade de leveduras com o aumento da distância da costa e da profundidade da água (HAGLER & AHEARN, 1987; NAGAHAMA, 2006). As populações de leveduras menos densas são encontradas em oceanos abertos, onde contagens de aproximadamente 10 células por litro são comuns. As contagens destes micro-organismos, por litro, variam geralmente de até 100 para águas não poluídas de lagos e regiões costeiras, de 100 a 500 em ambientes mesotróficos, de 500 a 1000 em águas poluídas, mas ainda consideradas seguras para recreação, e maiores que 1000 para águas eutróficas. As densidades em esgotos são altamente variáveis, mas são muito superiores àquelas próprias de águas naturais (HAGLER & AHEARN, 1987).

Apesar da ampla diversidade de espécies de leveduras que já foram isoladas de amostras de água, apenas um número limitado é consistentemente prevalente

(KOHLMEYER & KOHLMEYER, 1979). Dentre as espécies encontradas com frequência destacam-se as leveduras vermelhas, especialmente em trabalhos envolvendo águas marinhas e doces oligotróficas. Dentre estas, o gênero *Rhodotorula* é o mais comum, mas espécies de *Rhodospiridium* e *Sporobolomyces* também são encontradas (NAGAHAMA, 2006). Os fatores que podem favorecer a abundância de espécies de *Rhodotorula* nos oceanos incluem a tolerância osmótica e a habilidade de suportar altas pressões (40 MPa) características de zonas mais profundas (MUNN, 2004). As leveduras negras também são usualmente isoladas de todos os tipos de águas, porém a baixas densidades, sendo representadas principalmente pela espécie *Aureobasidium pullulans*. Os fungos pertencentes a esta espécie são comumente associados com folhagens e com o solo e, provavelmente, entram na água sendo transportados por carreadores terrestres. A levedura ascomicética mais comum em águas marinhas é a espécie *Debaryomyces hansenii*. A tolerância à salinidade e a habilidade de utilizar uma grande variedade de fontes de carbono são provavelmente fatores relacionados à ampla distribuição desta levedura. Outras espécies comumente isoladas tanto de águas doces quanto marinhas são *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus albidus* e *Cr. laurentii*. No geral, as leveduras basidiomicéticas são prevalentes em amostras de águas oligotróficas e/ou profundas, enquanto as ascomicéticas são encontradas em maiores números em amostras de águas rasas e/ou ricas em matéria orgânica (HAGLER & AHEARN, 1987; NAGAHAMA, 2006; KANDASAMY et al., 2012).

As leveduras isoladas de ecossistemas marinhos podem ser divididas em marinhas obrigatórias e facultativas. As obrigatórias são aquelas que, até o momento, não foram isoladas de qualquer outro lugar que não seja o ambiente marinho, enquanto que as facultativas são também encontradas em habitats terrestres (KUTTY & PHILIP, 2008; FELL et al., 2012). As leveduras de ocorrência marinha em geral não pertencem a um gênero ou grupo específico, mas são representadas por uma grande variedade de gêneros bem conhecidos, como *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula* e *Trichosporon*. Nenhum indício fisiológico peculiar foi encontrado para explicar a ocorrência de leveduras nestes ambientes. A tolerância à salinidade não distingue as espécies marinhas das terrestres, uma vez que quase todas as leveduras podem crescer em concentrações de cloreto de sódio superiores às normalmente encontradas no mar (KUTTY & PHILIP, 2008).

A ocorrência e o papel das leveduras em águas marinhas costeiras estão bem estabelecidos. Estas leveduras são referidas como agentes verdadeiramente versáteis de biodegradação e participam de uma série de processos ecologicamente significativos no mar, especialmente em estuários e em ambientes próximos à costa. Dentre esses processos destacam-se a decomposição de substratos vegetais, a reciclagem de nutrientes, a biodegradação de compostos recalcitrantes e o parasitismo de animais marinhos (VOGEL et al., 2007).

2.1.3 Ocorrência e diversidade de leveduras em sedimentos de praias

As areias das praias se tornaram um elemento passivo de acúmulo de poluição apresentando entradas constantes de micro-organismos. Além da retenção de células das águas que escoam das superfícies urbanas, há também a contribuição dos lixos deixados pelos banhistas e de dejetos animais. Além disso, alguns micro-organismos são liberados nas areias pelos próprios usuários das praias (SATO et al., 2005). Uma vez nos sedimentos, fungos e bactérias podem encontrar condições que favoreçam a sobrevivência e o desenvolvimento dos mesmos, como por exemplo, uma maior proteção em relação à exposição solar, maior disponibilidade de nutrientes, menor predação, grande área de superfície disponível para formação de biofilme e alta umidade (HEANEY et al., 2009).

Densidades relativamente altas de leveduras, frequentemente acima de 100 células por grama, têm sido relatadas para sedimentos da região entremarés influenciados pela poluição urbana (HAGLER & AHEARN, 1987). Vogel e colaboradores (2007), por exemplo, ao avaliarem três praias de uso recreacional no sul da Flórida observaram que as médias das contagens de leveduras nas areias giraram em torno de 198 UFC/g na praia de maior uso, enquanto as médias das praias de moderado e baixo uso foram em torno de 24 e 17 UFC/g, respectivamente. Em outro estudo realizado em duas praias do mar Báltico, foi encontrada nos sedimentos uma densidade média de leveduras acima de 150 UFC/g na praia de maior pressão antrópica, enquanto na praia localizada em uma reserva natural a densidade média foi abaixo de 50 UFC/g (MUDRYK et al., 2013).

A frequência de leveduras nos sedimentos depende ainda do tipo de sedimento. Fell e colaboradores (1960), em um trabalho realizado na Baía Biscayne (Flórida), notaram que estes micro-organismos foram mais abundantes em lamas

siltosas do que nas areias. Além disso, as densidades de leveduras também alteram com a profundidade dos sedimentos coletados. Os poucos centímetros superiores das areias abrigam as maiores contagens de leveduras, o que pode ser explicado pela disponibilidade de oxigênio que pode funcionar como um fator limitante para o crescimento destes micro-organismos (KUTTY & PHILIP, 2008).

Em relação às leveduras predominantes em sedimentos de regiões costeiras, as espécies são, no geral, as mesmas encontradas nas águas, mas algumas espécies típicas de solo também são observadas (HAGLER & AHEARN, 1987). No estudo com areias úmidas e secas das praias do sul da Flórida, as leveduras mais freqüentemente isoladas foram *Rhodotorula mucilaginosa* e *C. tropicalis* (VOGEL et al., 2007). Nas praias de Bairro Novo e Casa Caiada do município de Olinda, Pernambuco, as espécies mais encontradas nas amostras de areia foram *Bretanomyces bruxellensis*, *C. sake*, *C. parapsilosis* e *C. catenulata* (LOUREIRO et al., 2005). Papadakis e colaboradores (1997) isolaram espécies de *Candida* associadas ao homem das areias de praias da Grécia como *C. albicans*, *C. krusei* (= *Pichia kudriavzevii*), *C. tropicalis* e *C. guilliermondii* (= *Meyerozyma guilliermondii*).

2.2 Poluição das águas e areias em ecossistemas litorâneos

O desenvolvimento das cidades litorâneas afeta o equilíbrio dos ecossistemas marinhos ao provocar alterações no ambiente que resultam em impactos marcantes não apenas nas características físico-químicas locais, mas também biológicas (PINTO & OLIVEIRA, 2011). A poluição decorrente desta urbanização muitas vezes é responsável por introduzir matéria orgânica e elevados níveis de micro-organismos nas águas e areias das praias (LIPP et al., 2001). Entre as fontes urbanas de poluição encontram-se os sistemas de esgotos, as fossas sépticas, a drenagem urbana de águas pluviais, os resíduos industriais, os detritos animais, resíduos de embarcações, e a recreação humana (GRIFFIN et al., 2001).

Grande parte das atividades de lazer dos moradores e turistas das zonas costeiras envolve o contato com a água, como o banho de mar, a natação, o mergulho, a pesca e os esportes náuticos. Além disso, na maioria destas atividades recreativas, há também um íntimo contato com a areia. Dentro deste contexto, uma das principais preocupações atuais é com o risco das pessoas que utilizam o ambiente marinho para recreação em adquirir alguma doença devido ao contato com

patógenos provenientes dos poluentes antrópicos (MALLIN et al., 2000). Assim, o monitoramento da qualidade das águas e areias das praias é extremamente necessário a fim de se estabelecer o risco de exposição dos usuários aos contaminantes encontrados nestes locais.

2.2.1 Riscos à saúde associados à recreação em praias impactadas pela poluição antrópica

Os riscos para a saúde associados com o uso recreacional das águas das praias têm sido extensivamente estudados nos últimos anos (PRÜSS, 1998; PRIETO et al., 2001; BONILLA et al., 2007; COLFORD et al., 2007; SHIBATA & SOLO-GABRIELE, 2012). Na maioria dos trabalhos é possível observar uma relação positiva entre banhistas e algumas doenças, enquanto a mesma relação não pode ser observada para os não-banhistas. A incidência destas doenças irá depender de fatores tais como o nível de contaminação das águas, o tempo e o tipo de exposição, além do estado imunológico dos usuários (ELMANAMA et al., 2005). Dentre os sintomas mais investigados neste tipo de estudo estão os respiratórios e gastrointestinais, além de infecções de ouvido, olhos, garganta e pele (PRÜSS, 1998). Estimativas globais revelam que o banho em águas costeiras poluídas por resíduos fecais causam mais de 120 milhões de casos de doenças gastrointestinais e 50 milhões de casos de doenças respiratórias graves a cada ano (SHUVAL, 2003).

Atualmente tem sido notado que o aparecimento de doenças entre banhistas nem sempre se correlaciona com as contagens dos micro-organismos indicadores de contaminação fecal tradicionalmente utilizados, principalmente quando se trata de ambientes tropicais e subtropicais (PRIETO et al., 2001; COLFORD et al., 2007; FLEISHER et al., 2010; SINIGALLIANO et al., 2010). Em um trabalho realizado em seis praias da Baía Mission na Califórnia, Colford e colaboradores (2007) avaliaram o aparecimento de doenças entre 4971 banhistas comparando com um grupo controle de 3742 não freqüentadores de praias. Além disso, os autores fizeram uma análise microbiológica das praias utilizando os indicadores bacterianos tradicionais tais como *Enterococcus*, coliformes fecais e coliformes totais, além de outros. Apesar de ter sido observada uma incidência aumentada de diarreia e erupções cutâneas dentre os banhistas quando comparada com os não-banhistas (principalmente entre os indivíduos que mantiveram um maior contato com a água

do mar), não foi possível fazer uma relação destes acometimentos com os níveis de indicadores microbiológicos. Assim, os autores concluíram que para um melhor monitoramento da qualidade das águas das praias seria necessário o uso de indicadores alternativos. Em um trabalho similar com 1303 voluntários entre banhistas e não-banhistas, Fleisher e colaboradores (2010) buscaram associar o aparecimento de determinados sintomas, como de doenças gastrointestinais e respiratórias, com os níveis de enterococos presentes nas águas de uma praia subtropical da Flórida. Os autores puderam observar uma associação positiva entre banhistas e casos de doenças gastrointestinais, mas não entre estes casos e os níveis de enterococos presentes nas amostras de água.

Uma tentativa de explicar esta ausência de correlação entre indicadores e o aparecimento de doenças seria a existência de fontes difusas de poluição que, ao contrário das fontes pontuais de poluição fecal (por exemplo, os sistemas urbanos de esgotos), não podem ser rastreadas. Dentre estas fontes difusas é possível citar o escoamento de águas pluviais provenientes de vias urbanas ou de áreas agrícolas, a ressuspensão de areias contaminadas, as fezes de animais domésticos ou selvagens e o lixo deixado nas praias pelos próprios banhistas (COLFORD et al., 2007; HALLIDAY & GAST 2011). Além disso, há certos micro-organismos patogênicos que não se correlacionam bem com os indicadores clássicos, assim, praias avaliadas como próprias para banho segundo os parâmetros microbiológicos tradicionais não necessariamente estariam isentas destes patógenos. Alguns vírus, protozoários e fungos são exemplos de patógenos que nem sempre se correlacionam positivamente com os indicadores microbiológicos (NOBLE & FUHRMAN, 2001; ARVANITIDOU et al., 2002; BONADONNA et al., 2002; GRIFFIN et al., 2003).

A falta de correlação entre patógenos e bactérias indicadoras pode resultar em dois cenários problemáticos. Caso os indicadores estejam ausentes e os patógenos, presentes (cenário falso-negativo), o monitoramento realizado pelos órgãos competentes deixará de identificar os potenciais efeitos prejudiciais à saúde dos banhistas. No entanto, se os indicadores estiverem presentes e os patógenos, ausentes (cenário falso-positivo), poderá haver desnecessárias perdas econômicas devido a alertas e/ou fechamentos de praias recreativas. Um fechamento de 4 meses de uma praia do estado da Califórnia (E.U.A.) em 1999, devido a violações dos padrões microbianos, resultou na perda de milhões de dólares em receitas do

turismo para a comunidade empresarial e quase 2 milhões de dólares na investigação do fechamento da praia (ABDELZAHER et al., 2010).

Além das águas, as areias das praias merecem atenção como possível via de transmissão de doenças. Estudos prévios demonstraram que os sedimentos podem servir como reservatórios de patógenos (ALM et al., 2003; BEVERSDORF et al., 2007). Isto ocorre porque as areias funcionam como um filtro natural que retém partículas ambientais, matéria orgânica e micro-organismos. Os micro-habitats formados dentro das fendas e fissuras fornecem uma variedade de ambientes potencialmente adequados para a sobrevivência e/ou o crescimento de fungos e bactérias (USEPA, 1999). É possível esperar que o público de praias onde há areias com altos níveis de contaminação microbiológica encontre um maior risco de exposição aos patógenos por meio do contato direto com a pele e membranas mucosas ou por inalação (SABINO et al., 2011).

Shah e colaboradores (2011) avaliaram a presença e distribuição de micro-organismos patogênicos em várias zonas de areia de uma praia subtropical com fontes não-pontuais de poluição. Neste estudo, uma variedade de patógenos foi identificada tais como leveduras oportunistas (*Candida tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*), bactérias patogênicas (*Staphylococcus aureus* e *Vibrio vulnificus*), vírus (enterovírus) e helmintos. Os autores sugeriram que as areias poderiam funcionar não apenas como reservatórios de micro-organismos, mas também como vias de liberação destes últimos para as águas adjacentes e, além disso, poderiam fornecer uma rota de contaminação dos usuários das praias com patógenos potenciais.

Apesar de ser amplamente documentada a ocorrência de diversos micro-organismos nas areias das praias, quase não têm sido pesquisadas as consequências para a saúde dos banhistas ao se levar em conta a exposição direta a estas areias (BONILLA et al., 2007). Em 2009, Heaney e colaboradores publicaram um estudo epidemiológico com 27.365 usuários de sete praias nos Estados Unidos onde foi observada forte associação entre o contato com a areia em ambientes marinhos e doenças entéricas. Mais tarde, um novo estudo apontou para uma relação positiva entre as atividades de contato com a areia e doenças entéricas em função da concentração de poluição fecal microbiana na areia da praia (HEANEY et al., 2012). Os resultados destes trabalhos ratificam a necessidade de

mais estudos na avaliação do real risco à saúde decorrente do contato primário de banhistas com as areias das praias.

2.2.2 Indicadores de poluição fecal em ecossistemas aquáticos

A grande diversidade de micro-organismos patogênicos que podem ser transmitidos pela água e a dificuldade no desenvolvimento e implementação de estratégias de detecção para todos estes possíveis patógenos resultaram na seleção de alguns poucos micro-organismos indicadores capazes de prever a presença de outros potencialmente causadores de doença (SCHWAB, 2007). A escolha de um bom indicador da qualidade microbiológica da água obedece a vários critérios (MENDES, 2010):

- a princípio, a concentração do indicador na água contaminada deve ter uma relação direta com o grau de poluição;
- sempre que os micro-organismos patogênicos estiverem presentes, o indicador também deve estar presente e em maior quantidade;
- o indicador não deve ser capaz de se reproduzir no ambiente para evitar superestimativas do mesmo;
- a metodologia de isolamento e quantificação do indicador deve ser fácil, rápida, inequívoca e de baixo custo;
- o indicador deve ser mais resistente aos agentes desinfectantes que os micro-organismos patogênicos;
- e, também, o indicador deve ser inofensivo ao ser humano.

Nos últimos anos, os indicadores microbiológicos de qualidade de água que vêm sendo comumente adotados pelas agências reguladoras em todo o mundo são os coliformes totais, os coliformes termotolerantes (anteriormente chamados fecais), a bactéria *Escherichia coli*, espécies do gênero *Enterococcus* e a bactéria formadora de esporo *Clostridium perfringens*. No entanto, até o momento nenhum indicador microbiano que possa ser utilizado efetivamente em todas as regiões foi identificado. Todos estes acima citados falham em algum dos critérios exigidos para um indicador ideal (GRIFFIN et al., 2001; EU, 2006; USEPA, 2012).

As bactérias do grupo coliformes têm sido utilizadas como indicadores de escolha para monitorar a qualidade da água há mais de 100 anos (SCOTT et al., 2002; KINZELMAN et al., 2003). Estas consistem em micro-organismos bastonetes

pertencentes à família Enterobacteriaceae e são definidas como anaeróbias facultativas, Gram-negativas, não formadoras de esporo e que fermentam a lactose com formação de gás e ácido dentro de 48h a 35°C. Os coliformes típicos incluem os gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella* e *Serratia* (LEE et al., 2009). Como os testes disponíveis de detecção e enumeração destes micro-organismos são incapazes de diferenciar as espécies ambientais daquelas associadas às fezes, temperaturas mais altas de incubação podem ser utilizadas a fim de se quantificar os denominados coliformes termotolerantes (44,5± 0,2°C), que são mais relacionados com a contaminação de origem fecal. Porém, este grupo ainda apresenta algumas bactérias de origem ambiental como, por exemplo, algumas espécies do gênero *Klebsiella*. Dentre os coliformes termotolerantes, apenas *E. coli* tem como habitat primário o trato intestinal humano e de animais de sangue quente, sendo a melhor indicadora de contaminação fecal (RODRIGUEZ-ANGELES, 2002).

O uso de coliformes termotolerantes como indicadores de qualidade microbiológica da água tem sido questionado, pois estas bactérias sobrevivem nos sedimentos e podem ser encontradas em áreas distantes da atividade humana. Além disso, os ensaios baseados em meios de cultivo não podem distinguir a fonte de origem das linhagens encontradas (animal versus humana), e a correlação entre as concentrações de coliformes e patógenos nem sempre pode ser observada (GRIFFIN et al., 2001; HARTZ et al., 2008; SHA et al., 2011). Vários estudos têm encontrado o mesmo problema para o indicador *E. coli* que, apesar de ser mais associado à contaminação fecal que os demais coliformes, tem apresentado resultados semelhantes, sobrevivendo por longos períodos no ambiente e tendo a capacidade de se replicar em águas e solos de ambientes tropicais, subtropicais e temperados (SOLO-GABRIELE et al., 2000; DESMARAIS et al., 2002; WHITMAN & NEVERS, 2003; BYAPPANAHALLI et al., 2006; BYAPPANAHALLI et al., 2012; YAMAHARA et al., 2012).

Os enterococos compõem um subgrupo dos estreptococos fecais que inclui pelo menos cinco espécies: *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. gallinarum* e *E. avium*. Estes micro-organismos se diferenciam dos demais estreptococos devido à capacidade de crescer em altos valores de pH (até 9,6), em meios contendo 6,5% de NaCl e em temperaturas de 10°C a 45°C. Além disso, sobrevivem por até 30 minutos a 60°C. *E. faecalis* e *E. faecium* são as espécies

mais frequentemente encontradas em humanos. Em 1980, a Agência de Proteção Ambiental dos E.U.A. (USEPA) recomendou o uso de enterococos para monitorar a qualidade microbiológica de águas marinhas. Desde então, este grupo de bactérias tem sido adotado como indicador por várias agências reguladoras no mundo. Sabe-se, no entanto, que, assim como para os coliformes e *E. coli*, estes microorganismos, uma vez introduzidos no ambiente, podem se manter e multiplicar, formando reservatórios ambientais. Além disso, embora algumas bactérias do gênero *Enterococcus* integrem a microbiota natural de humanos, algumas podem causar infecções, como as do trato urinário, bacteremias nosocomiais, endocardite, entre outras (DESMARAIS et al., 2002; SCOTT et al., 2002; HANCOCK & GILMORE, 2006; BYAPPANAHALLI et al., 2012; CUI et al., 2013).

Clostridium perfringens é uma bactéria gram-positiva, potencialmente patogênica, anaeróbia restrita, formadora de endosporo, que é normalmente encontrada nos intestinos de humanos e alguns animais. Esporos de *C. perfringens* eliminados nas fezes podem chegar ao meio aquático onde apresentam excepcional longevidade. Embora o uso de *C. perfringens* como um indicador de qualidade da água seja controverso devido a sua persistência no meio ambiente, alguns cientistas continuam a recomendar a sua utilização, especialmente em situações em que é desejável prever a presença de enterovírus e protozoários, de avaliar a eficiência de tratamentos de desinfecção da água ou de determinar uma poluição fecal remota (PAYMENT & FRANCO, 1993; TALLON et al., 2005).

2.2.3 Aplicação de leveduras como indicadoras microbiológicas de qualidade da água em ambientes naturais

Além dos indicadores tradicionalmente utilizados na avaliação da qualidade das águas, outros parâmetros microbiológicos podem ser adotados de forma complementar a fim de se obter conclusões mais confiáveis. As leveduras representam um bom exemplo de micro-organismos que poderiam ser utilizados no auxílio do monitoramento da qualidade de amostras de ambientes naturais. Trata-se de um grupo com ampla distribuição, fácil cultivo e taxonomia bem desenvolvida. Além disso, a ocorrência e o papel destes fungos já foram bastante estudados e bem compreendidos para diversos locais. Diferentes comunidades de leveduras estão associadas com diferentes habitats, assim, cada ambiente possui níveis

populacionais típicos. Alterações de importantes parâmetros ambientais implicam em mudanças nas proporções das espécies componentes de uma comunidade, refletindo, assim, as condições dentro do habitat (HAGLER, 2006).

Em geral, a ocorrência de leveduras aumenta na presença de fatores de enriquecimento, podendo alcançar mais de 1.000 células/L. Assim, espera-se encontrar uma correlação positiva entre o nível de poluição em um determinado ambiente e as contagens de leveduras totais. Medeiros e colaboradores (2012), ao avaliarem a qualidade das águas de lagoas e rios da bacia do Rio Doce em Minas Gerais, observaram uma relação positiva entre as contagens de leveduras totais e os parâmetros físico-químicos indicativos da presença de esgoto doméstico. Estes resultados levaram os autores a sugerir que as leveduras poderiam ser úteis como indicadoras de qualidade de água. Em outro estudo realizado em três lagoas situadas na região do Carste de Lagoa Santa (MG), Brandão e colaboradores (2010) também propuseram o uso de leveduras como indicadoras de poluição orgânica em águas recreacionais após observarem uma correlação positiva entre as densidades destes micro-organismos e de *E. coli*.

O uso das contagens de leveduras fermentativas também poderia corresponder a um método de monitoramento de amostras ambientais, uma vez que já foi observado que há uma mudança na prevalência de espécies estritamente aeróbias em águas limpas para uma predominância de espécies fermentativas em águas poluídas. Enquanto as espécies de *Rhodotorula* são cosmopolitas, *C. krusei* e *C. tropicalis*, por exemplo, duas espécies conhecidamente fermentativas, têm sido especialmente associadas com águas altamente poluídas por esgotos domésticos (WOOLLETT & HEDRICK, 1970; SHERRY & QURESCHI, 1981; HAGLER, 2006).

Candida albicans, uma levedura oportunista encontrada nas fezes de humanos e animais de sangue quente, também já foi sugerida como organismo alvo no monitoramento de contaminação fecal recente da água. Muitos trabalhos apoiaram esta hipótese mostrando que altas densidades de *C. albicans* estavam associadas a esgotos ou contaminações fecais recentes (BUCK & BUBUCIS, 1978; SHERRY et al., 1979; COOK & SCHLITZER, 1981; ROBERTSON & TOBIN, 1983; EFSTRATIOU et al., 1998). Entretanto, em alguns trabalhos com águas poluídas, esta espécie não foi isolada com a frequência esperada em meios de cultivo comuns. Isto ocorre aparentemente porque esta espécie é uma competidora ruim quando comparada com outras leveduras em culturas mistas (HAGLER & AHEARN,

1987; MATES, 1994; SABINO et al., 2011; PINTO et al., 2012). A aplicação de um meio de cultivo seletivo, como, por exemplo, o ágar mCA proposto por Buck e Bubucis (1978), permitiria o uso das contagens de *C. albicans* como uma ferramenta valiosa no monitoramento da qualidade de amostras provenientes de ambientes recreacionais.

2.2.4 Padrões microbiológicos adotados para a análise da qualidade de águas e sedimentos de praias

A resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº. 274/2000 revisa os critérios para balneabilidade em águas brasileiras e determina parâmetros para a avaliação da qualidade ambiental destas águas. No artigo 2º desta resolução, as condições das águas doces, salobras e salinas destinadas à recreação de contato primário são classificadas nas categorias própria e imprópria (tabela 1). As águas são consideradas próprias quando em 80% ou mais de um conjunto de amostras obtidas em cada uma das cinco semanas anteriores, colhidas no mesmo local, apresentar, no máximo 1.000 NMP de coliformes termotolerantes ou 800 NMP de *E. coli* ou 100 NMP de enterococos em 100mL de água. Enquanto as impróprias são aquelas que não atendem aos critérios estabelecidos para as águas próprias ou que possuem densidades superiores a 2.500 NMP de coliformes termotolerantes ou 2.000 NMP de *E. coli* ou 400 NMP de enterococos em 100mL de água (BRASIL, 2001).

Tabela 1 - Padrões microbiológicos exigidos pela Resolução do CONAMA nº. 274/2000 para balneabilidade em águas brasileiras (NMP/100mL).

Categorias das águas		Coliformes termotolerantes	<i>E. coli</i>	Enterococos
Própria	Excelente	até 250*	até 200*	Até 25*
	Muito Boa	até 500*	até 400*	Até 50*
	Satisfatória	até 1.000*	até 800*	até 100*
Imprópria		>2.500 na última amostra	>2.000 na última amostra	>400 na última amostra
		ou não atendimento aos critérios estabelecidos para as águas próprias		

* densidade encontrada em 80% ou mais de um conjunto de amostras obtidas em cada uma das cinco semanas anteriores, colhidas no mesmo local.

O monitoramento das condições sanitárias das praias na maior parte do litoral brasileiro é feito apenas por meio da avaliação da qualidade bacteriológica das águas, ainda que hoje exista um consenso de que as areias também podem funcionar como vias de transmissão de doenças (BOUKAI, 2007). Apesar da resolução do CONAMA nº. 274/2000 não estabelecer parâmetros para a avaliação destas areias, ela recomenda estudos sobre as condições microbiológicas e parasitológicas das mesmas para futuras padronizações. Na ausência de uma legislação nacional, a Secretaria Municipal do Meio Ambiente do Rio de Janeiro (RJ) implementou a resolução nº. 468 de 28 de janeiro de 2010 que dispõe sobre as análises das condições das areias nas praias do município. A classificação das areias para recreações de contato primário é obtida a partir dos resultados das densidades de coliformes totais e *E. coli*, dando prioridade ao parâmetro mais restritivo (tabela 2). Conforme a resolução municipal, as areias passam a ser consideradas não recomendadas para recreação quando apresentam concentrações acima de 300 NMP/g de coliformes totais ou 38 NMP/g de *E. coli* (RIO DE JANEIRO, 2010).

Tabela 2 - Padrões microbiológicos para classificação das areias das praias determinados pela Secretaria Municipal do Meio Ambiente do Rio de Janeiro por meio da Resolução nº. 468/10.*

Areias das Praias - Classificação -	Coliformes Totais (NMP/g)	<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)
Ótima ★★★★★	até 100	até 0,4
Boa ★★★	> 100 a 200	> 0,4 a 4
Regular ★★	> 200 a 300	> 4 a 38
Não recomendada ★	acima de 300	acima de 38

* valores corrigidos de NMP/100g para NMP/g

Apesar de ter a importância reconhecida mundialmente, pouco tem sido feito para a regulamentação da qualidade das areias das praias nos âmbitos nacional e internacional. Um dos mais relevantes estudos dentre os poucos realizados neste contexto, faz parte do projeto “Qualidade Microbiológica de Areias de Praias Litorais” realizado em Portugal no período de 2001 a 2002 e promovido pela Associação Bandeira Azul da Europa (ABAE, 2002). Após intenso trabalho de pesquisa, um relatório final deste projeto estabeleceu valores limites para indicadores sanitários em areias tais como coliformes totais, *E. coli*, enterococos, fungos filamentosos, dermatófitos e leveduras. Para os indicadores micológicos, tomou-se como base os resultados obtidos em análises de areias de praias de diferentes níveis de ação

antrópica do litoral de Portugal, e estabeleceu-se valores médios para os parâmetros selecionados. Para os indicadores bacteriológicos, utilizou-se os mesmos limites aceites para balneabilidade das águas das praias, porém adaptados para as areias. Alguns anos depois da implementação do monitoramento das praias em Portugal tendo como base os parâmetros propostos no relatório de 2002, foi divulgado um novo relatório com novos resultados e novas proposições (ABAE, 2011). Os parâmetros microbiológicos propostos nestes trabalhos e os valores admissíveis para os mesmos estão listados na tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros microbiológicos a serem avaliados em amostras de areia de praia segundo o relatório divulgado pela Associação Bandeira Azul da Europa e os respectivos valores recomendados e admissíveis (ABAE, 2002; 2011).

Parâmetros	VMR ¹ (UFC/g)	NVMR ² (UFC/g)	VMA ³ (UFC/g)
Leveduras	30	3	60
Fungos filamentosos patogênicos	70	5	85
Dermatófitos	1	1	15
Coliformes totais	5	5	100
<i>Escherichia coli</i>	1	1	20
Enterococos	1	1	20

1 Valores máximos recomendados no relatório final da ABAE de 2002

2 Novos valores máximos recomendados no relatório final da ABAE de 2011

3 Valores máximos admissíveis segundo os relatórios finais da ABAE de 2011

2.3 *Candida* spp. e outras leveduras oportunistas

2.3.1 *Candida* spp. e outras leveduras oportunistas

Nas últimas décadas, a incidência de doenças causadas por *C. albicans* e outras leveduras oportunistas aumentou consideravelmente devido ao crescimento da população susceptível. Dentre os fatores predisponentes para estas doenças podemos citar terapias imunossupressoras e citotóxicas, tratamento com antibacterianos de amplo espectro, abuso de drogas, tratamentos invasivos utilizando cateteres ou outros dispositivos e o aumento da sobrevivência de pacientes imunossuprimidos (GOZALBO et al., 2004). As enfermidades causadas por estes micro-organismos podem variar de condições relativamente simples, como as

candidíases bucais e genitais, às fatais, como as infecções sistêmicas em pacientes acometidos por outras doenças (MC CULLOUGH et al., 1996; GOZALBO et al., 2004; MISHRA et al., 2007). Muitas das espécies responsáveis por estas enfermidades fazem parte da microbiota normal de humanos, colonizando as mucosas oral, intestinal e vaginal e, eventualmente, a pele. De fato, o desenvolvimento da doença depende do ténue equilíbrio entre o fungo e o sistema imunológico do hospedeiro, o que define a relação parasítica ou comensal (MISHRA et al., 2007).

A candidíase está entre as infecções hospitalares mais frequentes no mundo. Mesmo com os avanços recentes no controle destas infecções e até mesmo após o tratamento com as drogas antifúngicas disponíveis, as taxas de mortalidade para pacientes com candidíase sistêmica ainda são altas. Estas taxas variam muito em função da população estudada (principalmente em relação à idade e ao histórico clínico), do número de indivíduos analisados e dos critérios utilizados para definir a mortalidade atribuída a espécies oportunistas de *Candida* (VIUDES et al., 2002, FALAGAS et al., 2006; MORAN et al., 2009; UPPULURI et al., 2010). Segundo um estudo epidemiológico realizado no Brasil, entre 1996 e 2006 ocorreram 3.583 mortes devido às micoses sistêmicas. Dentre estas micoses, a candidíase foi a terceira principal causa de óbito, perdendo apenas para a paracoccidioidomicose e a criptococose, e com taxas de mortalidade variando de 12,2 a 16,3% entre o princípio e o fim do período estudado. Quando levados em consideração apenas os pacientes acometidos por AIDS, a candidíase passa a representar a segunda principal causa de morte dentre as fungemias (PRADO et al., 2009; MARTINEZ, 2010; SIFUENTES-OSORNIO et al., 2012).

Além disso, espécies oportunistas de *Candida* estão associadas a vários outros quadros infecciosos, que apesar de serem menos graves, representam um grande problema de saúde pública. Os casos de candidíases vaginais e orais, por exemplo, são muito comuns e podem ocorrer em indivíduos imunocompetentes, embora sejam mais frequentes em pacientes imunossuprimidos. As candidíases orais estão entre as infecções mucocutâneas mais comuns, especialmente em recém-nascidos, idosos e pacientes HIV-positivos. Em relação à candidíase vulvovaginal estima-se que 75% das mulheres têm pelo menos um episódio ao longo de suas vidas, sendo que 40% a 50% destas apresentam a segunda infecção

e cerca de 5% podem adquirir padrão crônico, com episódios de repetição (SOBEL, 2007; COLOMBO et al., 2013).

Dentre as leveduras oportunistas pertencentes ao gênero *Candida*, *C. albicans* se destaca como o principal agente etiológico de doenças, bem como a espécie mais recuperada a partir de amostras de sangue (PFALLER & DIEKEMA, 2007; FALAGAS et al., 2010). Entretanto, nos últimos anos a prevalência de *C. albicans* em infecções sistêmicas tem diminuído, enquanto a de espécies não-*albicans* tem aumentado expressivamente. Em um levantamento epidemiológico de candidemias realizado entre 2004 e 2008 em 25 centros médicos dos Estados Unidos e Canadá, Pfaller e colaboradores (2012) encontraram uma prevalência de 57,9% de *Candida* não-*albicans* dentre os 3.648 casos avaliados. Neste trabalho, a segunda e terceira espécies mais frequentemente isoladas após *C. albicans* foram *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, respectivamente. Na América Latina, no período de novembro de 2008 a outubro de 2010, Nucci e colaboradores (2013) conduziram um estudo epidemiológico de candidemia em 21 hospitais terciários de sete países: Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, Equador, Honduras e Venezuela. No geral, as espécies mais frequentemente isoladas foram *C. albicans* (37.6%), seguida por *C. parapsilosis* (26.5%), *C. tropicalis* (17.6%), *C. guilliermondii* (6.5%), *C. glabrata* (6.3%) e *C. krusei* (2.7%). Embora tenha sido observada uma grande variabilidade na frequência destas espécies nos diferentes países, o total de *Candida* não-*albicans* ultrapassou o número de isolados de *C. albicans* em quase todos os países, com exceção apenas do Equador.

Ainda que as leveduras pertencentes ao gênero *Candida* continuem sendo um dos agentes mais comuns de fungemias, espécies não-*Candida* têm sido isoladas com uma frequência considerável de pacientes com imunocomprometimento, especialmente aqueles acometidos por câncer (LAI et al., 2012). Em pacientes com doenças hematológicas malignas, por exemplo, *Trichosporon* spp. tem sido considerado a segunda causa mais comum de infecções disseminadas provocadas por leveduras, levando a uma taxa de mortalidade de 80%. Dentro deste gênero, as espécies mais associadas a fungemias são *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. cutaneum*, *T. inkin*, *T. mucoides* e *T. ovoides* (FLEMING et al., 2002; COLOMBO et al., 2011). Nas últimas duas décadas, espécies pertencentes ao gênero *Rhodotorula* também têm emergido como patógenos oportunistas, possuindo a habilidade de colonizar e infectar pacientes susceptíveis (WIRTH & GOLDANI,

2012). A maioria dos casos de infecções por *Rhodotorula* spp. são fungemias associadas a cateteres, endocardite e meningite (TUON & COSTA, 2008). Infecções não-sistêmicas por *Rhodotorula* spp. como endoftalmite e peritonite também já foram reportadas em pacientes imunocompetentes (BRAUN & KAUFF, 1992; LUNARDI et al., 2006). Existem ainda vários relatos de espécies pertencentes a outros gêneros como sendo patógenos oportunistas, porém a baixas frequências (MICELI et al., 2011).

2.3.2 Fatores de virulência de leveduras oportunistas

Vários fatores podem contribuir para a patogenicidade de espécies de leveduras oportunistas, entre os quais é possível citar a adesão a células epiteliais e endoteliais, a morfogênese, a produção de proteinases e fosfolipases e a formação de biofilme (GHANNOUM, 2000; SUGITA et al., 2002). A adesão às superfícies celulares, por exemplo, é uma etapa crucial no processo patogênico. A capacidade de aderir às células epiteliais e endoteliais contribui para a persistência do micro-organismo dentro do hospedeiro, sendo um pré-requisito para a colonização de tecidos (SILVA et al., 2012). A produção de proteinases parece aumentar a capacidade das células fúngicas em colonizar e penetrar nos tecidos e contribui na evasão do sistema imune (CHAFFIN et al., 1998; MISHRA et al., 2007). As atividades das fosfolipases também são consideradas como possíveis fatores de virulência, uma vez que estão associadas com danos à membrana celular do hospedeiro, aderência e penetração (MISHRA et al., 2007). Já a mudança da forma unicelular para a filamentosa, formando hifas e pseudohifas, é uma resposta a estímulos diversos que é muito relevante para a patogenicidade de alguns fungos. Enquanto as hifas seriam necessárias ao dano tecidual e à invasão, as células leveduriformes estariam envolvidas principalmente na disseminação (CHANDRA et al., 2001; MAYER et al., 2013).

Muitas infecções estão também associadas com a formação de biofilmes em superfícies de dispositivos médicos implantados. Os biofilmes são geralmente formados por uma camada basal de células de leveduras aderidas ao substrato, que então crescem, resultando na formação de múltiplas camadas. Toda a população de células é embebida por um material extracelular, formando uma comunidade sésil que se encontra fortemente aderida ao substrato (SENEVIRATNE et al., 2008). Além

de serem extremamente difíceis de serem eliminados mecanicamente, os biofilmes são altamente resistentes a drogas antifúngicas (RICICOVÁ et al., 2010). Uma vez formados sobre dispositivos médicos implantados, os biofilmes funcionam como reservatórios de partículas infecciosas que são liberadas na corrente sanguínea, podendo atingir locais distantes e com o potencial de causar infecção sistêmica (UPPULURI et al., 2010). Para melhor compreender e controlar a formação de biofilmes, vários modelos *in vitro* e *in vivo* têm sido desenvolvidos. Como as estruturas podem variar de acordo com os micro-organismos, as superfícies e os nichos de colonização, não existe um único modelo representativo de todos os biofilmes. Assim, o estudo destas estruturas sob as mais diversas condições se torna ainda mais importante (RICICOVÁ et al., 2010; TOURNU & VAN DIJCK, 2012).

2.3.3 Susceptibilidade de leveduras a agentes antifúngicos

Nos últimos anos, os antibióticos poliênicos e os derivados azólicos têm sido empregados com frequência na terapia antifúngica. Estas duas classes de medicamentos têm como alvo principal a membrana celular dos fungos. A anfotericina B, uma das principais drogas poliênicas hoje utilizadas, age ligando-se ao ergosterol presente na membrana de fungos sensíveis, formando poros ou canais. O resultado é um aumento na permeabilidade da membrana que permite o extravasamento de diversas pequenas moléculas, levando à morte celular. Esta droga é um antibiótico fungicida potente e de amplo espectro, mas seu uso é associado a efeitos adversos significativos, como nefrotoxicidade e febre com calafrios. Já o mecanismo de ação dos azólicos baseia-se na inibição de um sistema enzimático que participa da formação do ergosterol da membrana plasmática. Isto leva à formação de uma membrana com propriedades alteradas, que não desempenha as funções básicas necessárias ao desenvolvimento fúngico. Estas drogas causam menos reações adversas, mas são menos potentes, e podem ter ação fungistática ou fungicida (GILMAN, 1996; WILLIAMS & LEMKE, 2002; SHEIKH et al., 2013).

Pesquisas epidemiológicas apontam para o aumento da importância de infecções causadas por espécies de micro-organismos resistentes aos antifúngicos. Fungos ubíquos, anteriormente considerados como simples colonizadores ou contaminantes, atualmente são considerados emergentes, sendo resistentes a

vários antifúngicos disponíveis e causadores de infecções sistêmicas severas. Assim, compreender a resistência às drogas antifúngicas é fundamental para o desenvolvimento de estratégias profiláticas e terapêuticas eficazes (CANUTO & RODERO, 2002).

A resistência aos compostos azólicos tem sido objeto de intensa investigação ao longo dos últimos anos. Existem quatro principais mecanismos de resistência a estas drogas desenvolvidos pelas espécies de *Candida*: a diminuição da concentração da droga intracelular por ativação de sistemas de efluxo ou redução da penetração da droga; a modificação da enzima-alvo pertencente à via de formação do ergosterol; a hiper-regulação da enzima-alvo e o desenvolvimento de vias alternativas que levam a formação de membranas desprovidas de ergosterol, mas contendo outros esteróis. Mais de um mecanismo pode estar presente em uma dada linhagem, e as alterações que conduzem à resistência podem ocorrer em sequência e podem ter efeitos aditivos ou levar à resistência cruzada (SPAMPINATO & LEONARDI, 2013). As espécies de *Candida não-albicans* que apresentam resistência ao fluconazol com maior frequência são *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. kefyr* (RIBEIRO et al., 2004). Além disso, espécies de *Rhodotorula*, incluindo *R. mucilaginosa* e *R. glutinis*, apresentam frequentemente resistência ao fluconazol e ao voriconazol (MICELI et al., 2011).

Embora a resistência à anfotericina B não seja muito comum em espécies de *Candida não-albicans*, sua incidência tem sido cada vez mais relatada, especialmente em isolados de *C. lusitaniae* e *C. guilliermondii*. Isolados de *Candida* spp. resistentes aos polienos têm um decréscimo marcante do conteúdo de ergosterol quando comparados com isolados susceptíveis. Como a interação da anfotericina B com a membrana requer ligação ao ergosterol, a diminuição deste último leva à redução da sensibilidade à droga. Estas alterações da membrana devem também reduzir a virulência, o que deve explicar o porquê de linhagens resistentes à anfotericina B serem isoladas principalmente de pacientes com sistema imune comprometido (BOSSCHE, 1997). Outras leveduras que são frequentemente resistentes à anfotericina B são espécies pertencentes ao gênero *Trichosporon* (MICELI et al., 2011).

A determinação da suscetibilidade *in vitro* aos antifúngicos ficou aquém aos de agentes antibacterianos por muitos anos, principalmente devido às variações interlaboratoriais e à falta de testes de sensibilidade padronizados. Entretanto, em

2002, o documento M27-A2 do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2002) propôs um teste de susceptibilidade para leveduras, especialmente *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans*. Atualmente, já existe uma nova versão deste documento, publicada em 2008, o M27-A3 (CLSI, 2008). Em geral, as provas de sensibilidade têm como principal objetivo prever a resposta clínica e microbiológica a um tratamento. Atualmente, no campo da micologia existem numerosos trabalhos que buscam demonstrar uma correlação entre a sensibilidade *in vitro* e os resultados clínicos. Vale salientar, que foi observada uma boa relação entre resistência *in vitro* e fracasso terapêutico, mas não entre sensibilidade *in vitro* e êxito terapêutico (CHAVANET et al., 1994; GHANNOUM, 1996).

2.3.4 *Candida* spp. e outras leveduras oportunistas no ambiente

Apesar da maioria dos estudos abordarem o isolamento de espécies patogênicas de *Candida* a partir de amostras clínicas, a recuperação destas leveduras dos mais diversos ambientes e/ou substratos, como solos, vegetais e águas correntes, de piscina, ou do mar, também tem sido descrita. No geral, estes isolamentos estão associados a locais onde a presença do homem e/ou animais é muito frequente. Além disso, muitas espécies de leveduras que antes eram consideradas comuns no ambiente, hoje, são consideradas oportunistas (NANBAKHSH et al., 2004; PFALLER & DIEKEMA, 2004; VOGEL et al., 2007; MICELI et al., 2011, CAPOOR et al., 2013).

Alguns trabalhos têm revelado o isolamento de leveduras resistentes a antifúngicos a partir de amostras ambientais. Brandão e colaboradores (2010), por exemplo, ao avaliarem a diversidade de leveduras com crescimento a 37°C em águas de três lagos do sudeste do Brasil encontraram como espécies prevalentes as oportunistas *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. tropicalis*. Os autores testaram ainda a susceptibilidade das leveduras isoladas aos antifúngicos fluconazol, itraconazol e anfotericina B, e observaram resistência a pelo menos uma das drogas testadas em 66 das 175 leveduras isoladas. Medeiros e colaboradores (2008) testaram 68 leveduras isoladas a partir de amostras de água e sedimentos de dois lagos e dois rios situados na região do Parque do Rio Doce em Minas Gerais quanto à susceptibilidade a cinco antifúngicos: anfotericina B, cetoconazol, fluconazol, itraconazol e terbinafina. Neste trabalho, a maioria das leveduras apresentou baixa

resposta ao cetoconazol e à terbinafina e elevada susceptibilidade ao fluconazol e à anfotericina B. Em relação ao itraconazol, metade dos isolados testados foi resistente e a outra metade dose-dependente.

Como ainda são poucos os estudos com *C. albicans* e outras leveduras oportunistas isoladas a partir de amostras ambientais, o conhecimento sobre a virulência e a susceptibilidade a antifúngicos destes micro-organismos ainda é restrito. Muitas vezes estes fungos são recuperados de ambientes utilizados para recreação, estando em contato direto com humanos, sejam adultos saudáveis ou mesmo crianças, idosos e indivíduos imunossuprimidos, o que torna necessária uma maior investigação destas linhagens, até mesmo para avaliar o risco de exposição às mesmas. As águas e areias de regiões costeiras recebem com frequência a visita de banhistas e são um bom exemplo do contato entre estas linhagens ambientais e humanos. Estes locais podem representar uma via de contaminação com leveduras oportunistas, cuja presença nem sempre pode ser prevista pelos micro-organismos indicadores de poluição como as bactérias do grupo dos coliformes. Portanto, pessoas que não são imunocompetentes e que frequentam estes locais de recreação poderiam correr o risco de adquirir uma doença causada por estas leveduras.

3.1 – Objetivo geral

Determinar a ocorrência de *Candida albicans* e outras leveduras oportunistas em águas e areias de praias dos estados do Rio de Janeiro e Paraná, buscando correlacionar estes micro-organismos com os indicadores de poluição convencionais, e avaliar o potencial patogênico das mesmas por meio da pesquisa de fatores de virulência, da susceptibilidade aos antifúngicos usuais e da capacidade de causar doença em camundongos.

3.2 – Objetivos específicos

- 1) Determinar as densidades de leveduras totais, coliformes totais e *E. coli* nas amostras de água e areia coletadas em praias dos estados do Rio de Janeiro e Paraná.
- 2) Avaliar a existência de correlação entre os níveis de leveduras totais e de bactérias indicadoras nas amostras examinadas.
- 3) Isolar leveduras potencialmente patogênicas (com crescimento a 37°C) a partir das amostras coletadas utilizando os meios CHROMagar-Candida e mCA.
- 4) Quantificar e identificar por métodos moleculares as espécies de leveduras isoladas nos meios supracitados.
- 5) Investigar a capacidade das leveduras isoladas pertencentes a espécies oportunistas de produzir proteinases.
- 6) Avaliar a sensibilidade dos isolados de leveduras oportunistas aos antifúngicos fluconazol, itraconazol e anfotericina B.

7) Pesquisar a capacidade dos isolados de *C. albicans* e outras leveduras oportunistas de aderir em células epiteliais bucais.

8) Testar a morfogênese e a capacidade de formação de biofilme *in vitro* e *in vivo* das linhagens de *C. albicans* isoladas, bem como a patogenicidade destas linhagens *in vivo*, comparando os resultados com aqueles obtidos para linhagens de *C. albicans* isoladas a partir de outras amostras ambientais e de um isolado clínico.

4.1 – Coleta

Amostras de areia e água do mar foram coletadas em duas praias da cidade do Rio de Janeiro - RJ (Ipanema e Copacabana) e em seis praias das seguintes cidades do estado do Paraná: Pontal do Paraná (Praia de Leste, Balneário Ipanema e Balneário Shangrilá) e Matinhos (Praia Central, Balneário Flórida e Praia Mansa). No Rio de Janeiro foram determinados três pontos de coleta para cada praia, totalizando seis pontos (Figura 1). No Paraná, a coleta foi feita em um ponto por praia, também totalizando seis pontos (Figura 2). As coletas foram realizadas em duas estações, verão e inverno, entre janeiro de 2010 e fevereiro de 2011, e sempre no período da manhã entre 9 e 12h.

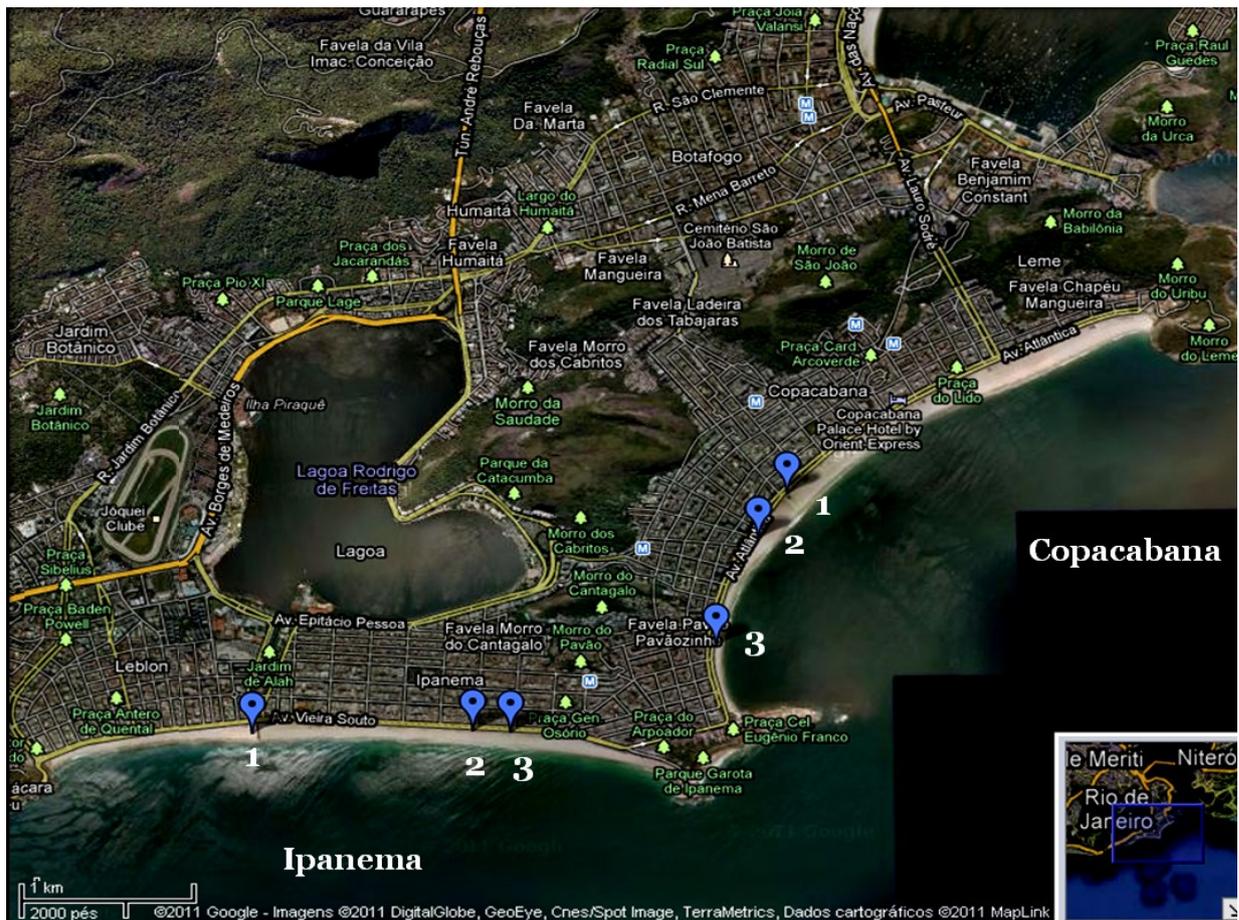


FIGURA 1 – Pontos de coleta nas praias de Ipanema e Copacabana na cidade do Rio de Janeiro/RJ.

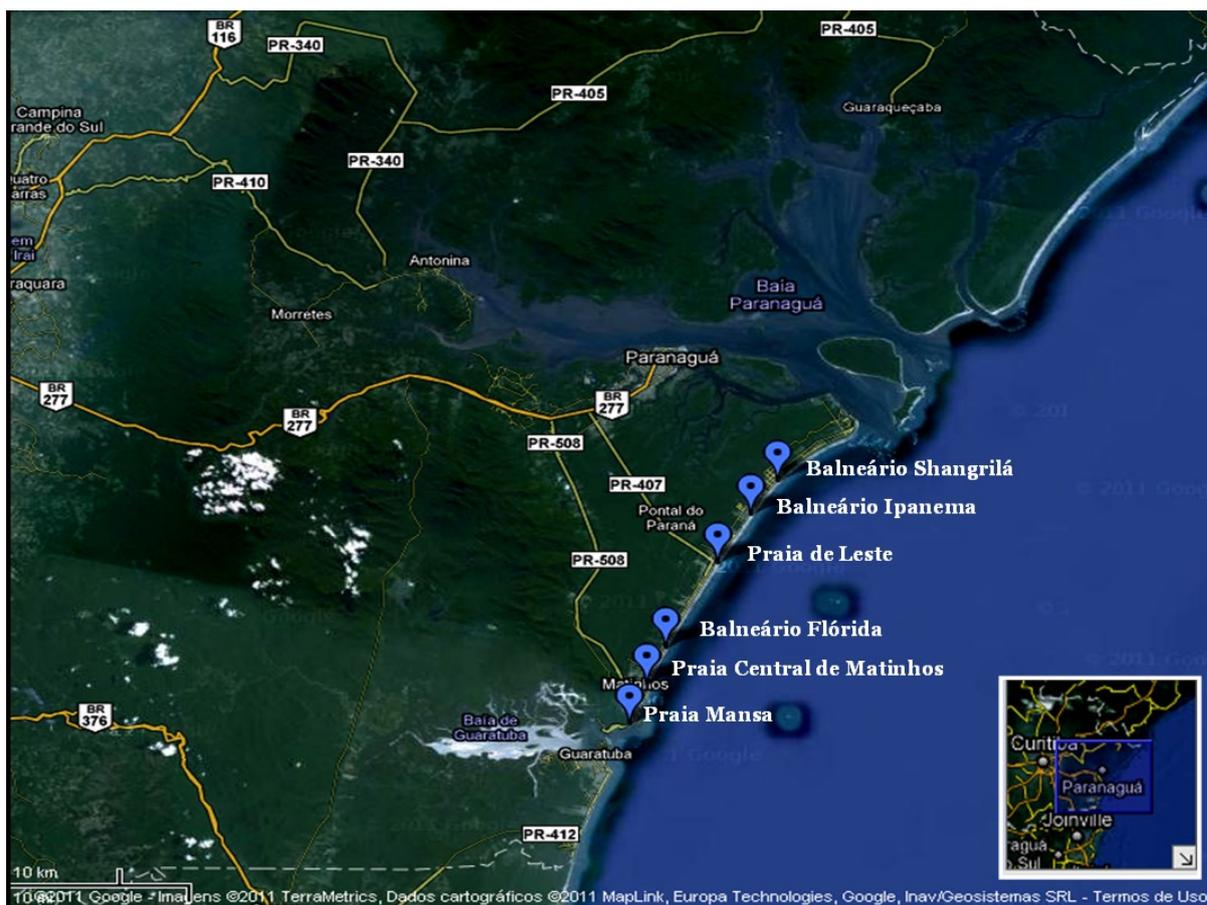


FIGURA 2 – Pontos de coleta nos municípios de Pontal do Paraná e Matinhos no estado do Paraná.

4.1.1 Área de estudo

Praias da cidade do Rio de Janeiro (RJ)

O Rio de Janeiro (RJ), capital do estado homônimo, é a segunda maior metrópole do Brasil. Uma vez que é a cidade do país mais conhecida no exterior por seus diversos ícones culturais e paisagísticos, ocupa os primeiros lugares dentre os destinos brasileiros escolhidos por turistas estrangeiros (BOUKAI, 2007). Somente durante o ano de 2012, o Rio de Janeiro recebeu mais de 1 milhão de visitantes internacionais (BRASIL, 2013). Além disso, visitantes brasileiros também são frequentes o ano todo. O clima na cidade é do tipo tropical e a temperatura média anual é de 24°C. Os verões são marcados por dias quentes e relativamente chuvosos, enquanto os invernos apresentam-se amenos e com regime de chuvas mais restrito (RIOTUR, 2012). As praias representam um dos principais cartões de visita e estão também entre as principais áreas de lazer dos habitantes da cidade

independentemente de poder aquisitivo, nível cultural ou social (BOUKAI, 2007). As duas praias de maior popularidade são Copacabana e Ipanema. Estas praias encontram-se localizadas em regiões densamente ocupadas pela população urbana, onde também se concentram vários hotéis de alta categoria que recebem turistas o ano todo.

Praias das cidades Pontal do Paraná e Matinhos (PR)

O litoral paranaense, compreendido entre o Oceano Atlântico e a Serra do Mar, possui apenas 98 km de extensão (ANDRAU, 2006). Nele estão situados sete municípios: Antonina, Guaraqueçaba, Guaratuba, Matinhos, Morretes, Paranaguá e Pontal do Paraná, todos com boa infraestrutura turística para receber cerca de um milhão de visitantes durante a alta temporada. Entre os principais atrativos, são encontradas reservas ecológicas nas quais ainda podem ser observadas espécies raras da fauna e flora, além de belas praias que propiciam momentos de lazer, prática de esportes náuticos e pesca esportiva (SETU-PR, 2008). O clima na região é do tipo subtropical úmido, isto é, não tem estação seca definida e depende das massas Polar Atlântica e Tropical Atlântica para definir as mudanças de estação e temperatura. No verão as médias apresentam-se entre 19 e 21°C e no inverno, entre 12 e 14°C. Nas planícies de Matinhos e Pontal do Paraná a média pluviométrica situa-se em torno de 2.300 mm/ano. Nesta faixa litorânea verifica-se um máximo acentuado de pluviosidade no verão (VANHONI & MENDONÇA, 2008).

Os municípios do litoral do Paraná recebem grande número de turistas provenientes de cidades próximas, principalmente durante o verão. Os turistas que visitam o litoral paranaense são, em sua maioria, procedentes de Curitiba, seguida de outras regiões do estado. Excluindo-se a demanda do próprio estado, os paulistas e catarinenses representam um dos públicos que mais visitam o Litoral do Paraná, sendo os turistas provenientes do exterior apenas uma pequena porcentagem (SETU-PR, 2008^{a, b}).

Os municípios de Matinhos e Pontal do Paraná apresentam grande afluência de público durante a temporada de verão, representando importantes regiões a serem monitoradas em relação à qualidade das praias. Durante esta época, a frequência de banhistas nos balneários e praias de Pontal do Paraná é quase

homogênea, embora no balneário Ipanema seja um pouco maior devido a presença de restaurantes, bares e lojas em geral (ANGELOTTI & NOERNBERG, 2010). Na cidade de Matinhos, enquanto as praias Mansa e Central são muito visitadas por turistas e moradores locais, o balneário Flórida é menos frequentado por apresentar ainda baixa infraestrutura.

4.1.2 Amostragem

Em cada ponto de coleta, dois transectos perpendiculares à borda do mar foram traçados. O primeiro transecto foi traçado cerca de 50m ao norte do sistema de saída de águas pluviais e o segundo, 50m ao sul. Ao longo dos transectos foram coletadas amostras de sedimentos das regiões supralitoral (a cinco metros da borda superior da maré alta), mediolitoral (na região mediana entre a borda superior da maré alta e a borda média da maré baixa) e infralitoral (a cinco metros abaixo da borda mediana da maré baixa). Cada amostra foi composta pela camada superficial de areia compreendida em um quadrante de $0,25\text{m}^2$. Os sedimentos foram acondicionados em sacos estéreis e transportados para o laboratório em caixas de isopor com gelo para o processamento em até 24 horas.

Uma amostra de água em cada transecto também foi coletada. Esta amostragem foi feita utilizando frascos de vidro estéreis em pontos onde a água apresentava profundidade igual ou maior a 1m. Amostras de água também foram coletadas em frente aos sistemas de saída de águas pluviais. As águas foram transportadas para o laboratório em gelo para o processamento em até 24 horas. A Figura 3 apresenta um esquema do desenho amostral das coletas em cada ponto de amostragem.

As temperaturas das amostras de água e dos sedimentos foram medidas em campo. O pH e a salinidade de cada amostra foram medidos no laboratório logo após a coleta.

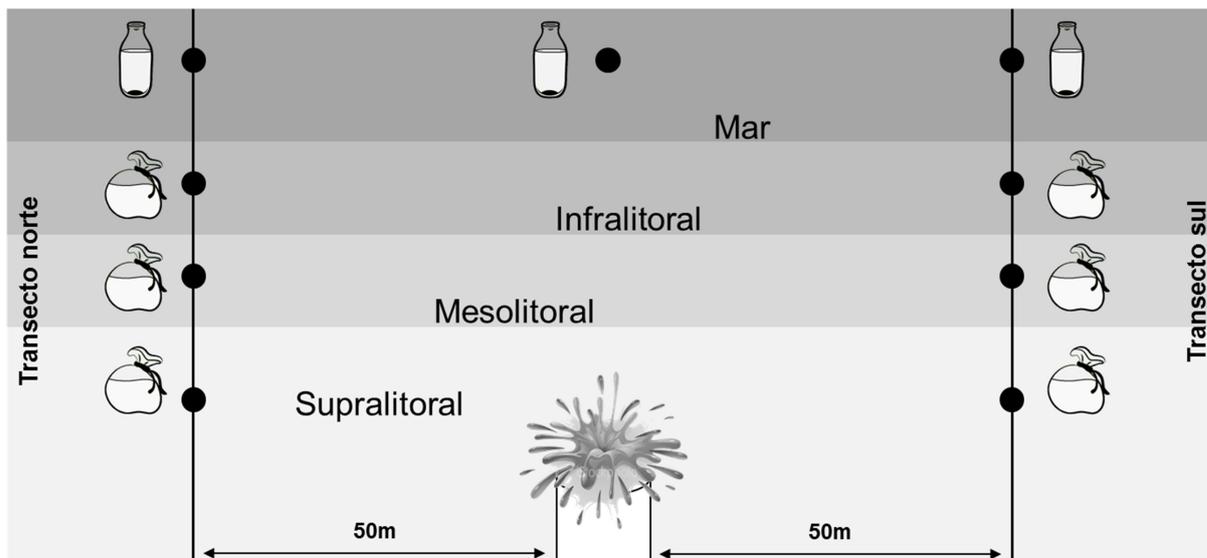


FIGURA 3 – Esquema de amostragem de água e areia em cada ponto de coleta. Cada ponto foi determinado por dois transectos perpendiculares à borda do mar distantes cerca de 50m de um sistema de saída de águas pluviais, sendo um ao norte e outro ao sul. Em cada transecto foram coletadas três amostras de areia e uma amostra de água. Foi coletada também uma amostra de água em frente ao sistema de saída de águas pluviais.

4.2 – Isolamento de leveduras

Para o isolamento de leveduras foram filtrados 25 mL das amostras de água através de membranas estéreis com poros de 0,45 µm de diâmetro. As membranas foram colocadas sobre a superfície de três diferentes meios de cultivo. Para determinação das leveduras totais foi utilizado o ágar Extrato de Malte-Extrato de Levedura (peptona 0,5%, extrato de levedura 0,3%, glicose 1,0%, extrato de malte 0,3%, ágar 2,0%) suplementado com cloranfenicol (200mg/L), com incubação de três a 10 dias a 25°C. Para isolamento diferencial de espécies de *Candida* potencialmente patogênicas foi utilizado o meio CHROMagar-Candida que foi incubado a 37°C por até três dias. O ágar mCA (glicina 1%, maltose 3%, Na₂SO₃ 0,3%, citrato de bismuto 0,5%, cicloheximida 0,15%, glicose 5%, YNB 1%, ágar 1,5%), um meio seletivo e diferencial descrito por Buck & Bubucis (1978), foi utilizado na tentativa de isolamento de linhagens de *C. albicans* e foi incubado a 37°C por até cinco dias.

Para a análise dos sedimentos, 25 g de areia foram adicionados a 200 mL de salina estéril tamponada com fosfato (PBS - NaCl 0,8%, KCl 0,02%, Na₂HPO₄ 0,144%, KH₂PO₄ 0,024%, pH 7,4) e a solução resultante, agitada vigorosamente durante um minuto (VOGEL et al., 2007). Alíquotas de 10 mL do sobrenadante foram filtradas através de membranas estéreis com poros de 0,45 µm de diâmetro, as

quais foram colocadas sobre os meios ágar Extrato de Malte-Extrato de Levedura, CHROMagar-Candida e mCA conforme descrito acima.

Os morfotipos de leveduras crescidos em cada placa foram enumerados e descritos com base em sua cor, textura, brilho, forma e tamanho. As contagens foram expressas em UFC (Unidades Formadoras de Colônia)/100 mL, no caso das amostras de água, e UFC/g, para os sedimentos. Um representante de cada morfotipo de cada amostra foi preservado em caldo GYMP (glicose 2%, extrato de levedura 0,5%, extrato de malte 1%, K₂HPO₄ 0,2%) e glicerol a -80°C.

4.3 – Identificação de leveduras

As leveduras isoladas que apresentaram perfis morfológicos similares foram submetidas à análise molecular por meio da impressão digital de DNA. O iniciador GTG₅ foi utilizado na reação em cadeia da polimerase das linhagens basidiomicéticas, enquanto o iniciador EI1 foi utilizado para as linhagens ascomicéticas (DE BARROS LOPES et al., 1996; DE BARROS LOPES et al., 1998; SAMPAIO et al., 2001). Os isolados que apresentaram perfis moleculares iguais foram considerados como pertencentes à mesma espécie, e um representante de cada perfil foi posteriormente identificado por meio do sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA.

4.3.1 – Identificação molecular

4.3.1.1 - Extração de DNA

Para a extração de DNA foram utilizadas culturas puras cultivadas a 25°C por 24h em ágar Extrato de Malte - Extrato de Levedura. A técnica foi realizada segundo Sambrook & Russel (2006) com modificações. Inicialmente, uma colônia foi ressuspensa em 100 µL de tampão de lise (Tris-HCl 0,05 M, EDTA 0,005 M, NaCl 0,1 M e SDS 10%) e o tubo contendo essa suspensão foi incubado em banho-maria a 65°C por 35 minutos. Em seguida, foram adicionados ao tubo 200 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e essa mistura foi homogeneizada por inversão e centrifugada por 10 minutos a 13.200 rpm. O sobrenadante foi então retirado e

transferido para um outro tubo, onde foram adicionados 100 µL de isopropanol. Em seguida, houve uma nova centrifugação a 13.200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi lavado com 200 µL de etanol 70% gelado. O tubo foi homogeneizado por inversão e centrifugado a 13.200 rpm por três minutos. A fase aquosa foi desprezada e o microtubo, então, deixado em temperatura ambiente para secagem parcial do DNA. O precipitado foi eluído em 100 µL de tampão TE (TRIS-HCL 10mM, EDTA 1mM, pH 8).

4.3.1.2 - Impressão digital de DNA de leveduras basidiomicéticas utilizando o iniciador (GTG)₅

Para o agrupamento das leveduras basidiomicéticas em perfis moleculares foi utilizada a técnica de impressão digital de DNA por meio da reação em cadeia da polimerase utilizando o iniciador específico (GTG)₅ (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'), segundo protocolo descrito por Sampaio e colaboradores (2001). Os ensaios foram realizados utilizando-se 2,5 µL de tampão 10X (MBI Fermentas), 1 µL de dNTP 2,5 mM (Invitrogen, USA), 1,5 µL de MgCl₂ 25 mM (MBI Fermentas), 2 µL do iniciador (GTG)₅ 10 pmol (Invitrogen, USA), 0,2 µL de taq DNA polimerase 1,25 U (MBI Fermentas) e 1 µL de DNA. O volume final da reação foi ajustado com água deionizada para 25 µL. A reação foi realizada em um termociclador Mastercycler Pro (Eppendorf) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 50°C por um minuto e extensão a 72°C por um minuto, seguidos de extensão final a 72°C por seis minutos. Após as reações de amplificação, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Pronadisa, Espanha) a 1,5% em tampão TBE 0,5x (Tris-Borato-EDTA – 89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA) a 80 V. As amostras foram coradas pela adição de GelRed (Biotium, USA) e visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas utilizando um sistema de foto-documentação (Vilber Lourmat, França).

4.3.1.3 - Impressão digital de DNA de leveduras ascomicéticas utilizando o iniciador EI1

As leveduras ascomicéticas foram agrupadas em perfis moleculares por meio da impressão digital de DNA utilizando-se o iniciador EI1 (5'-CTGGCTTGGTGTATG-3'), conforme descrito por De Barros Lopes e colaboradores (1996, 1998). Para um volume final de 25 µL, foram adicionados à reação: 2,5 µL de tampão 10X (MBI Fermentas), 1 µL de dNTP 2,5 mM (Invitrogen, USA), 1,5 µL de MgCl₂ 25 mM (MBI Fermentas), 2 µL do iniciador EI1 10 pmol (Invitrogen, USA), 0,2 µL de taq DNA polimerase 1,25 U (MBI Fermentas) e 1 µL de DNA. O volume final da reação foi ajustado com água deionizada. A reação foi realizada em um termociclador Mastercycler Pro (Eppendorf) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por três minutos, seguida por 33 ciclos de desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento a 45°C por dois minutos e extensão a 74°C por um minuto e 30 segundos, e por fim, uma extensão a 74°C por cinco minutos. Após as reações de amplificação, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Pronadisa, Espanha) a 1,5% em tampão TBE 0,5x a 80 V. As amostras foram coradas pela adição de GelRed (Biotium, USA) e visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas utilizando um sistema de foto-documentação (Vilber Lourmat, França).

4.3.1.4 - Sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA

De cada um dos perfis moleculares obtidos, um isolado foi selecionado e submetido ao sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA como descrito por Kurtzman & Robnet (1998). Para amplificação da região a ser sequenciada foram utilizados os iniciadores NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). A reação foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 5 µL de tampão de PCR 10X (MBI Fermentas), 3 µL de MgCl₂ 25 mM (MBI Fermentas), 1 µL de dNTP 2,5 mM (Invitrogen, USA), 1 µL do iniciador NL1 10 pmol (Invitrogen, USA), 1 µL do iniciador NL4 10 pmol (Invitrogen, USA), 0,2 µL de taq DNA polimerase 1,25 U (MBI Fermentas) e 1 µL de DNA. O volume da reação foi ajustado com a adição de água deionizada. A reação foi realizada em um termociclador Mastercycler Pro

(Eppendorf) e ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por dois minutos, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 54°C por 25 segundos e extensão a 72°C por 20 segundos, seguidos de extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Pronadisa, Espanha) a 1% em tampão TBE 0,5x a 80 V. As amostras foram coradas pela adição de GelRed (Biotium, USA) e visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas utilizando um sistema de foto-documentação (Vilber Lourmat, França).

Para purificação dos amplicons, foram adicionados 135 µL de etanol absoluto e 11,25 µL de EDTA a cada tubo contendo 45 µL dos produtos de PCR. Após homogeneização, os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 25 minutos e os sobrenadantes retirados cuidadosamente e descartados. A seguir, foram adicionados 120 µL de etanol 70-80% gelado, e os tubos, centrifugados a 13.000 rpm por 10 minutos. Os sobrenadantes foram novamente descartados. Os tubos foram deixados à temperatura ambiente para evaporação de todo o excesso de etanol. Os DNAs foram ressuspensos em 10 µL de água deionizada. Após a purificação, foram realizadas as dosagens dos DNAs em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies) a 260 nm.

As reações de sequenciamento de DNA foram preparadas utilizando o kit BigDye versão 3.1 (Applied Biosystems, EUA) e o sequenciamento propriamente dito foi realizado em um seqüenciador automatizado ABI 3730. A qualidade das bases obtidas em cada sequência foi avaliada por meio do aplicativo Phred disponível em <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>. A seguir, os cromatogramas foram conferidos visualmente com auxílio do programa Chromas v. 2.23 (© 1998-2002 Technelysium Pty LTD) para solucionar possíveis ambiguidades. Por fim, as sequências foram comparadas com aquelas depositadas no GenBank por meio da ferramenta BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool - versão 2.215 do BLAST 2.0) disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

4.4 – Teste de sensibilidade de leveduras oportunistas a antifúngicos

Representantes de leveduras isoladas nos meios CHROMagar-*Candida* ou mCA e pertencentes a espécies que já foram previamente descritas como oportunistas ou isoladas a partir de fontes humanas foram testadas quanto à

sensibilidade a anfotericina B, fluconazol e itraconazol por meio da técnica de microdiluição em meio líquido, apresentada pelo documento M27-A3 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008). O meio utilizado para esta metodologia foi o RPMI-1640 (com glutamina, sem bicarbonato e com indicador vermelho de fenol) acrescido de MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico). Espécies que apresentaram mais de um isolado tiveram apenas algumas linhagens selecionadas para o teste.

As soluções estoques das drogas foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) para anfotericina B (Sigma) e itraconazol (fornecido pela Farmácia de Manipulação da Faculdade de Farmácia da UFMG) ou em água para o fluconazol (Sigma) em concentrações de dez vezes as maiores concentrações a serem testadas. Para os testes, as soluções estoques foram diluídas cinco vezes com RPMI para a obtenção de soluções duas vezes concentradas. Em seguida foram feitas nove diluições seriadas respeitando-se o fator de diluição de 1:2. Para a anfotericina B e itraconazol as concentrações testadas foram de 0,03125 a 16 µg/mL e para o fluconazol foram de 0,125 a 64 µg/mL.

Para o preparo dos inóculos, as colônias de leveduras foram ressuspensas em 5mL de solução salina estéril 0,145 mol/L (8,5 g/L NaCl). As suspensões resultantes foram agitadas em vórtex por 15 segundos e as densidades celulares, ajustadas com auxílio de espectrofotômetro, isto é, foi acrescentada solução salina suficiente para obter a transmitância de 75- 80% a 530 nm equivalente a aquela de uma solução-padrão da escala de McFarland 0,5. Esse procedimento fornece as suspensões-padrão das leveduras contendo 1×10^6 a 5×10^6 células por mL. Estas suspensões foram diluídas na proporção de um para 50 e depois de um para 20 com o próprio meio de cultura RPMI para se obter as densidades necessárias para o teste (de 1×10^3 a 5×10^3 UFC/mL).

Os testes foram realizados em placas de microdiluição de 96 poços. Nas colunas de 2 a 11 foram adicionados 100 µL das diluições das drogas duas vezes concentradas. A coluna 2 continha a maior concentração da droga e a coluna 11 a menor concentração. Nas linhas de A a H foram inoculados 100 µL da suspensão dos inóculos duas vezes concentrados. O volume final de cada poço foi de 200 µL, de forma que tanto as concentrações das drogas quanto as concentrações dos inóculos caíram de 2x para 1x, atingindo assim os valores desejados. Os poços de

controle positivo de crescimento (coluna 12) continham 100 µL de meio estéril, isento de droga, inoculados com 100µL das suspensões duas vezes concentradas dos inóculos. Os poços de controle de esterilidade do meio (coluna 1) continham 200 µL do meio RPMI isento de drogas e inóculos. As placas foram incubadas a 35°C por 24 a 48h, observando-se a presença ou ausência de crescimento visível. As concentrações inibitórias mínimas foram dadas pelas concentrações das drogas que levaram a uma redução de 80% do crescimento das leveduras para as drogas fluconazol e itraconazol e de 100% para a anfotericina B. Os valores de referência para determinar a resistência, dose-dependência ou sensibilidade dos isolados aos antifúngicos testados estão listados na tabela 4.

Tabela 4 – Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) utilizadas como referência em testes de susceptibilidade *in vitro* para linhagens de *Candida*.

Antifúngicos	Resistência CIM (µg/mL)	Dose-dependência CIM (µg/mL)	Sensibilidade CIM (µg/mL)
Fluconazol	≥64	16 a 32	≤8
Itraconazol	≥1	0,25 a 0,5	≤0,125
Anfotericina B	>1	NA*	<1

* NA – não se aplica

4.5 – Pesquisa de fatores de virulência

4.5.1 – Testes de produção de proteinase por leveduras oportunistas

Representantes de leveduras isoladas em CHROMagar-Candida ou em mCA e pertencentes a espécies que já foram previamente descritas como oportunistas ou isoladas a partir de fontes humanas foram testadas quanto à capacidade de produção de proteinase. A secreção de proteinase foi avaliada em um meio sólido contendo Yeast Carbon Base (YCB) 1,17%, extrato de levedura 0,1%, albumina de soro bovino (ASB) 0,2% e ágar 1,8% (pH 5,0) de acordo com De Bernardis e colaboradores (1999). O inóculo das leveduras consistiu de 10µL de uma suspensão de 10⁶ células/mL depositados sobre o ágar. A suspensão de leveduras teve a concentração ajustada com auxílio de espectrofotômetro. As placas foram incubadas por sete dias a 28°C e a proteólise da ASB foi visualizada como um halo transparente. A atividade de proteinase foi classificada como negativa quando não houve clarificação visível, 1+ quando a proteólise ao redor da colônia foi de 1 a 2

mm e 2+ quando a descoloração do ágar chegou a exceder 3 – 5 mm ao redor da colônia. Espécies que apresentaram mais de um isolado tiveram apenas algumas linhagens selecionadas para o teste.

4.5.2 – Teste de adesão a células epiteliais bucais de leveduras oportunistas

Algumas leveduras oportunistas isoladas em CHROMagar-Candida ou em mCA foram testadas quanto à capacidade de adesão a células epiteliais bucais (CEB) conforme a metodologia proposta por Kimura e Pearsall (1978). As linhagens isoladas foram repicadas em ágar Extrato de Malte-Extrato de Levedura e incubadas a 37°C por 24 h. Com auxílio de espectrofotômetro, foi então preparada uma suspensão de células em caldo Sabouraud (peptona 1%, glicose 2%, extrato de levedura 0,5%) a uma concentração final de 10^6 células/mL. Células epiteliais bucais humanas de adultos jovens saudáveis foram coletadas com o auxílio de dois swabs estéreis e inoculadas em 10 mL de tampão PBS. A suspensão de CEB foi centrifugada e lavada quatro vezes em PBS estéril (3000 xg por 10 min) para a remoção de micro-organismos aderidos. As CEB foram então suspensas a uma concentração de 10^5 células/mL, contadas com o auxílio de uma câmara de Neubauer, e foram utilizadas imediatamente para o teste de adesão.

Para o teste, foram misturados delicadamente 0,5 mL da suspensão de CEB e 0,5 mL da suspensão de leveduras e incubados sob agitação a 37°C por uma hora. A mistura foi então filtrada em um filtro de policarbonato com poros de 12 μ m adicionando-se ainda 100 mL de PBS para remoção de leveduras não aderidas. O filtro foi retirado com o auxílio de uma pinça e pressionado contra uma lâmina de vidro. Após 10 segundos, o filtro foi removido delicadamente, deixando as CEB aderidas à lâmina de vidro. A preparação foi seca, fixada pelo calor e corada com cristal violeta. Posteriormente, foram contadas com auxílio de microscopia óptica o número de células com leveduras aderidas dentre 50 CEB visualizadas, bem como o número de leveduras aderidas nestas mesmas 50 CEB.

4.5.3 – Pesquisa de fatores de virulência de linhagens de *C. albicans*

Para os testes descritos a seguir foram utilizadas as linhagens de *C. albicans* isoladas no presente trabalho, bem como outras sete linhagens de origem ambiental isoladas durante o trabalho de mestrado realizado por Espírito Santo (2014) no Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos da UFMG. Estas últimas linhagens foram obtidas a partir de amostras de água da Lagoa da Pampulha (Belo Horizonte, Minas Gerais) e do lago São Luís (Catas Altas, Minas Gerais), e contribuíram para a observação do comportamento de leveduras isoladas a partir de amostras ambientais frente aos testes de fator de virulência. Além disso, a linhagem SC5314 de *C. albicans* foi incluída como controle em todos os testes, já que a mesma representa um isolado clínico cuja virulência em modelos animais é bastante conhecida. Uma linhagem de *Candida* não *albicans* (*C. tropicalis*) e uma linhagem de uma levedura oportunista não *Candida* (*Kodamaea ohmeri*) também foram inseridas nos experimentos com fins comparativos. Esta parte do trabalho foi realizada no Laboratory of Molecular Cell Biology da Katholieke Universiteit Leuven, Bélgica.

4.5.3.1 Estudo da morfogênese de linhagens de *C. albicans*

As leveduras foram crescidas *overnight* em meio YPD (peptona bacteriológica 2%, extrato de levedura 1%, glicose 2,0%, ágar 2%) a 28°C. Posteriormente, foi feita, para cada cultura, uma suspensão de células em tampão PBS cuja densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro. As suspensões foram então diluídas para obtenção de colônias isoladas após o plaqueamento. Foram testados diferentes meios indutores de filamentação:

- meio contendo soro fetal bovino - ágar YPD com soro fetal bovino a 10% (Sigma);
- meio contendo manitol como fonte única de carbono - ágar Spider (caldo nutriente 1%, K₂HPO₄ 0,2%, manitol 1%, ágar 1,35%);
- meio pobre em nutrientes mas contendo uma combinação de vários aminoácidos - ágar Lee (glicose 1,25%, (NH₄)₂SO₄ 0,5%, MgSO₄.7H₂O 0,02%, K₂HPO₄.3H₂O 0,25%, NaCl 0,5%, alanina 0,05%, leucina 0,13%, lisina 0,1%, metionina 0,01%,

fenilalanina 0,05 %, prolina 0,05%, treonina 0,05%, ornitina 0,00714%, biotina 0,0001%, ágar 2%, pH 6,8);

- meio com limitação de nitrogênio - ágar SLAD (YNB sem aminoácidos e sem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,17%, glicose 2%, sulfato de amônio 50 μM , ágar 2%, pH 6,5) (MAIDAN et al., 2005).

As placas foram incubadas a 30°C por 5 dias e uma colônia representativa de cada placa foi fotografada. Para a morfologia de colônias incorporadas no meio, as células de leveduras foram plaqueadas por meio da técnica *pour plate* em meio ágar YPS (peptona bacteriológica 2%, extrato de levedura 1%, sacarose 2,0%, ágar 1,5%) e, após incubação a 37°C por 5 dias, as colônias crescidas foram fotografadas (BROWN et al., 1999). As linhagens foram testadas ainda em meio YPD líquido acrescido de soro fetal bovino a 10% (Sigma) e visualizadas em microscópio óptico após terem sido incubadas a 37°C por 4 horas.

4.5.3.2 – Teste da capacidade de formação de biofilme de linhagens de *C. albicans*

a) Adesão e formação de biofilme em cateteres de poliuretano - teste *in vitro*

Para testar a capacidade de aderir e formar biofilme *in vitro*, as linhagens de *C. albicans* e das demais leveduras foram crescidas *overnight* em meio sólido YPD a 37°C. Depois, as células foram lavadas e ressuspensas em tampão PBS. Pedacinhos de 1 cm de cateteres de poliuretano foram incubados *overnight* com soro fetal bovino (Sigma) a 37°C. Foram utilizados três fragmentos de cateter por linhagem testada. Uma suspensão contendo 5×10^4 células por mL foi preparada em meio RPMI (RPMI 1640 com L-glutamina e sem carbonato de sódio tamponado com MOPS, pH 7) e adicionada aos cateteres. O conjunto foi incubado por 90 minutos a 37°C para a fase de adesão. Os fragmentos foram então lavados duas vezes com tampão PBS e submetidos a quantificação da biomassa aderida para finalizar o teste de adesão ou submersos em meio líquido RPMI e incubados por 24 horas a 37°C para dar continuidade ao teste de formação de biofilme (RICICOVÁ et al., 2010). A quantificação das biomassas resultantes de cada teste foi realizada conforme

descrito no item “c”. Tanto para o teste de adesão quanto para o teste de formação de biofilme foram realizados três experimentos independentes.

b) Formação de biofilme em cateteres de poliuretano - teste *in vivo*

Para os testes de formação de biofilme *in vivo* foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas, pesando em torno de 20 g cada e livres de patógenos. Os animais foram alimentados com dieta padrão *ad libitum*. Além disso, os animais receberam dexametasona (1 mg/L) e tetraciclina (1 g/L) na água de beber para obter efeito imunossupressor e para minimizar as infecções bacterianas, respectivamente. Foram utilizados dois animais por linhagem a ser testada para cada período avaliado. Todos os experimentos utilizando animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG.

As linhagens de *C. albicans* e das demais leveduras a serem testadas foram crescidas *overnight* a 37°C em placas de YPD, lavadas e ressuspendidas em PBS. Assim como no ensaio de formação de biofilme *in vitro*, foi preparada uma suspensão de células (5×10^4 células por mL) em meio RPMI. Pedacos de 1 cm de cateteres de poliuretano (24 mm de diâmetro) foram incubados a 37°C por 90 minutos em 1 mL da suspensão de células. Os fragmentos foram lavados duas vezes com PBS para então serem implantados sob a pele dos camundongos. Os animais foram anestesiados com solução de quetamina e xilazina em PBS (80 mg/Kg/15 mg/Kg) e a parte inferior das costas dos camundongos foram raspadas e desinfetadas com clorexidina 0,5% em álcool 70%. Uma incisão de 10 mm foi feita longitudinalmente e a camada subcutânea foi cuidadosamente dissecada para criar três túneis. Até seis fragmentos de cateteres foram implantados. A incisão foi fechada com grampos cirúrgicos e desinfetada com clorexidina 0,5% em álcool 70%. Após os períodos de 4 horas, 48 horas e 6 dias, os camundongos foram submetidos a eutanásia por meio de anestesia geral (quetamina e xilazina em PBS 80 mg/kg/ 15 mg/Kg) seguida de deslocamento cervical para a retirada dos cateteres. A pele foi desinfetada e os fragmentos de cateteres foram removidos do tecido subcutâneo e lavados duas vezes com PBS (RICICOVÁ et al., 2010). A biomassa dos biofilmes formados foi quantificada por meio de plaqueamento (ver item “c”). Assim como no teste *in vitro*, a adesão das linhagens de *C. albicans* aos fragmentos de cateteres também foi avaliada neste experimento.

c) Quantificação da biomassa dos testes de adesão e formação de biofilme em cateteres de poliuretano

Para quantificar a biomassa dos biofilmes formados nos ensaios *in vitro* e *in vivo*, após a etapa de lavagem dos fragmentos de cateteres utilizados em cada um dos experimentos, os mesmos foram transferidos para uma solução tampão PBS e agitados em um banho-maria sonificador por 10 minutos a 40.000 Hz e vortexados por 30 segundos. As amostras originais e as diluições 1:10 e 1:100 foram plaqueadas em duplicata em ágar YPD. Após dois dias de incubação a 37°C, as unidades formadoras de colônias foram contadas e foi feita uma média das contagens das duplicatas (RICICOVÁ et al., 2010).

4.5.3.3 - Ensaio de virulência de linhagens de *C. albicans* *in vivo*

Para determinar a virulência *in vivo* das linhagens de *C. albicans* e das demais leveduras, foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas, com peso de 20 g cada, livres de patógenos e com dieta padrão *ad libitum*. Os animais foram inoculados pela veia lateral da cauda com 5×10^4 células de leveduras/g de cada animal. Os camundongos tiveram os pesos monitorados todos os dias por um mês. Durante este período, também foi avaliada a sobrevivência dos mesmos (VAN DIJCK et al., 2002). Foram utilizados cinco camundongos para cada linhagem testada. Foram realizados dois experimentos independentes.

4.6 – Quantificação de coliformes totais e *E. coli*

Nas análises bacteriológicas foi empregado o método cromogênico COLILERT (IDEXX, U.S.A.). Este método utiliza a tecnologia de substrato definido (Defined Substrate Technology) para detecção de coliformes totais e *E. coli* em água. O reagente COLILERT contém o nutriente ONPG que é metabolizado pela enzima β -galactosidase presente nos coliformes levando, após o período de incubação, à alteração da cor original da amostra testada para amarelo. O reagente possui também o MUG que é metabolizado pela enzima β -glucuronidase presente em *E. coli* gerando fluorescência sob luz UV a 365 nm após a incubação. As bactérias não

pertencentes aos coliformes que possuem estas enzimas são seletivamente suprimidas pela matriz especificamente formulada do COLILERT.

Um sachê de reagente COLILERT foi então adicionado a 100 mL de cada amostra de água ou 100 mL de cada lavado de areia e, após uma homogeneização, as misturas resultantes foram transferidas para as cartelas Quanti-Tray (IDEXX, U.S.A.). Em seguida as cartelas foram lacradas com auxílio de uma seladora e incubadas por 24 horas a 35°C. Os resultados foram verificados com a mudança de cor nas cavidades das cartelas. Nas amostras positivas para coliformes totais houve mudança para cor amarela. Para *E. coli* foram consideradas positivas as cavidades amarelas que apresentaram fluorescência na presença de luz UV a 365 nm. As densidades foram dadas por meio do número de cavidades positivas e tabela específica de Número Mais Provável (NMP).

4.7 – Análises estatísticas

Para avaliar a existência de correlação entre as contagens de leveduras, bactérias indicadoras e parâmetros físico-químicos foi calculado o coeficiente de correlação de Spearman. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para pesquisar a existência de diferenças significativas entre as densidades dos micro-organismos em relação aos diferentes ambientes amostrados. Este teste também foi empregado na análise dos dados de unidades formadoras de colônias recuperadas a partir dos testes de formação de biofilme. Utilizou-se para realização dos testes supracitados o programa estatístico R versão 3.0.2

Nos ensaios de virulência *in vivo*, as curvas de sobrevivência foram estimadas por meio do método de Kaplan-Meier e possíveis diferenças entre as mesmas foram avaliadas por meio do teste estatístico de “log rank de Cox-Mantel”. Estas análises foram realizadas com auxílio do programa Graphpad Prism versão 6.0. Em todos os casos adotou-se como limite de significância um valor de p igual ou menor a 0,05.

5.1 – Quantificação de coliformes totais e *E. coli*

A quantificação de coliformes totais foi feita apenas nas praias do Rio de Janeiro (Tabela 5). Dentre as 36 amostras de água analisadas, 29 (81%) apresentaram concentrações destas bactérias maiores ou iguais ao limite de detecção do método de análise empregado (4.839,2 NMP/100 mL). Atualmente, estes micro-organismos não são mais recomendados pela legislação brasileira para a avaliação da qualidade das águas de praias recreacionais. Embora não haja também limites estabelecidos em âmbito nacional para as concentrações de coliformes totais nas areias das praias, no Rio de Janeiro, a Secretaria Municipal do Meio Ambiente determina, por meio da Resolução nº. 468/10, um valor máximo de 300 NMP/g para este parâmetro microbiológico. Considerando este critério, 12 (17%) das 72 amostras de areia coletadas poderiam ser classificadas como não recomendadas. Ainda que os coliformes totais não sejam considerados os indicadores mais apropriados para detecção de contaminação fecal, uma vez que algumas espécies pertencentes a este grupo podem ser encontradas na natureza e muitas são capazes de persistir e se multiplicar no solo, alguns trabalhos apontam para uma associação positiva entre elevadas contagens destes micro-organismos em praias e o aparecimento de doenças gastrointestinais em banhistas (HAILE et al., 1999; PRIETO et al., 2001; HALLER et al., 2009; FERGUSON & SIGNORETTO, 2011).

De acordo com o teste de Kruskal-Wallis, foram observadas diferenças significativas entre as concentrações de coliformes totais nas amostras de areia provenientes das zonas infralitoral e mediolitoral ($p=0,002$), bem como das zonas infralitoral e supralitoral ($p=0,001$). Já entre as zonas mediolitoral e supralitoral esta diferença não pode ser notada ($p>0,05$). As amostras da zona infralitoral abrigaram maiores concentrações destas bactérias (Figura 4). Isto ocorreu possivelmente devido a influência direta da água do mar sobre esta zona, já que a maioria das águas avaliadas no presente trabalho apresentaram altas contagens destes micro-organismos. Não houve diferenças significativas entre as densidades de coliformes

nas águas e areias das praias entre as estações verão e inverno tanto no Rio de Janeiro quanto no Paraná ($p > 0,05$).

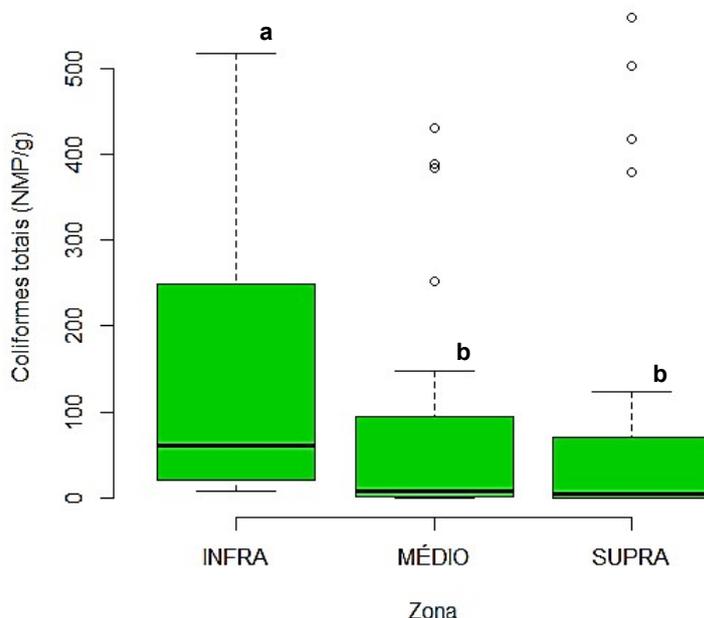


FIGURA 4 – Boxplot das densidades de coliformes totais em amostras de areia em função das zonas onde estas amostras foram coletadas. As letras acima de cada gráfico indicam a existência ou não de diferenças significativas entre as zonas segundo o teste de Kruskal-Wallis. Locais com letras iguais não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). INFRA = infralitoral; MÉDIO = mediolitoral; SUPRA = supralitoral.

Em relação à quantificação de *E. coli*, 22% (8) das amostras de água coletadas no Paraná e 53% (19) das amostras coletadas no Rio de Janeiro apresentaram densidades superiores a 2.000 NMP/100mL, sendo assim consideradas impróprias para banho de acordo com os critérios estabelecidos pela legislação brasileira (Tabelas 5 e 6). As altas densidades de *E. coli* em águas naturais são normalmente associadas à contaminação fecal recente e são usadas para indicar a possível presença de outros patógenos de origem entérica (TALLON et al., 2005). Alguns estudos mostram a existência de uma correlação entre *E. coli* e a incidência de banhistas acometidos por doenças gastrointestinais (PRUSS, 1998; WADE et al., 2003). Estas bactérias podem ser introduzidas no mar por meio de efluentes de esgotos, escoamento de águas pluviais, fezes de animais selvagens, ou a partir de outras fontes difusas (SOLO-GABRIELE et al., 2000; HALLIDAY & GAST, 2011). A possível contaminação das águas por bactérias persistentes no ambiente é um importante fator a ser levado em consideração e que será discutido mais adiante.

Uma diferença significativa (Kruskal-Wallis, $p < 0,001$) entre as densidades de *E. coli* encontradas nas águas das praias do Rio de Janeiro e do Paraná foi observada. Esta diferença é reforçada quando observa-se o número de amostras consideradas impróprias para banho em cada estado. Segundo Sotero-Martins e colaboradores (2013), a estrutura das cidades litorâneas tem influência direta sobre a qualidade das águas costeiras. O fato da cidade do Rio de Janeiro ser maior, com uma grande população e um nível mais elevado de urbanização, apresentando, assim, maior poluição orgânica resultante das atividades antrópicas, pode ter contribuído para um número aumentado de amostras contaminadas. As concentrações de *E. coli* presentes nas amostras de água coletadas não diferiram entre as estações verão e inverno em nenhum dos estados ($p > 0,05$).

Em relação às areias (Tabelas 5 e 6), 19% (14) das amostras das praias do Rio de Janeiro apresentaram densidades de *E. coli* superiores a 38 NMP/g, sendo classificadas como não recomendadas, conforme a resolução nº. 468/10 da Secretaria Municipal do Meio Ambiente do Rio de Janeiro. No Paraná, não existe nenhuma legislação específica em relação à qualidade microbiológica das areias das praias. Caso fossem adotados os mesmo critérios estabelecidos para o Rio de Janeiro, 17% (12) das amostras coletadas no Paraná estariam inadequadas. Assim como outras bactérias do grupo coliformes, *E. coli* é capaz de sobreviver e se multiplicar no solo, podendo, inclusive, contribuir para a contaminação de águas próximas (BYAPPANAHALLI et al., 2012). Este fato levanta a questão se *E. coli* pode, de fato, ser considerado um efetivo indicador de contaminação fecal recente, já que a presença desta bactéria pode ser resultado de uma contaminação antiga que persistiu no ambiente. Além da água do mar, o escoamento de águas da chuva que concentram micro-organismos de diversas áreas urbanas, as falhas de sistemas de esgoto próximos às praias e as fezes de animais são fatores que contribuem para a contaminação inicial das areias (HALLIDAY & GAST, 2011).

As contagens de *E. coli* nas amostras de areia da zona supralitoral foram, no geral, menores (Figura 5), diferindo significativamente daquelas das zonas mediolitoral (Kruskal-Wallis, $p = 0,02$) e infralitoral ($p < 0,001$). É possível que a contaminação das areias das praias por este micro-organismo tenha ocorrido principalmente por meio da filtração da água do mar durante os ciclos das marés, uma vez que as amostras que apresentaram as maiores densidades de *E. coli* foram

aquelas provenientes das areias úmidas e molhadas. Além disso, um outro fator que ajudaria a explicar a menor abundância de *E. coli* nas amostras da zona supralitoral é o fato de que bactérias entéricas podem sobreviver menos na superfície de areias secas (SABINO et al., 2011). Não foram observadas diferenças das densidades de *E. coli* entre as estações estudadas em ambos estados ($p>0,05$).

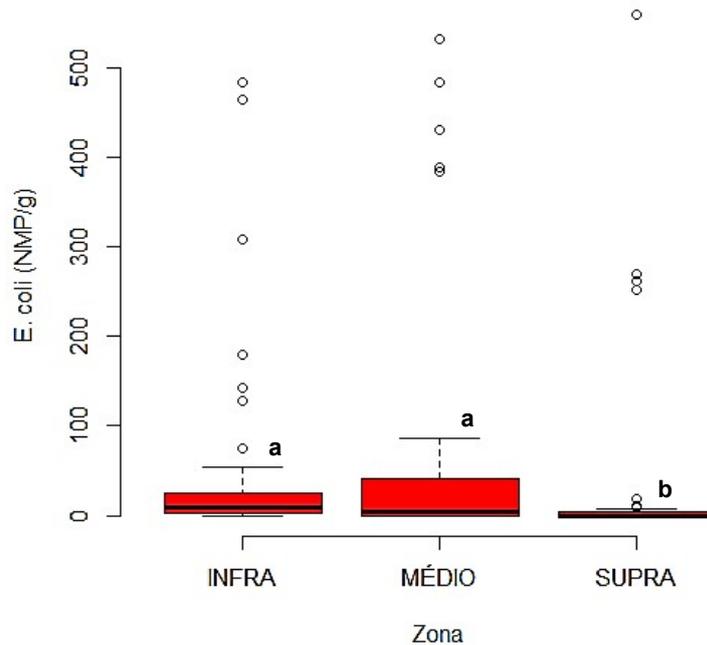


FIGURA 5 – Boxplot das densidades de *E. coli* em amostras de areia em função das zonas onde estas amostras foram coletadas. As letras acima de cada gráfico indicam a existência ou não de diferenças significativas entre as zonas segundo o teste de Kruskal-Wallis. Locais com letras iguais não diferem significativamente entre si ($p>0,05$). INFRA – infralitoral; MÉDIO – mediolitoral; SUPRA – supralitoral.

Conforme o teste estatístico de Spearman, as densidades de *E. coli* apresentaram correlação positiva com as contagens de coliformes totais nas amostras de água e areia das praias do Rio de Janeiro ($p<0,001$) mesmo quando as praias e estações foram avaliadas separadamente. Este resultado pode indicar a existência de uma fonte comum de contaminação para estes micro-organismos, principalmente porque ambos são frequentemente associados à poluição fecal.

Tabela 5 – Densidades de leveduras, coliformes totais e *E. coli* em amostras de água e areia coletadas em praias recreacionais do estado do Rio de Janeiro (UFC ou NMP/100mL para amostras de água e UFC ou NMP/g para amostras de areia).

				Leveduras (UFC/g ou 100 mL)		Coliformes totais (NMP/g ou 100 mL)		<i>E. coli</i> (NMP/g ou 100 mL)				Leveduras (UFC/g ou 100 mL)		Coliformes totais (NMP/g ou 100 mL)		<i>E. coli</i> (NMP/g ou 100 mL)				
Praia	Transecto*	Zona**	Inverno	Verão	Inverno	Verão	Inverno	Verão	Praia	Transecto*	Zona**	Inverno	Verão	Inverno	Verão	Inverno	Verão			
RIO DE JANEIRO (RJ)	Ipanema - ponto 1	1	SUPRA	6.5	0.0	123.2	0.8	2.5	0.5	Copacabana - ponto 1	1	SUPRA	250.0	0.0	5.6	0.3	<0.2	<0.2		
			MEDIO	25.6	0.0	20.5	3.2	<0.2	2.9			MEDIO	56.8	1.6	0.2	148.0	<0.2	78.5		
			INFRA	4.3	1.0	>517.3	>463.8	7.0	>463.8			INFRA	2.3	408.5	7.6	>449.3	1.7	7.7		
			ÁGUA	24.0	0.0	>4839.2	>4839.2	3465.8	>4839.2			ÁGUA	16.0	32.0	2406.6	>4839.2	821.2	1659.4		
		2	ÁGUA	84.0	8.0	>4839.2	>4839.3	4839.2	1454.0		2	ÁGUA	56.0	28.0	>4839.2	>4839.2	>4839.2	>4839.2		
		3	SUPRA	0.9	5.7	0.2	0.7	0.2	<0.2		3	SUPRA	12.0	3.2	4.7	0.3	4.7	<0.2		
			MEDIO	5.8	0.8	<0.2	125.4	0.8	56.1			MEDIO	0.8	4.0	<0.2	64.8	<0.2	45.1		
			INFRA	2.1	0.0	171.6	>481.0	6.0	308.8			INFRA	0.0	0.0	7.6	59.0	4.7	14.0		
			ÁGUA	0.0	20.0	2599.4	>4839.2	689.6	>4839.2			ÁGUA	64.0	4.0	>4839.2	>4839.2	>4839.2	>4839.2		
		Ipanema - ponto 2	1	SUPRA	64.0	142.4	379.4	0.3	270.0		<0.2	Copacabana - ponto 2	1	SUPRA	124.4	0.0	5.1	14.1	0.2	<0.2
				MEDIO	13.4	9.6	6.3	>387.8	5.4		>387.8			MEDIO	1.8	9.5	0.2	>384.2	<0.2	>384.2
				INFRA	1.2	2.5	61.4	102.6	3.8		38.2			INFRA	15.6	2.8	38.7	44.0	13.1	17.7
	ÁGUA			8.0	4.0	1841.6	>4839.2	581.8	1841.6	ÁGUA	36.0			8.0	>4839.2	>4839.2	3465.8	1841.6		
	2		ÁGUA	20.0	0.0	>4839.2	>4839.2	520.6	1960.8	2	ÁGUA		12.0	24.0	4839.2	>4839.2	2406.6	3972.6		
	3		SUPRA	145.1	4.0	115.0	4.0	18.7	<0.2	3	SUPRA		114.7	2.4	13.0	<0.2	1.1	<0.2		
			MEDIO	15.0	0.8	2.2	4.1	<0.2	0.6		MEDIO		2.8	0.0	<0.2	39.7	0.4	22.7		
			INFRA	0.00	0.0	43.5	294.7	0.5	53.3		INFRA		2.3	0.9	12.2	17.2	4.6	5.2		
			ÁGUA	0.00	4.0	1454.0	>4839.2	1034.4	1034.4		ÁGUA		20.0	8.0	>4839.2	>4839.2	922.2	2406.6		
	Ipanema - ponto 3		1	SUPRA	133.1	79.8	8.9	25.9	0.2	0.2	Copacabana - ponto 3		1	SUPRA	367.0	32.3	>558.5	3.6	>558.5	<0.2
				MEDIO	2.7	7.9	3.0	10.9	1.7	4.4				MEDIO	24.7	0.0	1.2	251.2	11.3	28.8
				INFRA	0.0	0.9	155.3	202.2	22.6	28.0				INFRA	0.0	0.0	7.8	>476.1	7.5	143.0
		ÁGUA		4.0	12.0	1258.8	4839.2	67.4	2827.2	ÁGUA		104.0		8.0	>4839.2	>4839.2	2.0	>4839.2		
		2	ÁGUA	28.0	20.0	944.2	>4839.2	296.6	2599.4	2		ÁGUA	36.0	20.0	>4839.2	>4839.2	3465.8	4839.2		
		3	SUPRA	244.6	0.8	>501.7	0.3	3.9	<0.2	3		SUPRA	222.6	0.0	417.1	<0.2	251.8	<0.2		
MEDIO			139.4	21.4	1.7	10.7	<0.2	3.2	MEDIO			5.3	0.0	430.7	8.0	>430.7	0.8			
INFRA			1.2	0.0	23.9	186.0	3.2	16.7	INFRA			3.7	9.9	39.9	14.4	20.2	5.1			
ÁGUA			8.0	0.0	516.2	>4839.2	61.0	1297.6	ÁGUA			128.0	24.0	>4839.2	>4839.2	2406.6	4839.2			

* Transecto 1 - 50 m ao sul do sistema de drenagem de águas pluviais; transecto 2 - em frente ao sistema de drenagem de águas pluviais; transecto 3 - 50m ao norte do sistema de drenagem de águas pluviais. **Supra - supralitoral; Medio - mediolitoral; Infra - infralitoral.

Tabela 6 – Densidades de leveduras e *E. coli* em amostras de água e areia coletadas em praias recreacionais do estado do Paraná (UFC ou NMP/100mL para amostras de água e UFC ou NMP/g para amostras de areia).

	Praia	Transecto*	Zona**	Leveduras (UFC/g ou 100 mL)		<i>E. coli</i> (NMP/g ou 100 mL)		Praia	Transecto*	Zona**	Leveduras (UFC/g ou 100 mL)		<i>E. coli</i> (NMP/g ou 100 mL)			
				Inverno	Verão	Inverno	Verão				Inverno	Verão	Inverno	Verão		
MATINHOS (PR)	Praia Mansa	1	SUPRA	5.8	22.5	0.2	2.2	Praia de Leste	1	SUPRA	8.7	18.0	0.2	0.1		
			MEDIO	2.8	0.0	3.7	0.6			MEDIO	8.4	0.9	7.7	1.2		
			INFRA	4.3	34.2	0.7	0.4			INFRA	0.0	10.8	1.3	0.3		
			ÁGUA	20.0	60.0	2239.8	151.6			ÁGUA	4.0	0.0	1226.2	2595.2		
		2	ÁGUA	68.0	128.0	1740.8	98.8		2	ÁGUA	0.0	0.0	615.2	2004.8		
		3	SUPRA	4.2	5.4	0.2	2.0		3	SUPRA	6.1	0.0	0.2	ND		
			MEDIO	5.8	5.4	0.2	0.1			MEDIO	0.0	0.0	0.2	5.1		
			INFRA	3.5	0.0	0.2	7.2			INFRA	0.0	3.6	0.2	1.8		
			ÁGUA	20.0	64.0	3106.2	61.2			ÁGUA	0.0	0.0	370.0	1740.8		
		Praia Central de Matinhos	1	SUPRA	45.6	8.1	262.1		0.1	Balneário Ipanema	1	SUPRA	54.9	>270.0	0.2	7.8
				MEDIO	7.0	0.9	20.6		23.9			MEDIO	5.6	17.1	85.8	1.2
				INFRA	15.6	1.8	12.0		54.7			INFRA	3.4	1.8	16.6	1.1
	ÁGUA			16.0	24.0	3972.6	136.4	ÁGUA	12.0			0.0	449.4	665.6		
	2		ÁGUA	172.0	0.0	3465.8	249.6	2	ÁGUA		16.0	20.0	581.8	440.0		
	3		SUPRA	149.5	1.8	9.6	3.5	3	SUPRA		8.5	133.2	0.2	0.6		
			MEDIO	9.0	4.5	483.4	36.6		MEDIO		11.1	6.3	13.7	5.0		
			INFRA	17.6	5.4	179.6	28.4		INFRA		1.2	2.7	12.5	3.0		
			ÁGUA	68.0	52.0	4839.2	1379.2		ÁGUA		4.0	36.0	186.6	688.8		
	Balneário Flórida		1	SUPRA	19.4	4.5	0.2	10.5	Balneário Shangrilá		1	SUPRA	0.0	6.3	0.7	0.5
				MEDIO	8.2	28.8	45.4	19.0				MEDIO	9.9	7.2	530.9	0.1
				INFRA	3.0	0.9	483.4	19.2				INFRA	2.2	1.8	74.4	12.0
		ÁGUA		16.0	16.0	229.0	310.4	ÁGUA		0.0		4.0	296.4	1376.0		
		2	ÁGUA	0.0	16.0	357.8	>9678.4	2		ÁGUA	0.0	56.0	247.2	898.8		
		3	SUPRA	3.4	8.1	5.0	0.1	3		SUPRA	83.9	0.0	0.2	0.1		
MEDIO			1.7	0.9	0.2	0.1	MEDIO			5.6	3.6	62.8	51.4			
INFRA			2.2	0.0	128.2	9.6	INFRA			1.2	1.8	6.7	9.3			
ÁGUA			4.0	28.0	372.0	134.8	ÁGUA			4.0	48.0	323.2	688.8			

* Transecto 1 - 50 m ao sul do sistema de drenagem de águas pluviais; transecto 2 - em frente ao sistema de drenagem de águas pluviais; transecto 3 - 50m ao norte do sistema de drenagem de águas pluviais. **Supra - supralitoral; Medio - mediolitoral; Infra - infralitoral.

5.2 – Quantificação de leveduras totais

As densidades de leveduras nas amostras de água do mar coletadas variaram de 0 a 172 UFC/100mL (Tabelas 5 e 6). De acordo com Hagler e Ahearn (1987), 6% (2) das amostras de água do Paraná e 6% (2) das amostras do Rio de Janeiro poderiam ser classificadas como eutróficas, uma vez que as mesmas apresentaram contagens superiores a 100 UFC de leveduras por 100mL de água. As vias de introdução de leveduras nestes ambientes aquáticos podem ter sido esgotos, a drenagem de águas pluviais, a ressuspensão de micro-organismos das areias e o aporte de material orgânico terrestre. Não foram observadas diferenças significativas entre as contagens de leveduras nas amostras coletadas no Paraná e as amostras provenientes das praias do Rio de Janeiro, e nem entre estações em nenhum dos estados (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$). Também não foram encontradas correlações significativas entre as concentrações de leveduras e as densidades de coliformes totais e *E. coli* (Spearman, $p > 0,05$), seja quando todos os dados foram analisados em conjunto ou mesmo quando analisados separadamente por praia e estação.

Em relação às amostras de areia, as densidades de leveduras variaram de 0 a 408 UFC/g (Tabelas 5 e 6). No Brasil, não há limites determinados pela legislação vigente para as contagens de leveduras em areias de praias. Tomando como referência o valor máximo admissível de 60 UFC/g sugerido pelo último relatório da Associação Bandeira Azul da Europa (2011), 6% (4) das amostras coletadas no Paraná e 18% (13) das amostras provenientes do Rio de Janeiro poderiam ser consideradas inadequadas para praias de uso recreacional.

Conforme mostrado pelo teste de Kruskal-Wallis, as contagens de leveduras nas amostras de areia não diferiram significativamente entre as estações verão e inverno em nenhum dos estados ($p > 0,05$). Entretanto, as densidades destes micro-organismos apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre as três zonas avaliadas ($p \leq 0,02$). As maiores contagens foram observadas principalmente em amostras de areia da zona supralitoral, seguidas pelas contagens das zonas mediolitoral e infralitoral, respectivamente (Figura 6). Vários outros trabalhos já haviam apontado para a prevalência de leveduras em areias secas da zona supralitoral em detrimento das areias úmidas ou molhadas das demais zonas. Ao

comparar as concentrações de leveduras em areias secas e molhadas coletadas de três praias do sul da Flórida, Vogel e colaboradores (2007) constataram que as areias secas abrigaram significativamente mais leveduras do que as areias molhadas. No Brasil, na avaliação da qualidade sanitária de areias de 16 praias do estado de São Paulo, foram encontrados maiores índices de contaminação por bactérias de origem fecal e por leveduras em areias secas do que em molhadas (SATO et al., 2005). Vieira e colaboradores (2001) também obtiveram maiores concentrações de leveduras em areias secas amostradas em três praias da cidade de Fortaleza, no Ceará.

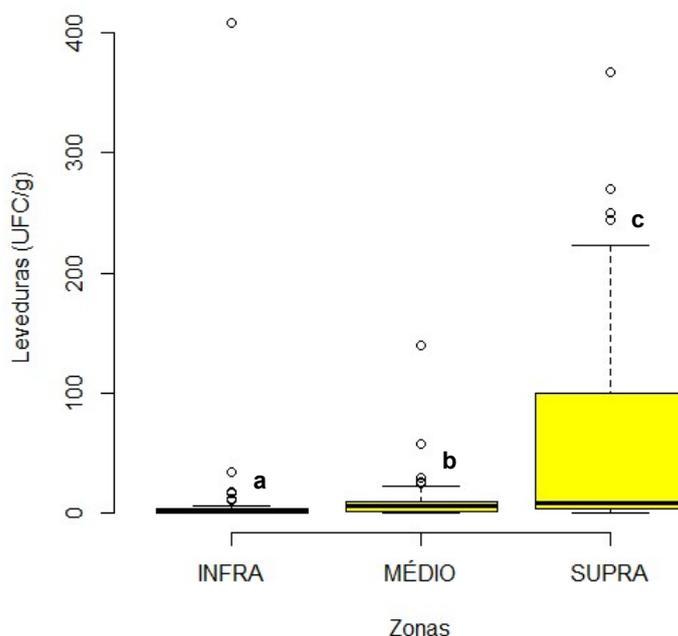


FIGURA 6 – Boxplot das densidades de leveduras em amostras de areia em função das zonas onde estas amostras foram coletadas. As letras acima de cada gráfico indicam a existência ou não de diferenças significativas entre as zonas segundo o teste de Kruskal-Wallis. Locais com letras iguais não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). INFRA – infralitoral; MÉDIO – mediolitoral; SUPRA – supralitoral.

Segundo Mudryk e colaboradores (2013), a observação de maiores contagens de leveduras em amostras de areia da zona supralitoral, a qual não sofre influência das marés, poderia indicar que a principal fonte destes micro-organismos não seria a água do mar, mas sim a entrada de contaminantes terrestres, o escoamento de águas pluviais e os próprios usuários das praias. Além disso, nas areias secas, fungos e bactérias estão sujeitos à menor predação, uma vez que os organismos predadores podem não ser ativos neste ambiente devido ao conteúdo

reduzido de água (BONILLA et al, 2007). Já a abundância reduzida de leveduras nas zonas mediolitoral e infralitoral poderia ainda ser explicada pelo efeito diluidor exercido pela água do mar durante os ciclos das marés (SATO et al., 2005).

Assim como para as amostras de água, não foram encontradas correlações significativas entre as contagens de leveduras e as densidades de coliformes e *E. coli* nas amostras de areia (Spearman, $p > 0,05$) mesmo quando as estações e praias foram analisadas separadamente. Uma vez que as leveduras foram mais abundantes na zona supralitoral e as bactérias indicadoras foram prevalentes nas zonas de areia úmida e molhada, é possível sugerir a existência de diferentes fontes de contaminação para estes micro-organismos.

5.3 – Parâmetros físico-químicos

Os valores médios dos parâmetros físico-químicos avaliados no presente trabalho são mostrados na tabela 7. Todas as amostras de água coletadas no Rio de Janeiro e no Paraná, em ambas as estações, apresentaram um pH levemente alcalino, variando de 7,53 a 8,27. Os pHs das amostras de areia foram mensurados apenas para as amostras coletadas nas praias do Rio de Janeiro e oscilaram entre 6,84 e 7,55. Loureiro e colaboradores (2005) encontraram resultados similares na avaliação de amostras de água e areia coletadas em duas praias de Olinda, Pernambuco. Os valores de pH observados pelos autores ficaram entre 7,6 e 8,2 para todas as amostras analisadas. O pH das águas coletadas em uma praia de Miami, Flórida (E.U.A.), também foram próximos aos do presente trabalho variando entre 7,4 e 8,2 (ABDELZAHER et al., 2010).

De acordo com o teste estatístico de Spearman, não foram encontradas correlações entre as densidades de coliformes totais, *E. coli* e leveduras e os valores de pH das areias coletadas nas praias do Rio de Janeiro ($p > 0,05$). Já para as amostras de água coletadas em ambos estados e estações, foram observadas correlações negativas significativas entre as contagens de *E. coli* e o pH ($p < 0,001$). Para as leveduras também também houve uma correlação negativa com o pH, mas apenas nas amostras de água provenientes do Paraná ($p = 0,003$).

A salinidade média das águas do Rio de Janeiro foi de 38‰ para as amostras coletadas durante o verão e de 35‰ para as coletadas durante o inverno. Em relação às amostras de areia, a salinidade girou em torno de 10,4‰ em ambas as

estações. No Paraná, a salinidade média das águas foi de 34‰ e 32‰ para as amostras coletadas durante o verão e o inverno, respectivamente. Abdelzaher e colaboradores (2010) observaram valores de salinidade entre 31,5‰ e 32,8‰ para as amostras de água do mar coletadas em uma praia subtropical de Miami. Em outras duas praias de Miami, a salinidade média das amostras de água coletadas girou em torno de 30‰ na estação chuvosa e em torno de 34‰ na estação seca (SHIBATA et al., 2004).

Nas amostras de areia coletadas no Rio de Janeiro não foram observadas correlações entre as concentrações de micro-organismos e a salinidade (Spearman, $p > 0,05$). Quanto às amostras de água, levando-se em consideração todos os períodos de coleta, foram encontradas correlações significativas negativas entre as densidades de leveduras e a salinidade tanto no Paraná quanto no Rio de Janeiro ($p \leq 0,03$). Entretanto, quando os dados de ambos estados foram avaliados em conjunto esta correlação não pode ser observada. Foram encontradas correlações positivas em outras duas situações específicas: entre coliformes totais e salinidade nas águas coletadas no Rio de Janeiro ($p = 0,03$) e entre *E. coli* e salinidade nas águas coletadas em ambos os estados estudados ($p < 0,001$).

Considerando as coletas realizadas tanto no verão quanto no inverno, observou-se uma variação de temperatura para as amostras de água de 23 a 25°C nas praias do Rio de Janeiro e de 21,5 a 29°C nas praias do Paraná. No trabalho realizado por Loureiro e colaboradores (2005), as amostras de água coletadas apresentaram temperaturas entre 24,3 e 29,4°C. As temperaturas das areias coletadas no presente trabalho foram mensuradas apenas no verão no Paraná e em ambas as estações no Rio de Janeiro e oscilaram de 23 a 40°C. As temperaturas mais altas foram observadas na zona supralitoral das praias, onde a média foi de 31°C. Já a zona infralitoral apresentou as menores temperaturas com média de 26,8°C.

Nas areias do Rio de Janeiro, as densidades de coliformes totais e *E. coli* se correlacionaram de forma negativa com a temperatura ($p \leq 0,006$). Já nas amostras de água deste estado, observou-se uma associação positiva entre temperatura e contagens de leveduras ($p = 0,04$). Outras relações significativas entre os parâmetros microbiológicos e as temperaturas das amostras de água e areia coletadas não foram observadas.

Independentemente dos resultados encontrados durante os testes de correlação de Spearman, é importante salientar que um único parâmetro físico-químico não é capaz de explicar sozinho as densidades de bactérias e leveduras encontradas nas águas e areias das praias avaliadas. Existem diversos outros fatores característicos de um local particular que contribuem simultaneamente para a seleção dos micro-organismos daquele ambiente. Assim, nem sempre uma correlação encontrada em um sítio amostral é observada novamente em outro ponto de coleta similar.

Tabela 7 – Valores médios de pH, salinidade e temperatura das amostras de água e areia coletadas em praias dos estados do Rio de Janeiro e Paraná.

Estado	Zona	Inverno			Estado	Zona	Verão		
		pH	Salinidade	Temperatura			pH	Salinidade	Temperatura
Rio de Janeiro	SUPRA	7.4	10.0‰	28.3°C	Rio de Janeiro	SUPRA	7.2	10.6‰	33.7 °C
	MEDIO	7.2	10.0‰	27.3°C		MEDIO	7.2	10.6‰	31.9 °C
	INFRA	7.4	10.3‰	24.9°C		INFRA	7.2	10.9‰	25.7 °C
	ÁGUA	7.9	35.4‰	24.1°C		ÁGUA	7.9	38.4‰	23.1 °C
Paraná	SUPRA	ND*	ND	ND	Paraná	SUPRA	ND	ND	31.1 °C
	MEDIO	ND	ND	ND		MEDIO	ND	ND	30.1 °C
	INFRA	ND	ND	ND		INFRA	ND	ND	29.9 °C
	ÁGUA	8.2	32.2‰	21.6°C		ÁGUA	8.0	34.0‰	26.8 °C

*ND – não determinado

5.4 – Isolamento e identificação de leveduras crescidas em Chromagar-Candida

A partir das amostras de água e areia coletadas foram isoladas 471 leveduras em CHROMagar-Candida. O total de leveduras recuperadas no inverno foi maior que o total obtido no verão, tanto nas praias do Rio de Janeiro quanto nas praias do Paraná (Tabela 8). As altas temperaturas atingidas no verão podem ter contribuído para a diminuição da ocorrência de espécies mais sensíveis ao calor, principalmente nas areias. Além disso, no verão, é maior a incidência de luz solar e radiação ultravioleta que pode ter efeito fungicida para algumas espécies de leveduras (DEAK, 2006).

Tabela 8 - Número de leveduras isoladas em meio Chromagar-Candida

	Rio de Janeiro		Paraná		TOTAL
	Inverno	Verão	Inverno	Verão	
Areia	171	46	84	31	332
Água	55	24	44	16	139
TOTAL: 471					

CHROMagar-Candida é um meio de cultivo diferencial e cromogênico inicialmente desenvolvido para auxiliar na rápida distinção de espécies de importância médica como *C. albicans*, *C. tropicalis* e *P. kudriavzevii* (= *C. krusei*). Este meio tem sido utilizado com relativo sucesso em análises de amostras clínicas (PFALLER et al., 1996; RIBEIRO et al., 2009; ESTRADA-BARRAZA et al., 2011). Entretanto, como a diversidade de micro-organismos presentes na natureza é muito maior do que aquela associada a humanos, colônias de uma grande variedade de cores, tamanhos e texturas foram obtidas no presente trabalho (Figura 7).

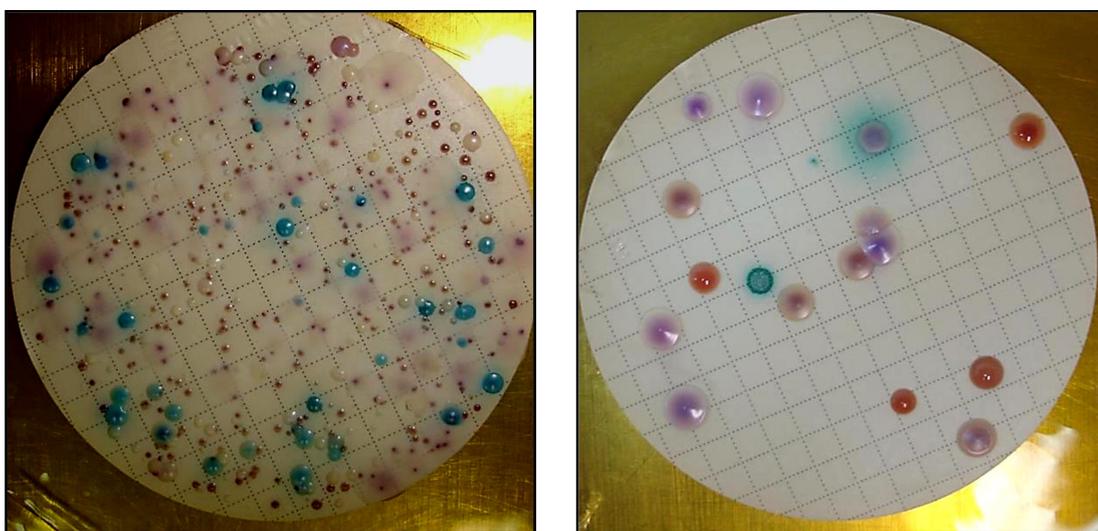


FIGURA 7 – Colônias de leveduras crescidas sobre membranas de nitrocelulose utilizando o meio CHROMagar-Candida durante o processo de isolamento.

Em teoria, as colônias de coloração verde em CHROMagar-Candida deveriam pertencer à espécie *C. albicans*, as de coloração azul à espécie *C. tropicalis* e as de coloração rósea ou púrpura à espécie *P. kudriavzevii*. Entretanto, dentre os 37 isolados que apresentaram colônias verdes, apenas dois foram confirmados como *C. albicans* e os demais como pertencentes a outras espécies como *C. akabanensis*, *Lodderomyces elongisporus* e *T. asahii*. Dentre as 47 leveduras com colônias azuis, oito foram identificadas como *C. tropicalis*. Dentre os 173 isolados com colônias róseas ou púrpuras cremosas, apenas cinco eram *P. kudriavzevii*. Estes resultados mostram a limitação da utilização de CHROMagar-Candida como um meio diferencial no isolamento de leveduras a partir de amostras ambientais.

Todas as leveduras isoladas foram identificadas como pertencentes a 96 diferentes espécies e 34 gêneros (Tabela 9). *Candida parapsilosis* foi a mais

prevalente, seguida de *R. mucilaginosa* e *M. guilliermondii* (= *C. guilliermondii*), respectivamente. *C. parapsilosis* é uma levedura oportunista emergente cuja importância vem aumentando drasticamente nas últimas duas décadas. Esta espécie está associada a infecções nosocomiais sérias, sendo considerada a segunda espécie de *Candida* mais isolada a partir de amostras de sangue na Europa e na América Latina e a terceira na América do Norte (MESSER et al., 2006; TROFA et al., 2008). Muitas infecções por *C. parapsilosis* acontecem devido à capacidade desta levedura de contaminar soluções de nutrição parenteral e formar biofilmes em cateteres e outros dispositivos implantados. Além disso, há trabalhos relatando a ocorrência de enfermidades por causa da disseminação desta levedura por meio das mãos dos profissionais de saúde e da persistência da mesma no ambiente hospitalar. *C. parapsilosis* afeta principalmente indivíduos gravemente doentes de unidades de terapia intensiva, recém-nascidos e pacientes com câncer (CLARK et al., 2004; TROFA et al., 2008; SABINO et al., 2010). Além de ser um fungo comensal comum de humanos, esta espécie tem sido recuperada esporadicamente a partir de uma variedade de outros substratos e locais como animais domésticos, insetos, solo e ambientes marinhos (KURTZMAN et al., 2011). *R. mucilaginosa* e *M. guilliermondii* são leveduras que se encontram amplamente distribuídas na natureza e que também têm chamado a atenção como oportunistas nos últimos anos. Enquanto a primeira espécie está associada principalmente a fungemias ligadas a cateteres, endocardites, peritonites, meningites e endofitalmite, a segunda é frequentemente relacionada a fungemias e infecções profundas em pacientes com câncer (TUON & COSTA, 2008; SAVINI et al., 2010).

Além das leveduras predominantes supracitadas, outras 35 espécies isoladas no presente trabalho podem ser consideradas patogênicas ou oportunistas emergentes (Tabela 9). *Aureobasidium pullulans*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. haemulonii*, *C. othopsilosis*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus laurentii*, *K. ohmeri*, *L. elongisporus*, *P. kudriavzevii* e espécies de *Trichosporon* são algumas delas (MICELLI et al., 2011; BRANDT & LOCKHART, 2012). Os isolados de *Candida* e *Cr. laurentii* são descritos como agentes causadores de infecções fúngicas invasivas (MICELI et al., 2011). *A. pullulans* já foi associado a várias enfermidades, especialmente em indivíduos imunocomprometidos. Dentre os casos envolvendo *A. pullulans* pode-se citar: abscesso no baço, infecção pulmonar invasiva, fungemia,

peritonite, pneumonia, meningite, úlcera de córnea, infecção relacionada a cateter e asma (CHAN et al., 2011). A espécie *K. ohmeri* foi recentemente identificada como agente etiológico de fungemias, endocardites, celulites e peritonites em pacientes imunocomprometidos (SHAABAN et al., 2010). O gênero *Trichosporon* foi reconhecido por muitos anos por causar *Piedra branca*, uma infecção fúngica da cutícula do pêlo. Entretanto, casos de tricosporonoses invasivas têm sido frequentemente relatados e o gênero é atualmente considerado o segundo mais comum em infecções disseminadas por leveduras (CHAGAS-NETO et al., 2008). A presença destes micro-organismos potencialmente patogênicos nas águas e areias das praias expõe os banhistas ao contato direto, aumentando assim o risco de infecção, principalmente em pessoas em extremos de idade ou que possuem o sistema imunológico comprometido.

Alguns autores associam a prevalência de espécies oportunistas de *Candida* em águas naturais com a poluição decorrente de atividades ligadas ao homem e propõem o uso destas leveduras como indicadores de qualidade ambiental (SHERRY & QURESCHI, 1981; VOGEL et al., 2007). Assim, as espécies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *M. guilliermondii* e *P. kudriavzevii* foram avaliadas quanto à existência de alguma correlação com a bactéria indicadora *E. coli* nas amostras de água e areia coletadas. Para as águas, *E. coli* apresentou uma correlação positiva apenas com a espécie *C. parapsilosis* ($p=0,03$). Entretanto, quando os dados foram testados separadamente por estado e/ou estação, nenhuma relação foi observada. Em relação às amostras de areia, não houve correlações significativas entre *E. coli* e as espécies oportunistas de *Candida*, com exceção para *C. parapsilosis* nas praias do Paraná no inverno ($p=0,03$). Estes resultados apontam para a importância da utilização de outros parâmetros microbiológicos no monitoramento da qualidade das praias uma vez que mostrou que certos patógenos não podem ser preditos pelo indicador convencional *E. coli*.

Foi observada uma incidência muito baixa de *C. albicans* no presente trabalho, já que esta espécie ocorreu em apenas duas das 144 amostras de areia e em nenhuma amostra de água. Resultados similares têm sido relatados por outros autores. Sabino e colaboradores (2011) detectaram *C. albicans* em apenas 0,8% das amostras de areia coletadas durante um período de cinco anos de 33 diferentes praias de Portugal. Dentre as 292 amostras de areia e água avaliadas de duas

praias de Olinda, esta levedura foi recuperada de apenas uma amostra de areia (LOUREIRO et al., 2005). Isto pode ter ocorrido porque *C. albicans* possui sobrevivência limitada no ambiente, uma vez que não é boa competidora e sofre com os antagonismos microbianos (HAGLER & AHEARN, 1987).

Tabela 9 – Espécies de leveduras isoladas em Chromagar-Candida a partir de amostras de água e areia coletadas em praias dos estados do Rio de Janeiro e Paraná com as respectivas ocorrências e contagens (densidades em UFC/100mL para as amostras de água e em UFC/g para as amostras de areia).

Espécie*	Ocorrência (número de amostras)	Rio de Janeiro**				Paraná**			
		Inverno		Verão		Inverno		Verão	
		Areia	Água	Areia	Água	Areia	Água	Areia	Água
<i>Candida (Lodderomyces) parapsilosis</i>	52	15 (1.1 – 193.9)	9 (4.0 - 16.0)	3 (1.6 -8.7)	4 (4.0 - 8.0)	6 (0.8 - 6.9)	10 (4.0 - 36.0)	3 (1.8)	2 (4.0 - 36.0)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	51	19 (0.8 - 101.6)	10 (4.0 - 28.0)		3 (8.0 - 52.0)	11 (0.9 - 12.9)	5 (4.0 - 12.0)	2 (0.9)	1 (4.0)
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	32	11 (1.0 - 9.8)	3 (4.0)	3 (0.8 - 4.7)	1 (4.0)	3 (2.0 - 64.4)		5 (0.9 - 8.1)	6 (4.0 - 44.0)
<i>Meyerozyma caribbica</i>	28	8 (0.9 - 51.8)	1 (4.0)	8 (0.8 - 8.5)	2 (4.0 - 8.0)	7 (0.8 - 83.7)	1 (4.0)		
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	16	11 (1.0 - 10.4)		4 (0.8 - 2.4)		1 (1.0)			
<i>Candida (Lodderomyces) tropicalis</i>	15	2 (1.2 - 155.7)		6 (0.8 - 12.7)	3 (4.0 - 12.0)	2 (0.8 - 1.7)		2 (9.0 - 52.2)	
<i>Candida (Metschnikowia) intermedia</i>	14	5 (1.2 - 20.7)	1 (32.0)			1 (1.0)	1 (4.0)	5 (0.9 - 5.4)	1 (4.0)
<i>Kodamaea ohmeri</i>	14	8 (1.0 - 21.7)	2 (4.0)		1 (4.0)	3 (0.9 - 1.1)			
<i>Candida (Lodderomyces) metapsilosis</i>	10	1 (1.0)		2 (0.8 - 3.1)		6 (0.9 - 1.0)	1 (8.0)		
<i>Candida (Lodderomyces) orthopsilosis</i>	10	5 (1.2 - 18.7)	1 (8.0)	1 (0.8)	1 (4.0)	1 (0.8)	1 (4.0)		
<i>Aureobasidium pullulans</i>	9	8 (1.0 - 6.2)				1 (1.7)			
<i>Candida (Metschnikowia) haemulonii</i>	8		4 (4.0 - 56.0)		1 (4.0)	1 (0.8)	2 (4.0)		
<i>Cryptococcus (Bulleromyces) aureus</i>	8	3 (1.0 - 12.0)				3 (0.9 - 15.2)	2 (4.0 - 16.0)		
<i>Debaryomyces nepalensis</i>	8	8 (1.0 - 113.1)							
<i>Rhodospidium diobovatum</i>	8	5 (1.1 - 8.0)				3 (0.8 – 5.2)			
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	7	5 (1.2 - 18.9)		1 (0.8)				1 (0.9)	
<i>Trichosporon asahii</i>	7	3 (1.2 - 13.8)	1 (4.0)			3 (0.8 - 1.0)			
<i>Pichia kudriavzevii</i>	6	3 (1.0 – 48.0)		2 (1.6 - 6.3)		1 (1.1)			
<i>Candida (Metschnikowia) pseudointermedia</i>	6	4 (0.9 - 9.6)	2 (4.0)						
<i>Candida (Pichia) pseudolambica</i>	6	1 (16.0)				2 (1.0 - 3.4)	2 (4.0)		1 (4.0)
<i>Clavispora lusitanae</i>	6	2 (1.2 - 17.2)		3 (0.8 - 1.6)		1 (0.9)			
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	6	3 (0.8 - 1.2)	1 (4.0)			1 (0.9)	1 (4.0)		
<i>Candida catenulata</i>	5	3 (2 - 5.8)	1 (4.0)			1 (0.9)			
<i>Cryptococcus (Bulleromyces) laurentii</i>	5	3 (0.9 - 13.0)				1 (1.2)		1 (1.8)	

* Espécies destacadas em vermelho correspondem a leveduras que apresentam alguma relevância clínica, sendo consideradas patogênicas ou oportunistas.

** O primeiro número representa o número de amostras em que a espécie ocorreu. Os valores entre parênteses mostram a variação entre a menor e a maior contagem da espécie naquele tipo de amostra.

Tabela 9 – Continuação.

Espécie*	Ocorrência (número de amostras)	Rio de Janeiro**				Paraná**			
		Inverno		Verão		Inverno		Verão	
		Areia	Água	Areia	Água	Areia	Água	Areia	Água
<i>Rhodosporidium paludigenum</i>	5	2 (1.0 - 1.1)	1 (4.0)			2 (0.9 - 13.5)			
<i>Trichosporon faecale</i>	5	1 (1.0)		2 (0.8 - 2.4)				1 (5.4)	1 (4.0)
<i>Candida (Metschnikowia) akabanensis</i>	4	3 (1.0 - 4.8)							1 (12.0)
<i>Cryptococcus (Bulleromyces) flavescens</i>	4	1 (1.1)				2 (1.2 - 1.7)		1 (0.9)	
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	4	2 (0.0 - 8.8)	1 (8.0)					1 (11.7)	
<i>Trichosporon dermatis</i>	4	1 (3.6)			1 (4.0)		1 (4.0)	1 (0.9)	
<i>Wickerhamomyces sydowiorum</i>	4	2 (0.9 - 1.0)					2 (4.0 - 12.0)		
<i>Candida (Saturnispora) silvae</i>	3	1 (15.2)					1 (24.0)		1 (0.9)
<i>Candida (Yamadazyma) spencermartinsiae</i>	3		1 (8.0)					2 (0.9 - 2.7)	
<i>Debaryomyces hansenii</i>	3					1 (0.8)	2 (8.0)		
<i>Exophiala dermatitidis</i>	3	2 (1.0 - 1.2)		1 (1.0)					
<i>Nakazawaea siamensis</i>	3	1 (2.1)				1 (0.8)	1 (4.0)		
<i>Torulaspora delbruecki</i>	3	2 (4.4 - 6.4)							1 (4.0)
<i>Trichosporon coremiiforme</i>	3	3 (1.2 - 4.8)							
<i>Trichosporon debeurmannianum</i>	3		2 (4.0)		1 (4.0)				
<i>Ustilago spermophora</i>	3					3 (1.1 - 8.9)			
<i>Yarrowia lipolytica</i>	3					3 (1.1 - 3.0)			
<i>Candida (Lodderomyces) albicans</i>	2	1 (1.0)				1 (0.9)			
<i>Candida (Yamadazyma) conglobata</i>	2	1 (0.8)						1 (34.2)	
<i>Candida (Metschnikowia) duobushaemulonii</i>	2		2 (60.0)						
<i>Candida (Kurtzmaniella) natalensis</i>	2	1 (1.6)		1 (1.1)					
<i>Candida neorugosa</i>	2			2 (1.1)					
<i>Candida (Meyerozyma) neustonensis</i>	2			2 (1.1 - 24.1)					
<i>Candida (Barnettomyza) norvegica</i>	2							2 (2.7 - 3.6)	
<i>Candida pararugosa</i>	2			1 (0.8)	1 (4.0)				

* Espécies destacadas em vermelho correspondem a leveduras que apresentam alguma relevância clínica, sendo consideradas patogênicas ou oportunistas.

** O primeiro número representa o número de amostras em que a espécie ocorreu. Os valores entre parênteses mostram a variação entre a menor e a maior contagem da espécie naquele tipo de amostra.

Tabela 9 – Continuação.

Espécie*	Ocorrência (número de amostras)	Rio de Janeiro**				Paraná**			
		Inverno		Verão		Inverno		Verão	
		Areia	Água	Areia	Água	Areia	Água	Areia	Água
<i>Candida phangngensis</i>	2					1 (4.0)	1 (1.8)		
<i>Candida sorboxylosa</i>	2	1 (8.0)	1 (28.0)						
<i>Candida suratensis</i>	2	2 (2.9 - 7.3)							
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	2					1 (3.3)	1 (4.0)		
<i>Kazachstania exigua</i>	2		1 (36.0)				1 (22.0)		
<i>Wickerhamomyces onychis</i>	2		2 (4.0)						
<i>Rhodotorula taiwanensis</i>	2					2 (2.0 - 3.3)			
<i>Trichosporon montevideense</i>	2	1 (2.0)					1 (4.0)		
<i>Trichosporon terricola</i>	2			1 (0.8)				1 (5.4)	
<i>Wickerhamiella</i> sp. 1	2	1 (0.8)	1 (12.0)						
<i>Wickerhamiella</i> sp. 2	2	2 (1.0 - 2.4)							
<i>Bandoniozyma complexa</i>	1	1 (2.2)							
<i>Barnettozyma californica</i>	1					1 (1.1)			
<i>Candida blattae</i>	1	1 (1.2)							
<i>Candida (Nakaseomyces) glabrata</i>	1		1 (8.0)						
<i>Candida (Kazachstania) humilis</i>	1						1 (4.0)		
<i>Candida mengyuniae</i>	1				1 (4.0)				
<i>Candida (Yamadazyma) michaelii</i>	1		1 (4.0)						
<i>Candida rugosa</i>	1				1 (4.0)				
<i>Cryptococcus liquefaciens</i>	1		1 (8.0)						
<i>Cryptococcus (Bulleromyces) rajasthanensis</i>	1					1 (0.8)			
<i>Cyberlindnera fabianii</i>	1							1 (11.7)	
<i>Debaryomyces fabryi</i>	1					1 (2.0)			
<i>Hannaella luteola</i>	1					1 (1.7)			
<i>Hanseniaspora occidentalis</i>	1						1 (4.0)		

* Espécies destacadas em vermelho correspondem a leveduras que apresentam alguma relevância clínica, sendo consideradas patogênicas ou oportunistas.

** O primeiro número representa o número de amostras em que a espécie ocorreu. Os valores entre parênteses mostram a variação entre a menor e a maior contagem da espécie naquele tipo de amostra.

Tabela 9 – Continuação.

Espécie*	Ocorrência (número de amostras)	Rio de Janeiro**				Paraná**			
		Inverno		Verão		Inverno		Verão	
		Areia	Água	Areia	Água	Areia	Água	Areia	Água
<i>Pichia terricola</i>	1					1 (3.3)			
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1			1 (0.8)					
<i>Kodamaea</i> sp.	1	1 (2.2)							
<i>Lachancea kluyveri</i>	1					1 (4.0)			
<i>Metschnikowia</i> sp. 1	1	1 (10.8)							
<i>Metschnikowia</i> sp. 2	1					1 (16.0)			
<i>Pichia kluyveri</i>	1					1 (8.0)			
<i>Pichia norvegensis</i>	1					1 (1.0)			
<i>Rhodotorula minuta</i>	1			1 (1.0)					
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	1					1 (0.9)			
<i>Sporobolomyces (Sporidiobolus) carnicolor</i>	1					1 (0.8)			
<i>Sporobolomyces (Sporidiobolus) japonicus</i>	1					1 (0.9)			
<i>Sporopachydermia lactativora</i>	1				1 (8.0)				
<i>Trichosporon cacaoliposimilis</i>	1			1 (0.8)					
<i>Trichosporon inkin</i>	1				1 (4.0)				
<i>Trichosporon japonicum</i>	1		1 (4.0)						
<i>Yamadazyma</i> sp. 1	1								1 (2.7)
<i>Yamadazyma</i> sp. 2	1				1 (4.0)				
<i>Wickerhamiella</i> sp. 3	1				1 (4.0)				
<i>Wickerhamiella</i> sp. 4	1						1 (16.0)		
<i>Wickerhamomyces</i> sp.	1						1 (4.0)		
<i>Zygoascus</i> sp.	1		1 (4.0)						

* Espécies destacadas em vermelho correspondem a leveduras que apresentam alguma relevância clínica, sendo consideradas patogênicas ou oportunistas.

** O primeiro número representa o número de amostras em que a espécie ocorreu. Os valores entre parênteses mostram a variação entre a menor e a maior contagem da espécie naquele tipo de amostra.

5.5 – Isolamento e identificação de leveduras crescidas em ágar mCA

Foram isoladas em ágar mCA 74 leveduras (Tabela 10) com colônias marrons típicas de *C. albicans* (Figura 8). Buck e Bubucis (1978) propuseram o uso deste meio seletivo e diferencial em um trabalho que avaliou a recuperação de *C. albicans* de águas de rios, estuários, mares e estações de tratamento de esgoto. Os autores confirmaram 90% das colônias típicas como pertencentes a esta espécie e observaram que dentre as colônias falso-positivas, *C. tropicalis* e *C. saitoana* foram as espécies mais comuns. Entretanto, no presente trabalho, após a identificação por meio de sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA, apenas três isolados (4%) foram confirmados como *C. albicans*. Resultados similares foram obtidos por Cook e Schlitzer (1981) ao utilizar o meio em questão com o objetivo de recuperar esta levedura de amostras de rios e esgotos. Embora a maioria das colônias crescidas no meio mCA tenham se assemelhado às de *C. albicans*, os autores confirmaram como pertencentes a tal espécie apenas 3% dos isolados a partir das águas de rios e 8% dos isolados a partir de efluentes de esgoto. Hagler e Mendonça-Hagler (1981) também não obtiveram êxito na tentativa de isolar *C. albicans* em ágar mCA a partir de águas marinhas e estuarinas com diferentes níveis de poluição no estado do Rio de Janeiro.

Tabela 10 - Número de leveduras isoladas em meio ágar mCA

Número de leveduras isoladas em ágar mCA					
	Rio de Janeiro		Paraná		TOTAL
	Inverno	Verão	Inverno	Verão	
Areia	21	9	20	8	58
Água	1	4	6	5	16
TOTAL: 74					

Apesar de mCA ter sido sugerido como um meio seletivo para *C. albicans* com incubação a 37°C, no presente trabalho foram isoladas neste meio outras 25 espécies pertencentes a 11 gêneros (Tabela 11). Assim, pode-se inferir que o ágar mCA possui restrições quanto à proposta inicial de seletividade para *C. albicans*. Uma opção que ajudaria a reduzir o isolamento de leveduras pertencentes a outras espécies seria aumentar a temperatura de incubação para 42°C.

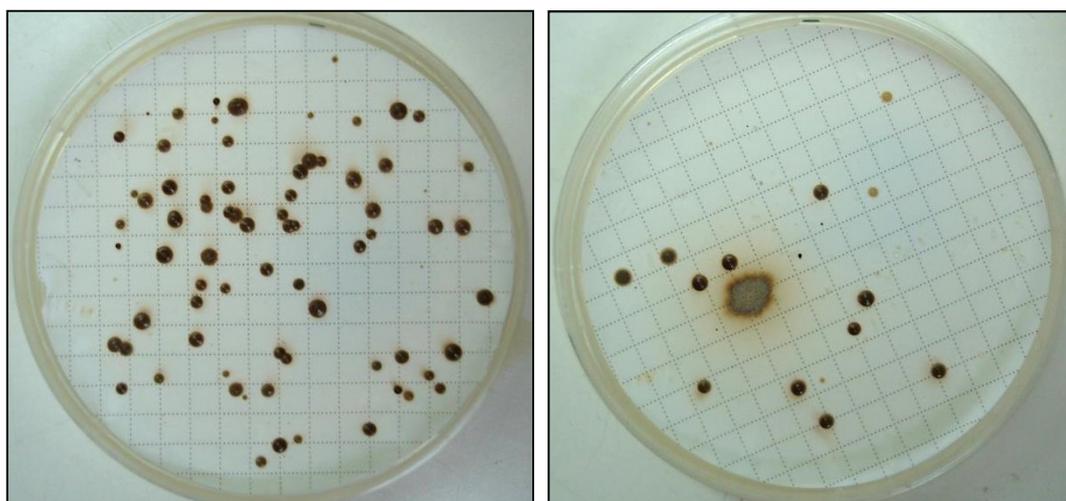


FIGURA 8 – Colônias de leveduras crescidas sobre membranas de nitrocelulose utilizando o meio mCA durante o processo de isolamento.

Candida tropicalis, *L. elongisporus*, *M. guilliermondii*, *Hortaea werneckii*, *Exophiala spinifera*, *T. asahii* e *Yarrowia lipolytica* foram algumas das leveduras oportunistas identificadas além de *C. albicans* no meio mCA (Tabela 11). As espécies *C. tropicalis*, *M. guilliermondii* e *T. asahii* têm sido associadas a infecções fúngicas invasivas (MICELI, 2011). *L. elongisporus* foi descrito como causa de infecções nosocomiais em oito pacientes do México e dois da Ásia (LOCKHART et al., 2008). *E. spinifera* é um fungo raro que causa cromoblastomicose ou diferentes tipos de feohifomicose e tem sido relatado como causa de doenças não apenas em pacientes imunossuprimidos, mas também em imunocompetentes (SINGH et al., 2012). *H. werneckii* é descrito como agente causador de uma dermatomicose conhecida como *Tinea negra* que se localiza nas palmas das mãos e na planta dos pés e se caracteriza pela presença de máculas pigmentadas, marrons ou pretas (SAUNTE et al., 2011). *Y. lipolytica* tem sido ocasionalmente isolada de amostras clínicas, sendo considerada um patógeno emergente (GROENEWALD et al., 2013). A variedade de possíveis enfermidades causadas por leveduras identificadas no presente trabalho aponta para um risco potencial à saúde dos banhistas que mantêm contato direto com as águas e areias das praias analisadas.

Tabela 11 – Espécies de leveduras isoladas em ágar mCA a partir de amostras de água e areia coletadas em praias dos estados do Rio de Janeiro e Paraná com as respectivas ocorrências e contagens (densidades em UFC/100mL para as amostras de água e em UFC/g para as amostras de areia).

Espécie	Ocorrência (número de amostras)	Rio de Janeiro**				Paraná**			
		Inverno		Verão		Inverno		Verão	
		Areia	Água	Areia	Água	Areia	Água	Areia	Água
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	15	12 (0.8 - 44.6)		1 (0.8)		1 (2.5)		1 (63.0)	
<i>Candida (Lodderomyces) tropicalis</i>	13	2 (1.2 - 2.1)		3 (0.8 - 3.9)		2 (4.0)		2 (0.9 - 3.4)	
<i>Meyerozyma caribbica</i>	8	1 (3.6)		4 (0.8 - 8.7)		1 (4.0)		2 (0.9)	
<i>Yarrowia lipolytica</i>	5	3 (2.1 - 13.8)				2 (1.0 - 3.4)			
<i>Candida (Ogataea) cylindracea</i>	4	1 (1.0)		1 (8.0)		1 (7.7)		1 (4.0)	
<i>Candida (Lodderomyces) albicans</i>	3	1 (1.0)						1 (4.0)	
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	3	1 (1.0)				1 (4.0)		1 (0.9)	
<i>Candida phangnensis</i>	2					1 (1.7)		1 (4.5)	
<i>Candida (Nakazawaea) pomicola</i> - similar	2							2 (4.0)	
<i>Exophiala spinifera</i>	2					2 (1.7)			
<i>Hortaea werneckii</i>	2					1 (3.7)		1 (4.0)	
<i>Candida blankii</i>	1			1 (0.8)					
<i>Candida (Ogataea) boidinii</i>	1					1 (0.9)			
<i>Candida (Wickerhamiella) infanticola</i>	1							1 (1.0)	
<i>Candida nonsorbophila</i> - similar	1					1 (0.9)			
<i>Candida (Sugiyamaella) polysorbophila</i>	1					1 (2.2)			
<i>Candida (Wickerhamiella) sorbophila</i>	1							1 (16.0)	
<i>Candida (Lodderomyces) viswanathii</i>	1							1 (0.9)	
<i>Exophiala alcalophila</i>	1					1 (0.9)			
<i>Hanseniaspora</i> sp. 1	1							1 (12.0)	
<i>Hanseniaspora</i> sp. 2	1							1 (20.0)	
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	1					1 (1.1)			
<i>Rhodospidium diobovatum</i>	1					1 (0.8)			
<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	1							1 (0.9)	
<i>Trichosporon asahii</i>	1							1 (2.7)	
<i>Wickerhamomyces onychis</i>	1					1 (0.9)			

* Espécies destacadas em vermelho correspondem a leveduras que apresentam alguma relevância clínica, sendo consideradas patogênicas ou oportunistas.

** O primeiro número representa o número de amostras em que a espécie ocorreu. Os valores entre parênteses mostram a variação entre a menor e a maior contagem da espécie naquele tipo de amostra.

5.6 – Teste de sensibilidade de leveduras oportunistas a antifúngicos

Cento e quarenta e quatro leveduras foram submetidas aos testes de susceptibilidade aos antifúngicos fluconazol e itraconazol (Tabela 12). No geral, 16 (11%) linhagens foram resistentes ao fluconazol e 19 (13%) ao itraconazol. Além disso, 21 (15%) leveduras apresentaram sensibilidade dose-dependente ao fluconazol e 47 (33%) ao itraconazol. Já para a anfotericina B, foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas para 137 leveduras (Tabela 12). Embora a maioria tenha sido sensível a esta droga, um número considerável de isolados (29) apresentou resistência. A diferença entre os números de isolados avaliados para cada droga ocorreu devido ao não crescimento de algumas linhagens durante a realização dos testes.

Tabela 12 - Resultado geral dos testes de susceptibilidade a antifúngicos

	Testados	Sensíveis	Dose-dependentes	Resistentes
Fluconazol	144	107 (74%)	21 (15%)	16 (11%)
Itraconazol	144	78 (54%)	47 (33%)	19 (13%)
Anfotericina B	137	108 (79%)	NA*	29 (21%)

*NA – não se aplica

Existem poucos trabalhos que testam a atividade de drogas antifúngicas em relação a leveduras isoladas a partir de amostras ambientais. Brandão e colaboradores (2010) caracterizaram as comunidades de leveduras com crescimento a 37°C presentes em três corpos d'água do município de Lagoa Santa, Minas Gerais, e avaliaram o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos das mesmas. Dentre as 175 leveduras isoladas, cinco (3%) apresentaram resistência ao fluconazol, 35 (20%) ao itraconazol e 38 (22%) à anfotericina B. Medeiros e colaboradores (2008), também avaliaram a sensibilidade a drogas antifúngicas de 68 leveduras isoladas a partir de amostras de sedimentos e águas de lagos e rios do sudeste do Brasil. A maioria das leveduras testadas foi sensível ao fluconazol e à anfotericina B. Em relação ao itraconazol, 50% das leveduras foram resistentes e o restante apresentou sensibilidade dose-dependente.

As leveduras avaliadas no presente trabalho com relação à susceptibilidade aos antifúngicos compreenderam 34 diferentes espécies (Tabela 13). Estas últimas foram selecionadas ou por possuírem relatos clínicos na literatura ou por já terem

sido isoladas a partir de fontes humanas. Vale salientar que em todos os casos foram utilizados os métodos e valores de referência sugeridos para *Candida* spp. (CLSI, 2008), uma vez que não há testes padronizados para as espécies pertencentes aos outros gêneros.

Todas as quatro linhagens de *A. pullulans* avaliadas foram sensíveis ao itraconazol e à anfotericina B. Três destas apresentaram dose-dependência em relação ao fluconazol, enquanto uma foi resistente. Como são raros os casos clínicos envolvendo *A. pullulans*, existem poucos estudos abordando a susceptibilidade deste fungo aos antifúngicos. No geral, os trabalhos apontam para uma boa eficiência das drogas anfotericina B, fluconazol, cetoconazol, itraconazol e flucitosina (PANDA et al., 2006).

Apesar de *C. albicans* ser conhecida por apresentar relativa sensibilidade às drogas azólicas e poliênicas, dentre as cinco linhagens testadas, duas foram resistentes ao itraconazol, sendo que uma destas foi também resistente ao fluconazol. Entretanto, todas foram sensíveis à anfotericina B (KRCMERY & BARNES, 2002). Os resultados encontrados foram similares aos observados em outros trabalhos. Em uma avaliação do perfil de susceptibilidade a antifúngicos de espécies de *Candida* isoladas em um hospital público terciário de Botucatu, São Paulo, dentre 70 linhagens de *C. albicans* testadas, poucas apresentaram resistência ao fluconazol e/ou ao itraconazol, e todas foram sensíveis à anfotericina B (BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010). Em outro estudo realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, todas as 56 linhagens de *C. albicans* avaliadas foram sensíveis ao fluconazol e à anfotericina B, enquanto uma linhagem foi resistente e seis dose-dependentes ao itraconazol (MOTTA et al., 2010). Sardi e colaboradores (2013), ao avaliarem a sensibilidade a antifúngicos de 45 isolados clínicos de *C. albicans*, observaram que apenas quatro foram resistentes à anfotericina B e cinco ao fluconazol.

As espécies não albicans de *Candida* apresentaram variados perfis de susceptibilidade aos antifúngicos. Todas as linhagens avaliadas de *C. catenulata* (3), *C. glabrata* (1), *C. metapsilosis* (1), *C. neorugosa* (2), *C. orthopsilosis* (6), *C. parapsilosis* (9) e *C. pararugosa* (1) foram sensíveis às drogas testadas. As quatro linhagens de *C. cylindracea* isoladas no presente trabalho foram resistentes à anfotericina B, sendo que três destas apresentaram também sensibilidade dose-

dependente ao fluconazol. Além disso, uma foi, ao mesmo tempo, resistente à anfotericina B e dose-dependente ao itraconazol.

Uma dentre as duas linhagens de *C. haemulonii* testadas apresentou resistência aos três antifúngicos, enquanto a outra foi dose-dependente ao itraconazol. O único isolado obtido de *C. duobushaemulonii* apresentou resistência à anfotericina B. *C. haemulonii* e *C. duobushaemulonii* são espécies consideradas multirresistentes a drogas antifúngicas, estando associadas também com falhas terapêuticas (CENDEJAS-BUENO et al., 2012).

Em relação a *C. tropicalis*, foi possível observar um alto índice de resistência aos antifúngicos azólicos. Dentre as 17 linhagens avaliadas, uma foi resistente a todas as três drogas testadas, oito ao fluconazol e itraconazol simultaneamente e uma ao itraconazol e à anfotericina B. Existem muitos trabalhos envolvendo linhagens provenientes de amostras clínicas que mostram uma relativa sensibilidade de *C. tropicalis* aos agentes azólicos e à anfotericina B (PFALLER et al., 2007; NUCCI & COLOMBO, 2007). Entretanto, no trabalho de Medeiros e colaboradores (2008) com leveduras isoladas a partir de águas e sedimentos de lagos e rios, os cinco isolados desta espécie foram resistentes ou dose-dependentes a todas as drogas testadas.

O gênero *Meyerozyma* inclui duas espécies: *M. guilliermondii* e *M. caribbica* (*C. fermentati*). Estas espécies embora sejam geneticamente heterogêneas, apresentam fenótipos indistinguíveis. No geral, estas leveduras mostram uma sensibilidade diminuída ao fluconazol quando comparadas a *C. albicans*. Casos de linhagens dose-dependentes ao itraconazol já foram observados. Embora estas espécies sejam intrinsicamente menos sensíveis à anfotericina B que outras *Candida* oportunistas, a maioria das linhagens apresenta sensibilidade a este antifúngico (SAVINI et al., 2011). No presente trabalho foram testadas sete linhagens de *M. caribbica* e 20 linhagens de *M. guilliermondii*. Seis isolados de *M. caribbica* e 15 de *M. guilliermondii* apresentaram sensibilidade dose-dependente ao itraconazol. Dentre estas, dois isolados de *M. caribbica* e quatro de *M. guilliermondii* foram também dose-dependentes ao fluconazol. Apenas uma linhagem de *M. caribbica* e uma de *M. guilliermondii* apresentaram resistência à anfotericina B. Estes resultados estão de acordo com o perfil de susceptibilidade sugerido por Savini e colaboradores (2011) para estas leveduras.

Quanto a *R. mucilaginosa*, dentre as nove linhagens avaliadas, apenas uma foi sensível a todos os agentes antifúngicos testados. As demais linhagens apresentaram sensibilidade reduzida às drogas azólicas. No trabalho de Medeiros e colaboradores (2008), dentre as quatro leveduras pertencentes a espécie *R. mucilaginosa* testadas quanto à sensibilidade a diferentes antifúngicos, três foram resistentes ao fluconazol e três ao itraconazol. Segundo Pfaller e colaboradores (2007), como esta levedura é frequentemente considerada resistente aos agentes azólicos, a droga de escolha para tratamento de enfermidades causadas pela mesma é a anfotericina B.

Foram testados oito isolados de *T. asahii*, dentre os quais seis foram resistentes à anfotericina B, quatro dose-dependentes ao itraconazol e todos sensíveis ao fluconazol. De um modo geral, os antifúngicos azólicos parecem ser mais ativos contra *T. asahii* do que a anfotericina B (PAPHITOU et al., 2002; RUAN et al., 2009; GUO et al., 2011). Arikan e Hascelik (2002) ao testarem 43 isolados clínicos desta espécie quanto à susceptibilidade a estes antifúngicos, também encontraram elevados valores de CIMs para a anfotericina B e moderada susceptibilidade ao fluconazol e itraconazol.

Todas as seis linhagens de *Y. lipolytica* testadas foram resistentes à anfotericina B e sensíveis ao fluconazol. Dentre estas, quatro foram dose-dependentes ao itraconazol. Os poucos dados disponíveis na literatura a respeito da susceptibilidade aos antifúngicos para *Y. lipolytica* indicam uma prevalência de linhagens sensíveis à anfotericina B e ao fluconazol (BARCHIESI et al., 1999; D'ANTONIO et al., 2002; PFALLER et al., 2007). Entretanto, Diekema e colaboradores (2009) observaram um elevado índice de resistência à anfotericina B dentre isolados clínicos.

No geral, apenas 56 (39%) leveduras foram sensíveis a todas as drogas testadas. As demais foram resistentes ou apresentaram sensibilidade dose-dependente a pelo menos uma droga avaliada. Embora seja difícil avaliar o risco associado aos banhistas que frequentam as praias analisadas no presente trabalho, a presença de linhagens de leveduras oportunistas com diferentes perfis de resistência aos antifúngicos testados sugere um risco, principalmente para indivíduos com algum comprometimento imunológico.

Tabela 13 – Concentração inibitória mínima dos antifúngicos fluconazol, itraconazol e anfotericina B para leveduras associadas a humanos e produção de proteinase por estas últimas.

Espécie	Isolado	Fluconazol* CIM (µg/mL)	Itraconazol* CIM (µg/mL)	Anfotericina B* CIM (µg/mL)	Proteinase**
<i>Aureobasidium pullulans</i>	ECB1S.3	16	0.125	ND***	1+
<i>Aureobasidium pullulans</i>	ECB3S.2	16	0.125	ND	-
<i>Aureobasidium pullulans</i>	EIA1M.4	16	0.0625	ND	-
<i>Aureobasidium pullulans</i>	EIC3S.5	64	0.0625	1	-
<i>Candida albicans</i>	BP1S.12	0.5	0.03125	0.5	2+
<i>Candida albicans</i>	CM1A.1	0.5	0.03125	1	2+
<i>Candida albicans</i>	EIA3M.5	0.25	>16	1	2+
<i>Candida albicans</i>	FIA3M.1	0.5	0.0625	1	2+
<i>Candida albicans</i>	PHM3.1	>64	>16	1	2+
<i>Candida catenulata</i>	BF1M.3	4	0.03125	0.5	2+
<i>Candida catenulata</i>	ECC3A.7	2	0.0156	0.5	2+
<i>Candida catenulata</i>	EIB3S.6	0.5	0.03125	0.0625	-
<i>Candida cylindracea</i>	CP1S.6	16	0.125	4	1+
<i>Candida cylindracea</i>	CP2A.2	16	0.25	8	2+
<i>Candida cylindracea</i>	FIA2A.1	16	0.125	2	-
<i>Candida cylindracea</i>	FIC1S.4	8	0.125	4	2+
<i>Candida duobushaemulonii</i>	ECC2A.7	8	0.125	2	-
<i>Candida glabrata</i>	ECA2A.8	2	0.0625	0.125	2+
<i>Candida haemulonii</i>	BM3M.2	8	0.5	1	-
<i>Candida haemulonii</i>	ECC1A.4	64	16	2	2+
<i>Candida infanticola</i>	CF2A.1	4	0.25	0.5	2+
<i>Candida metapsilosis</i>	HCB1S.4	1	0.0625	0.5	-
<i>Candida neorugosa</i>	BF3I.2	4	0.125	0.5	-
<i>Candida neorugosa</i>	BS1M.2	4	0.125	1	-
<i>Candida orthopsilosis</i>	BI1S.7	4	0.125	0.5	1+
<i>Candida orthopsilosis</i>	ECA1S.7	0.5	0.0625	0.03125	2+
<i>Candida orthopsilosis</i>	EIC1M.1	0.5	0.0625	0.125	-
<i>Candida orthopsilosis</i>	EIC1S.11	1	0.0625	0.0156	-
<i>Candida orthopsilosis</i>	HCC1S.5	0.5	0.03125	0.125	-
<i>Candida orthopsilosis</i>	HCC3A.4	2	0.0625	0.03125	-
<i>Candida parapsilosis</i>	BP2A.1	1	0.0625	1	1+
<i>Candida parapsilosis</i>	ECC3S.8	0.5	0.03125	1	1+
<i>Candida parapsilosis</i>	EIA3A.3	0.5	0.03125	1	1+
<i>Candida parapsilosis</i>	EIB1S.4	0.5	0.03125	0.125	-
<i>Candida parapsilosis</i>	HCB2A.1	0.5	0.03125	0.0625	-
<i>Candida parapsilosis</i>	HCC3A.2	0.25	0.03125	0.03125	-
<i>Candida parapsilosis</i>	HIC1M.2	0.25	0.03125	0.0625	2+
<i>Candida parapsilosis</i>	LHC3.1	0.25	0.03125	0.125	-
<i>Candida parapsilosis</i>	PSsC3.2	0.25	0.03125	0.125	-
<i>Candida pararugosa</i>	SSsC3.3	0.25	0.03125	0.0625	-
<i>Candida tropicalis</i>	BF1S.4	4	16	2	-
<i>Candida tropicalis</i>	BI1S.2	64	16	2	-
<i>Candida tropicalis</i>	CI1M.1	4	0.125	2	-
<i>Candida tropicalis</i>	CI1S.1	0.5	0.03125	1	1+
<i>Candida tropicalis</i>	EIC3M.6	64	16	0.125	-
<i>Candida tropicalis</i>	FCC3S.7	>64	>16	1	-
<i>Candida tropicalis</i>	FIC3S.1	>64	4	1	1+
<i>Candida tropicalis</i>	HCC1S.2a	8	0.0625	0.25	-
<i>Candida tropicalis</i>	HCC1S.2b	0.5	>16	1	1+

* Os valores de CIM destacados por coloração cinza claro correspondem a valores considerados de sensibilidade dose-dependente para a droga em questão. Já os valores destacados por coloração cinza escuro correspondem a valores considerados de resistência para a droga em questão. ** O sinal negativo representa ausência de produção de proteinase. Halo entre 1 e 2mm corresponde a produção 1+, halo >3mm corresponde a produção 2+. *** ND – não determinado.

Tabela 13 – Continuação

Espécie	Isolado	Fluconazol* CIM (µg/mL)	Itraconazol* CIM (µg/mL)	Anfotericina B* CIM (µg/mL)	Proteinase**
<i>Candida tropicalis</i>	ICB1S.1	>64	>16	1	-
<i>Candida tropicalis</i>	ICC1S.2	0.5	0.03125	1	2+
<i>Candida tropicalis</i>	ICC3M.1	0.5	0.03125	0.125	-
<i>Candida tropicalis</i>	IIA3A.1	>64	>16	1	-
<i>Candida tropicalis</i>	IIB1A.1	>64	>16	1	-
<i>Candida tropicalis</i>	ISsC3.1	0.25	0.03125	0.0625	2+
<i>Candida tropicalis</i>	ISsM3.2	>64	>16	1	-
<i>Candida tropicalis</i>	LHM3.1	>64	>16	1	-
<i>Candida viswanathii</i>	PSnM2.1	8	0.25	1	1+
<i>Clavispora lusitanae</i>	EIB1S.7	2	0.25	0.125	2+
<i>Clavispora lusitanae</i>	HIB1S.5	1	0.5	0.5	-
<i>Clavispora lusitanae</i>	HIC3M.6	0.5	0.125	1	-
<i>Cryptococcus laurentii</i>	BS3I.1	2	0.125	0.25	-
<i>Cryptococcus laurentii</i>	EIB3S.8	4	0.03125	0.0156	-
<i>Cryptococcus laurentii</i>	SSsC3.2	2	0.0625	0.03125	2+
<i>Debaryomyces fabryi</i>	BP1M.6	0.25	0.25	2	-
<i>Debaryomyces hansenii</i>	BP2A.5	0.5	0.125	2	2+
<i>Exophiala dermatitidis</i>	ECB1I.3	4	0.03125	0.25	-
<i>Exophiala dermatitidis</i>	HCC1I.2	ND	ND	ND	-
<i>Exophiala spinifera</i>	CP1S.5	32	0.125	ND	-
<i>Exophiala spinifera</i>	CS3S.1	32	0.125	ND	-
<i>Hortaea werneckii</i>	CM1M.3	16	0.03125	ND	ND
<i>Kodamaea ohmeri</i>	B1M.5	2	0.125	1	2+
<i>Kodamaea ohmeri</i>	BP1I.4	4	0.125	0.5	2+
<i>Kodamaea ohmeri</i>	ECC3S.6	4	0.25	0.5	2+
<i>Kodamaea ohmeri</i>	EIC3M.7	8	0.25	1	2+
<i>Kodamaea ohmeri</i>	HIA3A.1	4	0.125	8	2+
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	CP1S.3	0.25	0.125	0.25	-
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	ECA1S.6	1	0.0625	ND	-
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	ECC1S.5	2	0.5	2	-
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	EIB3S.2	1	0.125	1	1+
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	EIC3M.10	0.125	0.03125	0.0156	-
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	FIB3S.2	ND	ND	ND	2+
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	HIC3M.1	ND	ND	0.5	-
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	ICC3A.1	0.5	0.0625	0.5	-
<i>Meyerozyma caribbica</i>	CP1S.4	4	0.25	0.5	-
<i>Meyerozyma caribbica</i>	CP3S.2	16	0.5	2	-
<i>Meyerozyma caribbica</i>	ICC1S.1	8	0.5	1	-
<i>Meyerozyma caribbica</i>	IIA1A.1	8	0.5	1	2+
<i>Meyerozyma caribbica</i>	IIB1S.1	16	1	1	-
<i>Meyerozyma caribbica</i>	IIC1S.1	8	0.5	1	-
<i>Meyerozyma caribbica</i>	IIC3S.1	8	0.5	0.5	-
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	BP3S.5	8	0.25	0.5	2+
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	BS3S.2	8	0.5	0.5	-
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	CI1S.2	8	0.5	1	-
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	FCA1M.1	2	0.125	0.25	2+
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	FCB1M.1	8	0.5	0.25	1+
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	FCB1S.1	8	1	1	-
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	FCB3S.1	16	0.5	1	2+

* Os valores de CIM destacados por coloração cinza claro correspondem a valores considerados de sensibilidade dose-dependente para a droga em questão. Já os valores destacados por coloração cinza escuro correspondem a valores considerados de resistência para a droga em questão. ** O sinal negativo representa ausência de produção de proteinase. Halo entre 1 e 2mm corresponde a produção 1+, halo >3mm corresponde a produção 2+. *** ND – não determinado.

Tabela 13 – Continuação

Espécie	Isolado	Fluconazol* CIM (µg/mL)	Itraconazol* CIM (µg/mL)	Anfotericina B* CIM (µg/mL)	Proteinase**
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	FCC1S.2	16	2	1	2+
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	FCC3S.1	8	0.5	0.5	ND
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	FIB1S.1	2	0.25	0.5	2+
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	FIB1S.3	0.5	0.0625	0.0625	2+
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	FIB1S.4	2	0.25	0.125	-
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	FIB3S.1	8	0.25	1	-
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	FIB3S.2	0.25	0.125	0.5	ND
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	FIC1M.1	4	0.25	1	-
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	FIC1S.2	4	0.25	2	2+
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	FIC3M.1	16	0.5	0.5	-
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	FIC3S.2	8	0.25	1	-
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	ICB1M.1	16	0.5	0.5	2+
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	ISm3.1	16	0.5	1	2+
<i>Pichia kudriavzevii</i>	BS1M.3	8	0.25	2	2+
<i>Pichia kudriavzevii</i>	EIC3M.3	6	0.0625	0.25	2+
<i>Pichia kudriavzevii</i>	HCB1M.1	16	0.125	0.5	2+
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	BI1S.3	64	1	0.5	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	BP3A.5	64	0.5	0.03125	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	BP3S.2	0.125	0.03125	0.0156	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	ECB3S.1	64	0.25	0.125	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	ECC1S.3	64	0.0625	1	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	HCC1A.2	32	1	0.125	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	HCC2A.1	32	2	0.0156	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	LHC2.2	16	0.5	0.03125	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	SSnC2.1	16	0.25	0.125	-
<i>Trichosporon asahii</i>	BF1S.1	4	0.25	4	-
<i>Trichosporon asahii</i>	BP1M.7	4	0.125	2	-
<i>Trichosporon asahii</i>	BP1S.14	4	0.25	2	-
<i>Trichosporon asahii</i>	ECA1S.9	0.5	0.125	ND	-
<i>Trichosporon asahii</i>	ECC1S.9	4	0.25	4	-
<i>Trichosporon asahii</i>	EIA2A.3	4	0.125	0.5	-
<i>Trichosporon asahii</i>	EIB3S.7	2	0.125	16	-
<i>Trichosporon asahii</i>	ISnM3.2	4	0.25	2	-
<i>Trichosporon dermatis</i>	ECB1L.4	2	0.0625	0.125	-
<i>Trichosporon dermatis</i>	HCC1A.1	2	0.0625	0.0625	-
<i>Trichosporon inkin</i>	HCB2A.5	1	0.03125	0.125	-
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	BP1M.8	4	0.25	0.5	2+
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	ECB1S.2	4	0.25	0.0625	-
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	EIC3S.2	2	0.03125	0.0156	ND
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	HCC1S.4	4	0.125	0.0156	2+
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	HIB1S.4	4	0.25	0.0625	2+
<i>Wickerhamomyces onychis</i>	CS1S.1	0.25	0.03125	2	-
<i>Wickerhamomyces onychis</i>	EIB2A.3	2	0.125	0.0625	-
<i>Yarrowia lipolytica</i>	BP1M.5	ND	ND	ND	2+
<i>Yarrowia lipolytica</i>	CP1M.1	4	0.25	2	2+
<i>Yarrowia lipolytica</i>	CP1S.1	8	0.25	2	2+
<i>Yarrowia lipolytica</i>	FCB1S.3	4	0.0625	2	-
<i>Yarrowia lipolytica</i>	FCC1S.1	4	0.5	2	2+
<i>Yarrowia lipolytica</i>	FCC3S.2	4	0.5	2	1+
<i>Yarrowia lipolytica</i>	FIC1S.1	0.25	0.125	2	-

* Os valores de CIM destacados por coloração cinza claro correspondem a valores considerados de sensibilidade dose-dependente para a droga em questão. Já os valores destacados por coloração cinza escuro correspondem a valores considerados de resistência para a droga em questão. ** O sinal negativo representa ausência de produção de proteinase. Halo entre 1 e 2mm corresponde a produção 1+, halo >3mm corresponde a produção 2+. *** ND – não determinado.

5.7 – Pesquisa de fatores de virulência

5.7.1 – Testes de produção de proteinase por leveduras oportunistas

Foram testadas quanto à produção de proteinase 144 leveduras (Figura 9). No geral, as espécies e linhagens avaliadas foram as mesmas submetidas aos testes de susceptibilidade aos agentes antifúngicos (Tabela 13). Cinquenta e oito linhagens (40%) apresentaram formação de halo em meio contendo albumina de soro bovino, sendo assim consideradas positivas.

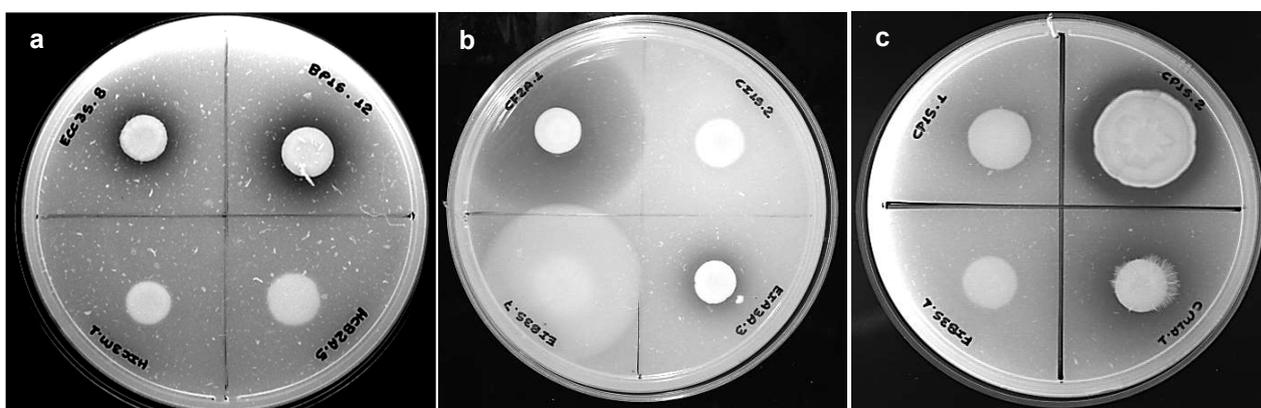


FIGURA 9 – Teste de produção de proteinase por leveduras isoladas a partir de amostras de água e areia de praias dos estados do Rio de Janeiro e Paraná. Linhagens no sentido horário: a) ECC3S.8 = *Candida parapsilosis*; BP1S.12 = *C. albicans*; HCB2A.5 = *Trichosporon inkin*; HIC3M.1 = *Lodderomyces elongisporus*; b) CF2A.1 = *C. infanticola*; CI1S.2 = *Meyerozyma guilliermondii*; EIA3A.3 = *C. parapsilosis*; EIB3S.7 = *T. asahii*; c) CP1S.1 = *Yarrowia lipolytica*; CP1S.2 = *C. phangnensis*; CM1A.1 = *C. albicans*; FIB3S.1 = *M. guilliermondii*.

A produção de proteinase foi observada em todas as linhagens testadas de *C. albicans* (5) e *P. kudriavzevii* (3). Além disso, dez dentre as 18 linhagens de *M. guilliermondii* testadas e cinco dentre as 17 de *C. tropicalis* apresentaram atividade proteolítica. Em relação a *C. parapsilosis*, apenas quatro dentre as nove linhagens testadas foram capazes de degradar a albumina formando halo no meio de cultivo. Outras espécies de *Candida* que também apresentaram linhagens produtoras de proteinase foram: *C. catenulata* (2), *C. cylindracea* (3), *C. glabrata* (1), *C. haemulonii* (1), *C. infanticola* (1), *C. orthopsilosis* (2) e *C. viswanathii* (1). Já as linhagens de *C. duobushaemulonii* (1), *C. metapsilosis* (1) e *C. neorugosa* (2) foram todas negativas.

Os resultados dos testes de produção de proteinase para *Candida* spp. parecem variar muito entre linhagens de uma mesma espécie. Junqueira e colaboradores (2012) avaliaram a atividade enzimática de leveduras isoladas a partir da cavidade oral de pacientes HIV positivos. Os autores observaram a produção de

proteínase por todas as linhagens de *C. albicans* (33) e *C. parapsilosis* (5) testadas. Já as linhagens de *C. glabrata* (10), *C. krusei* (2), *C. tropicalis* (4), *C. lusitaniae* (1), *C. guilliemondii* (1), *K. ohmeri* (1) e *T. mucoides* (2) não apresentaram esta atividade. Em outro trabalho envolvendo 95 linhagens de *Candida* isoladas a partir de diferentes amostras clínicas, apenas um isolado de *C. lypolitica* não apresentou atividade proteolítica. Todas as demais linhagens testadas pertencentes às espécies *C. albicans* (46), *C. krusei* (3), *C. glabrata* (9), *C. parapsilosis* (11), *C. guilliemondii* (5) e *C. tropicalis* (16) foram consideradas positivas (PANIZO et al., 2005). Um menor percentual de linhagens de *C. albicans* produtoras de proteínase foi observado em um trabalho com leveduras isoladas a partir de diferentes locais anatômicos de indivíduos saudáveis. Dentre os 81 isolados testados apenas 46 (57%) exibiram esta atividade enzimática (OKSUZ et al., 2007).

Nenhum dos fungos testados pertencentes aos gêneros *Exophiala* (4) e *Trichosporon* (11) exibiram atividade proteolítica. Além disso, as nove linhagens de *R. mucilaginosa* testadas também apresentaram resultado negativo para a produção de proteínase. Estes resultados são corroborados por trabalhos existentes na literatura. Em um estudo com 48 linhagens de *T. asahii* isoladas a partir de amostras clínicas coletadas de pacientes hospitalizados, não foi detectada a produção de proteínase em nenhum isolado (DAĞ & CERIKÇIOĞLU, 2006). Quanto à espécie *R. mucilaginosa*, durante uma investigação do perfil de atividade enzimática extracelular de leveduras isoladas de diferentes locais de uma floresta tropical no Brasil, não houve linhagens produtoras desta enzima (BUZZINI & MARTINI, 2002).

As proteínases podem exercer várias funções durante o processo de infecção fúngica como a simples digestão de moléculas para a aquisição de nutrientes; a geração de danos às membranas das células do hospedeiro facilitando a adesão e a invasão do tecido; e a digestão de componentes do sistema imune do hospedeiro evitando uma resposta antimicrobiana. Assim, maiores atividades proteolíticas frequentemente são associadas a linhagens de leveduras mais virulentas (NAGLIK et al., 2003). A detecção destas atividades em algumas das leveduras isoladas a partir das amostras de areia e água das praias estudadas possivelmente implica em um maior potencial patogênico das mesmas. Além disso, é importante ressaltar que muitas linhagens que foram consideradas produtoras de proteínase no presente

trabalho também exibiram uma sensibilidade reduzida aos antifúngicos testados, como foi o caso, por exemplo, do isolado de *C. haemulonii* (ECC1A.4) que além de ser resistente ao fluconazol, ao itraconazol e à anfotericina B também apresentou uma proeminente produção de proteinase.

5.7.2 –Adesão a células epiteliais bucais de leveduras oportunistas

Dentre as 29 leveduras testadas quanto à capacidade de aderir às células epiteliais bucais (CEBs) encontram-se as seguintes espécies: *C. albicans* (5 isolados), *C. infanticola* (1), *C. orthopsilosis* (1), *C. parapsilosis* (4), *C. tropicalis* (6), *E. spinifera* (1), *K. ohmeri* (1), *L. elongisporus* (5), *M. guilliermondii* (2) e *T. asahii* (3). Estas leveduras foram escolhidas pelos mesmos critérios utilizados nos experimentos anteriores, ou por serem consideradas oportunistas ou por terem sido isoladas de fontes humanas. Os testes de adesão para as demais leveduras oportunistas isoladas no presente trabalho serão realizados futuramente. A Tabela 14 mostra os resultados obtidos para este teste.

As espécies que menos aderiram às CEBs foram *E. spinifera* e *T. asahii* com médias de 1 e 3 leveduras aderidas a cada 50 CEBs, respectivamente. Já as espécies que apresentaram maiores índices de adesão foram *C. albicans* (Figura 10), com uma média de 146 leveduras aderidas a cada 50 CEBs, e *K. ohmeri*, com 286 leveduras aderidas a cada 50 CEBs. A maioria dos estudos tem mostrado que linhagens de *C. albicans* são mais propensas à adesão às CEBs que outras espécies oportunistas de *Candida* (BIASOLI et al., 2002; LYON & RESENDE, 2007; COSTA et al., 2010). Não foi encontrado nenhum trabalho abordando a adesão de linhagens de *K. ohmeri* a CEBs. A maior habilidade de adesão de uma determinada espécie de levedura quando comparada a outras pode estar diretamente relacionada a uma maior virulência (COSTA et al., 2010).

Sabe-se que a adesão às células epiteliais do hospedeiro é uma etapa crítica no processo de infecção por espécies de *Candida* e outras leveduras oportunistas, sendo essencial tanto para a colonização quanto para a indução subsequente da doença. Além disso, a colonização das superfícies mucosas é um conhecido fator de risco para candidíase disseminada (MARR et al., 2000; TAKESUE et al., 2004). Portanto, elevados números de leveduras aderidas às células epiteliais, como os observados no presente trabalho, podem estar associados a linhagens

potencialmente mais aptas ao desenvolvimento de infecções no hospedeiro, o que aumenta o risco dos indivíduos expostos a estes micro-organismos em adquirir doenças.

Tabela 14 - Adesão de leveduras isoladas de amostras de água e areia de praias dos estados do Rio de Janeiro e Paraná.

Espécie	Isolado	Total de leveduras aderidas em 50 CEB	Porcentagem de CEB com levedura(s)
<i>Candida albicans</i>	BP1S.12	150	74%
<i>Candida albicans</i>	CM1A.1	170	70%
<i>Candida albicans</i>	EIA3M.5	198	84%
<i>Candida albicans</i>	FIA3M.1	95	70%
<i>Candida albicans</i>	PHM3.1	115	64%
<i>Candida infanticola</i>	CF2A.1	6	8%
<i>Candida orthopsilosis</i>	BI1S.7	10	18%
<i>Candida parapsilosis</i>	BI1S.8	2	4%
<i>Candida parapsilosis</i>	BP2A.1	30	28%
<i>Candida parapsilosis</i>	ECC3S.8	112	42%
<i>Candida parapsilosis</i>	EIA3A.3	17	30%
<i>Candida tropicalis</i>	CI1M.1	24	20%
<i>Candida tropicalis</i>	CI1S.1	39	40%
<i>Candida tropicalis</i>	FCC3S.7	6	4%
<i>Candida tropicalis</i>	FIC3S.1	39	34%
<i>Candida tropicalis</i>	HCC1S.2	31	28%
<i>Candida tropicalis</i>	ICC3M.1	136	74%
<i>Candida tropicalis</i>	IIA3A.1	16	26%
<i>Exophiala spinifera</i>	CS3S.1	1	2%
<i>Kodamaea ohmeri</i>	BP1I.4	286	86%
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	CP1S.3	5	8%
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	EIB3S.2	14	22%
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	EIC3M.10	22	34%
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	FIB3S.2	5	6%
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	ICC3A.1	2	4%
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	FIB1S.4	5	4%
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	FIC3S.2	10	12%
<i>Trichosporon asahii</i>	BP1S.14	2	4%
<i>Trichosporon asahii</i>	EIA2A.3	4	6%
<i>Trichosporon asahii</i>	ISnM3.2	3	6%

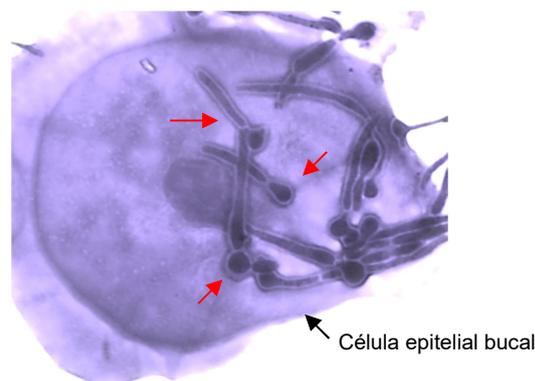


FIGURA 10 - Células de *Candida albicans* (setas vermelhas) aderidas a uma célula epitelial bucal (imagem obtida através de microscópio óptico – aumento 100x). Esta linhagem (FIA3M.1) foi isolada de uma amostra de areia da praia de Ipanema (Rio de Janeiro/RJ).

5.7.3 – Pesquisa de fatores de virulência de linhagens de *C. albicans*

Como descrito na seção de material e métodos, foram testadas quanto à presença dos fatores de virulência a seguir as cinco linhagens de *C. albicans* isoladas no presente trabalho (FIA3M.1, EIA3M.5, BP1S.12, PHM3.1 e CM1A.1) e outras sete linhagens desta espécie isoladas a partir de amostras de água de lagos e lagoas (LPM1.1, LPM1.2, LPM1.6, LPM1.12, LPC1.1, SLM1.1 e SLM5.1) (ESPÍRITO SANTO, 2014). Como praticamente não há dados na literatura sobre a presença ou ausência de fatores de virulência em linhagens de *C. albicans* isoladas a partir de amostras ambientais, o objetivo dos experimentos das seções seguintes foi a melhor compreensão destas leveduras. Com os resultados destes ensaios, espera-se contribuir de alguma forma na tentativa de responder a questão levantada por Papadakis e colaboradores (1997) se de fato as leveduras oportunistas presentes em ambientes recreacionais retêm a capacidade de causar doenças. Com fins comparativos, foram incluídas ainda nos testes uma linhagem de *C. albicans* de origem clínica considerada referência no estudo de fatores de virulência (SC5314), uma linhagem de *C. tropicalis* (FIC3S.1) e uma linhagem de *K. ohmeri* (BP1I.4). Para os experimentos realizados *in vivo*, com o fim de evitar um uso excessivo de animais, selecionou-se, além da linhagem de referência, apenas quatro linhagens para serem avaliadas.

5.7.3.1 Estudo da morfogênese de linhagens de *C. albicans*

No presente trabalho, as leveduras selecionadas foram desafiadas com relação a fatores indutores de filamentação como a presença de soro, altas temperaturas (37°C), limitação de nitrogênio e/ou carbono, baixos níveis de oxigênio e presença de aminoácidos. As colônias da linhagem de *C. albicans* SC5314 apresentaram aparência invasiva e/ou rugosa em todos os meios de cultivo onde foram crescidas e, quando as células foram visualizadas em microscópio óptico, observou-se principalmente hifas e pseudohifas. Estas características denotam a capacidade da linhagem em questão em mudar para a forma filamentosa já que a mesma foi inoculada na forma leveduriforme. Este resultado é condizente com os dados encontrados na literatura sobre esta linhagem (MAIDAN et al., 2005; MAIDAN et al., 2008). Em relação às demais leveduras pesquisadas, nenhuma apresentou um perfil de resposta idêntico ao da linhagem referência aos diferentes meios utilizados (Tabela 15).

Quando testadas em meio sólido contendo soro fetal bovino, a maioria das leveduras apresentou colônias lisas e células individuais quando visualizadas em microscópio. Entretanto, quando avaliadas em meio líquido acrescido de soro fetal bovino, todas as linhagens de *C. albicans* flocularam e apresentaram filamentação. As demais leveduras apenas turvaram o meio de cultivo e, quando visualizadas em microscópio, apresentaram células individuais (Figura 11).

Em ágar Spider, meio pobre cuja única fonte de carbono é o manitol, a maioria das leveduras testadas apresentou colônias lisas com bordas filamentosas. Quando visualizadas em microscópio, ao contrário da linhagem referência onde foram observadas pseudohifas e hifas verdadeiras, as leveduras exibiram muitas células individuais e algumas poucas pseudohifas. Não foram observados filamentos nas colônias das linhagens de *C. albicans* isoladas a partir do lago São Luís (SLM1.1 e SLM5.1) e das leveduras pertencentes às demais espécies.

No meio com limitação de nitrogênio (SLAD), dentre as sete linhagens de *C. albicans* isoladas a partir de águas de lagos e lagoas, todas apresentaram colônias de aparência lisa e, após lavagem das placas com tampão PBS, foi possível verificar a presença de filamentos no interior do ágar em apenas uma (LPM1.1). Em relação às leveduras isoladas a partir de amostras coletadas nas praias, apenas duas não apresentaram colônias com características invasivas (BP1S.12 e PHM3.1).

Apesar de metade das leveduras testadas ter apresentado colônias lisas quando crescidas em ágar Lee, um meio pobre em nutrientes mas rico em aminoácidos, a maioria apresentou filamentação. Apenas a linhagem de *K. ohmeri* e três linhagens de *C. albicans*, as duas isoladas a partir do lago São Luís e uma isolada a partir da lagoa da Pampulha (LPM1.6), não foram capazes de sofrer morfogênese neste meio.

Todas as leveduras pertencentes à espécie *C. albicans* crescidas sob condições de microaerofilia no interior do ágar YPS foram capazes de formar filamentos. Já as linhagens de *C. tropicalis* e *K. ohmeri* mantiveram colônias de aparência não invasiva, não respondendo assim a este fator indutor de filamentação. Após o período de cinco dias de incubação, a maioria das leveduras cresceu o suficiente para emergir do ágar.

As linhagens de *C. albicans* que não possuem ou que perderam a capacidade de sofrer morfogênese já foram confirmadas como avirulentas quando testadas em modelos animais (LO et al., 1997). A resposta destes micro-organismos a diferentes estímulos desencadeadores das transformações morfológicas é muito importante uma vez que permite aos mesmos sobreviver e se adaptar a uma variedade de sítios anatômicos no hospedeiro (SUDBERY, 2011). Além disso, Baillie e Douglas (1999) mostraram que as hifas são elementos essenciais na manutenção da integridade estrutural e da arquitetura multicamadas de biofilmes maduros desta espécie. No presente trabalho, observou-se linhagens que foram isoladas a partir de amostras ambientais capazes de mudar da forma leveduriforme para a forma filamentosa diante de fatores indutores de filamentação como a presença de soro, a limitação de nitrogênio e/ou carbono, baixos níveis de oxigênio e presença de aminoácidos. Assim, estes resultados sugerem um potencial patogênico destas leveduras.

Tabela 15 – Morfologia das colônias das linhagens de *Candida albicans* e demais leveduras avaliadas em diferentes meios indutores de filamentação.

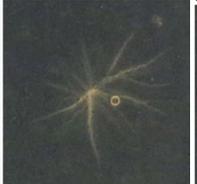
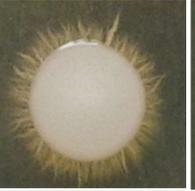
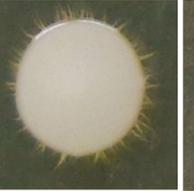
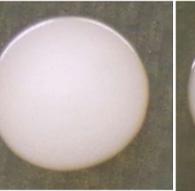
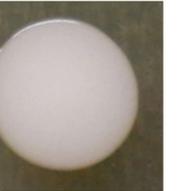
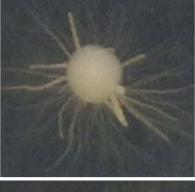
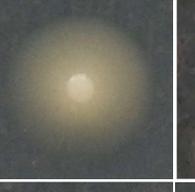
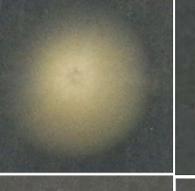
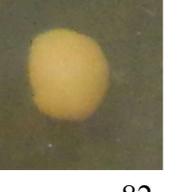
MEIO DE CULTIVO	<i>C. albicans</i> SC5314	<i>C. albicans</i> FIA3M.1	<i>C. albicans</i> EIA3M.5	<i>C. albicans</i> BP1S.12	<i>C. albicans</i> PHM3.1	<i>C. albicans</i> CM1A.1	<i>C. albicans</i> LPM1.1	<i>C. albicans</i> LPM1.2
Ágar Spider								
Ágar YPD acrescido de soro fetal bovino								
Ágar SLAD antes da lavagem								
Ágar SLAD após lavagem								
Ágar Lee								
YPS colônias incorporadas no meio								

Tabela 15 – Continuação.

MEIO DE CULTIVO	<i>C. albicans</i> SC5314	<i>C. albicans</i> LPM1.6	<i>C. albicans</i> LPM1.12	<i>C. albicans</i> LPC1.1	<i>C. albicans</i> SLM1.1	<i>C. albicans</i> SLM5.1	<i>C. tropicalis</i> FIC3S.1	<i>K. ohmeri</i> BP11.4
Ágar Spider								
Ágar YPD acrescido de soro fetal bovino								
Ágar SLAD antes da lavagem								
Ágar SLAD após lavagem								
Ágar Lee								
YPS colônias incorporadas no meio								

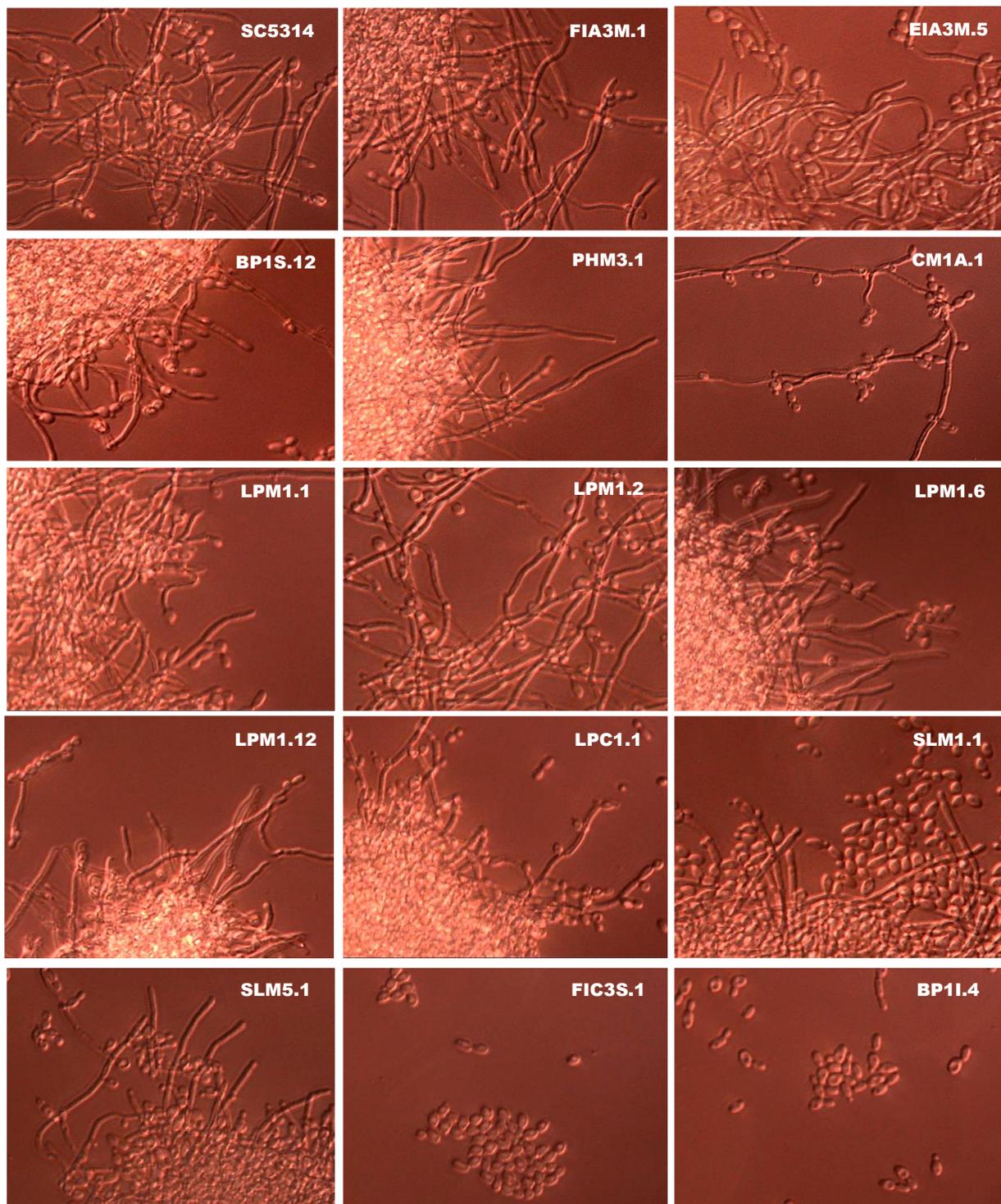


Figura 11 – Imagens obtidas com auxílio de microscópio óptico (40x) das linhagens de *Candida albicans*, *C. tropicalis* (FIC3S.1) e *Kodamaea ohmeri* (BP11.4) em meio YPD líquido acrescido de soro fetal bovino (10%).

5.7.3.2 Teste da capacidade de formação de biofilme de linhagens de *C. albicans*

a) Adesão e formação de biofilme em cateteres de poliuretano - teste *in vitro*

Como pode ser observado na figura 12, todas as leveduras testadas apresentaram taxas de adesão aos fragmentos de cateter muito similares entre si. Segundo o teste de Kruskal-Wallis, não houve diferenças significativas entre a adesão da linhagem referência de *C. albicans* e dos demais micro-organismos avaliados. A única exceção foi a linhagem de *C. albicans* SLM1.1, isolada do lago São Luís, cuja a adesão média foi de cerca de 500 UFC a menos que as das demais linhagens.

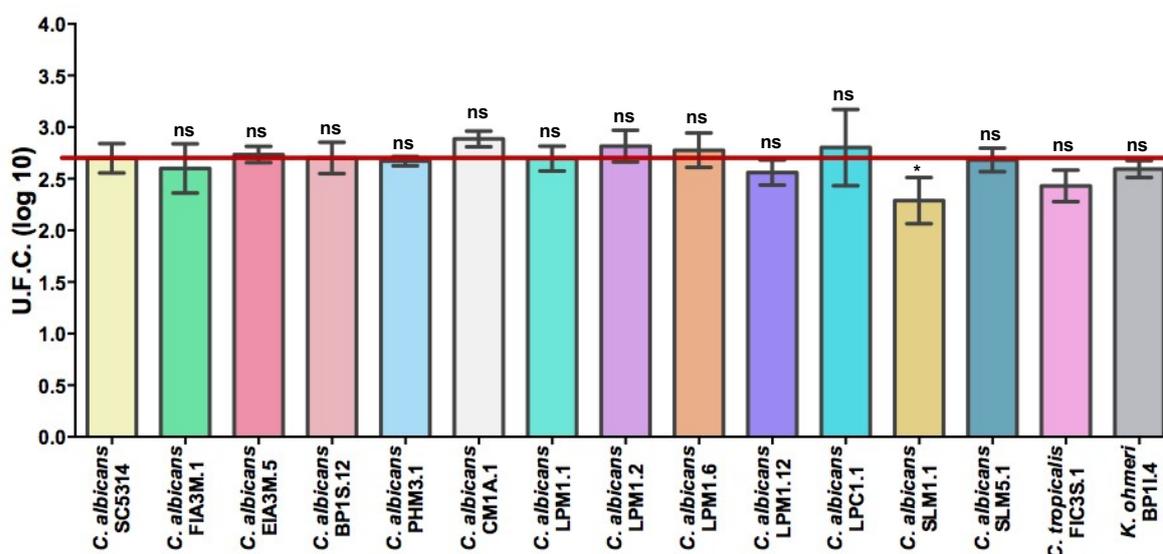


Figura 12 – Adesão de linhagens de *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *Kodamaea ohmeri* a fragmentos de cateter de poliuretano. O gráfico representa o número de unidades formadoras de colônias recuperadas a partir de pedaços de 1 cm de cateter de poliuretano após um período de 90 minutos de adesão. Os símbolos sobre as colunas refletem a existência ou não de diferença estatística entre aquela levedura e a linhagem referência de *C. albicans* SC5314 segundo o teste de Kruskal-Wallis: ns – $p > 0,05$ (diferença não significativa); * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

Em relação aos testes de formação de biofilme *in vitro*, a maioria das leveduras apresentou um número significativamente maior de unidades formadoras de colônias recuperadas a partir dos fragmentos de cateter do que a linhagem referência (Figura 13). A importância dos biofilmes no campo médico vem sendo cada vez mais reconhecida uma vez que estima-se que os mesmos estão envolvidos em uma grande parte de todas as infecções microbianas humanas,

especialmente aquelas relacionadas ao implante de dispositivos médicos como cateteres intravasculares ou urinários, tubos endotraqueais, próteses vocais e das articulações (POTERA, 1999; RAMAGE et al., 2006). Uma vez desenvolvidos sobre estes materiais, os biofilmes passam a apresentar características fenotípicas únicas, incluindo uma maior resistência aos agentes antimicrobianos e proteção contra a defesa do hospedeiro (KUHN & GHANNOUM, 2004; MOWAT e al. 2007). Assim, a capacidade de formar biofilme pode ser um importante fator determinante da virulência de um micro-organismo (RAMAGE et al., 2005).

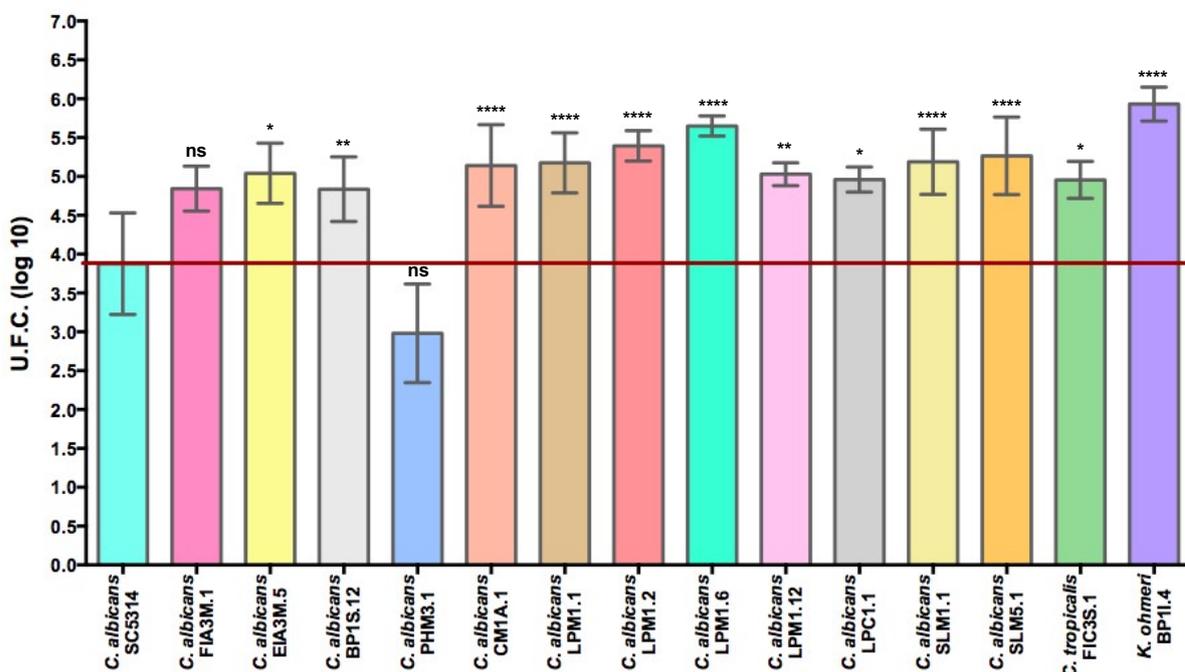


Figura 13 – Formação de biofilme por linhagens de *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *Kodamaea ohmeri* sobre fragmentos de cateter de poliuretano. O gráfico representa o número de unidades formadoras de colônias recuperadas a partir de pedaços de 1 cm de cateter de poliuretano após a formação de biofilme em um período de 24 horas. Os símbolos sobre as colunas refletem a existência ou não de diferença estatística entre aquela levedura e a linhagem referência de *C. albicans* SC5314 segundo o teste de Kruskal-Wallis: ns – $p > 0,05$ (diferença não significativa); * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

A capacidade de formar biofilme, apesar de ser considerada um importante fator de virulência, não é uma característica associada apenas a bactérias e fungos patogênicos. Ao contrário desta suposição, estimativas sugerem que até 80% de todos os micro-organismos no ambiente são encontrados na forma de comunidades sésseis e não como células planctônicas (DONLAN, 2002). Assim, espera-se que linhagens de leveduras isoladas a partir de amostras ambientais, principalmente aquelas cujas espécies são frequentemente associadas a biofilmes, também exibam esta habilidade.

b) Adesão e formação de biofilme em cateteres de poliuretano - teste *in vivo*

A seleção das leveduras para os testes de formação de biofilme *in vivo* do presente trabalho foi baseada nos resultados dos testes *in vitro*. Foram escolhidas duas linhagens de *C. albicans* (LPM1.6 e SLM1.1) e a linhagem de *K. ohmeri* (BP11.4) que apresentaram melhores resultados do que a linhagem referência nos testes *in vitro* e uma linhagem de *C. albicans* (PHM3.1) cujos resultados foram ligeiramente inferiores (embora não tenham sido estatisticamente diferentes).

A princípio, as leveduras aderiram de forma similar aos cateteres, não havendo diferenças significativas entre as mesmas e a linhagem referência de *C. albicans* ($p > 0,05$). Após quatro horas, constatou-se que houve uma queda no número de unidades formadoras de colônias recuperadas dos fragmentos de cateteres para todas as linhagens (Figura 14). Ríciová e colaboradores (2010) observaram este mesmo fenômeno durante o desenvolvimento deste modelo subcutâneo de formação de biofilme. Os autores sugeriram que é possível que, neste primeiro estágio, as células fúngicas se desliguem mais facilmente dos cateteres sendo removidas durante o procedimento experimental, o que resultaria em uma menor biomassa. Uma outra explicação é que algumas células não seriam capazes de se adaptar bem às condições de crescimento no interior do hospedeiro. Também para este período avaliado não foram encontradas diferenças significativas de formação de biofilme entre as linhagens ($p > 0,05$). Segundo Seneviratne e colaboradores (2008), a adesão e as primeiras horas compreendem a fase inicial de formação dos biofilmes.

Quarenta e oito horas após o implante dos cateteres, todas as leveduras apresentaram um desenvolvimento expressivo de biomassa (Figura 14). Neste período é provável que os biofilmes se encontrem em fase de maturação (SENEVIRATNE et al., 2008). Nenhuma linhagem se destacou por formar significativamente mais ou menos biofilme do que a linhagem referência durante este tempo ($p > 0,05$). Em geral, nos dias seguintes, os biofilmes de *C. albicans* costumam permanecer estáveis conforme descrito por Ríciová e colaboradores (2010). Entretanto, após seis dias, foi observado um aumento de biomassa para a linhagem de *C. albicans* SLM1.1 e uma queda para as linhagens SC5314, PHM3.1 e LPM1.6 (Figura 14). Seneviratne e colaboradores (2008) sugeriram que diferentes linhagens de uma mesma espécie de *Candida* podem ser bastante diferentes quanto

à capacidade de formar biofilme. Quanto à linhagem de *K. ohmeri* testada, também houve um aumento do número de unidades formadoras de colônias recuperadas a partir dos cateteres. Embora quase não existam dados na literatura sobre biofilmes formados por esta espécie, há alguns relatos de enfermidades associadas a implantes de cateteres (SHANG et al., 2010). As leveduras que tiveram aumento de biomassa entre as 48 horas e os seis dias de experimento apresentaram biofilmes significativamente mais abundantes do que a linhagem referência ($p < 0,05$).

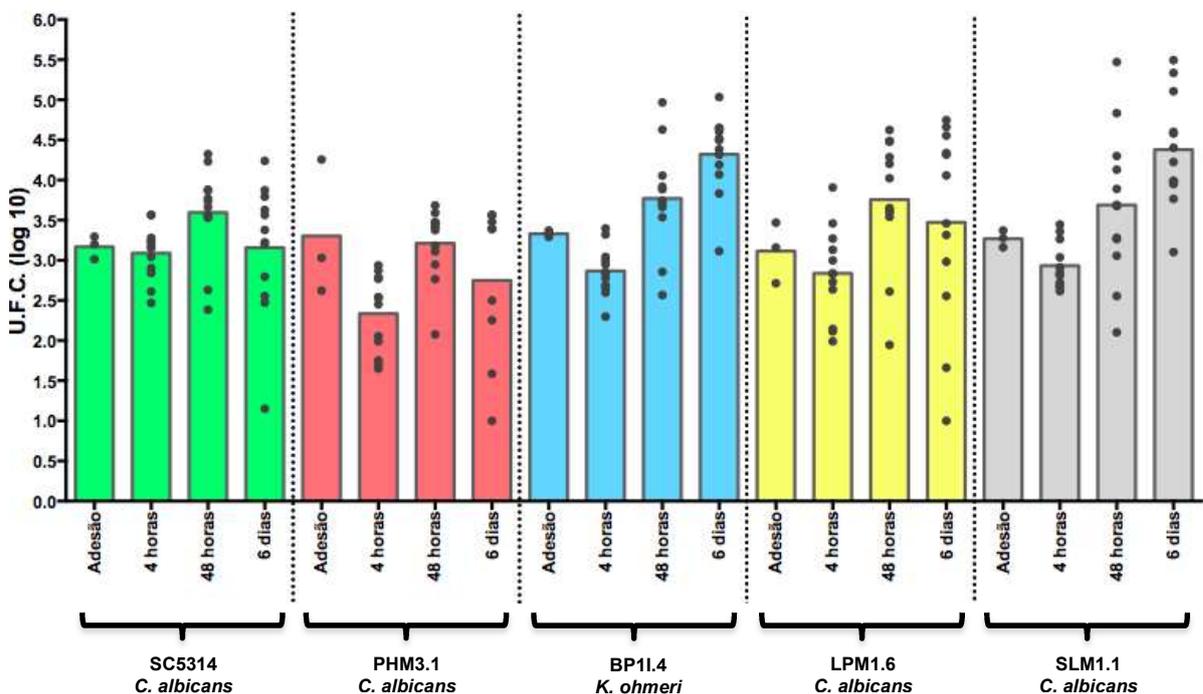


Figura 14 – Formação de biofilme por linhagens de *Candida albicans* e *Kodamaea ohmeri* sobre fragmentos de cateter de poliuretano implantados sob a pele de camundongos Balb/C. O gráfico representa o número de unidades formadoras de colônias recuperadas a partir de pedaços de 1 cm de cateter de poliuretano após o período de adesão e após a formação de biofilme nos períodos de 4 horas, 48 horas e 6 dias.

Este modelo permitiu a avaliação da capacidade de formação de biofilme de leveduras isoladas a partir de amostras ambientais em um sistema vivo. Os resultados confirmaram o potencial destas linhagens de crescer sobre dispositivos médicos implantados. No entanto, é importante lembrar que este modelo subcutâneo de formação de biofilme é muito diferente daquele realizado em cateteres implantados no sistema venoso central, já que neste último os biofilmes estão expostos ao fluxo sanguíneo e possuem maior acesso aos nutrientes do hospedeiro. Assim, o modelo adotado no presente trabalho simula melhor as condições

ambientais e fontes de nutrientes existentes em próteses implantáveis como as de voz e das articulações (RICICOVÁ et al., 2010).

5.7.3.3 Ensaio de virulência de linhagens de *C. albicans in vivo*

Após avaliar a presença de alguns fatores de virulência em linhagens de leveduras isoladas a partir de amostras ambientais, realizou-se o teste de virulência *in vivo*. As linhagens utilizadas para este experimento foram as mesmas selecionadas para o teste de formação de biofilme *in vivo*. Camundongos Balb/c foram desafiados com leveduras pertencentes às espécies *C. albicans* e *K. ohmeri* e monitorados durante 30 dias. Todas as linhagens de *C. albicans* foram capazes de causar doença nos animais. Estes últimos, nos dias posteriores à infecção, apresentaram pêlos arrepiados e perderam peso gradativamente. Após 15 dias, todos os camundongos infectados com leveduras desta espécie haviam morrido. Já em relação aos camundongos desafiados com a linhagem de *K. ohmeri*, não foram constatados sinais de doença. Estes animais permaneceram vivos durante todo o período experimental e não apresentaram perda de peso e nem mudança de comportamento. Assim, apesar de vários fatores de virulência terem sido observados nos testes anteriores para esta linhagem, a mesma mostrou ser avirulenta dentro das condições adotadas para este experimento. Uma possível explicação para este fato é que foram utilizados camundongos imunocompetentes no presente ensaio, enquanto a espécie *K. ohmeri* é conhecida por causar enfermidades principalmente em indivíduos imunossuprimidos (SHANG et al., 2010).

A figura 15 mostra as curvas de sobrevivência estimadas pelo método de Kaplan-Meier para cada linhagem testada. Segundo o teste estatístico de log rank de Cox-Mantel, houve diferenças significativas apenas entre as curvas da linhagem referência de *C. albicans* SC5314 e da linhagem PHM3.1 ($p \leq 0,05$), e também da linhagem referência e da linhagem de *K. ohmeri* BP11.4 ($p < 0,0001$).

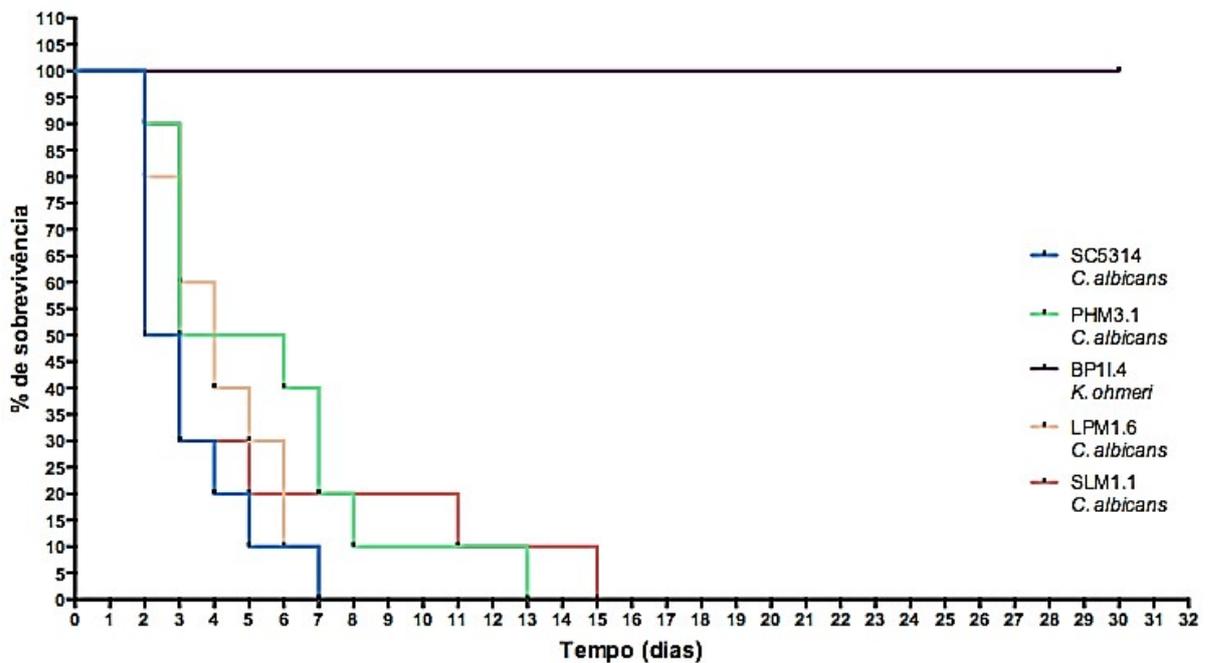


Figura 15 – Curva de sobrevivência obtida pelo método de Kaplan-Meier para os grupos de camundongos desafiados com as diferentes linhagens de *Candida albicans* (SC5314, PHM3.1, LPM1.6 e SLM1.1) e com a linhagem de *Kodamaea ohmeri* (BP11.4).

Os resultados encontrados nos testes de virulência *in vivo* mostraram que algumas leveduras isoladas a partir de amostras ambientais foram virulentas tanto quanto a linhagem SC5314 que foi isolada originalmente a partir de uma amostra de sangue de um paciente com candidíase disseminada (GILLUM et al., 1984). Logo, é possível sugerir que estes micro-organismos sejam capazes de causar enfermidades em pessoas que entrem em contato com os mesmos. Como a maioria das linhagens testadas no presente trabalho foram isoladas a partir de amostras coletadas em ambientes recreacionais, faz-se necessária a realização de mais estudos para investigar o risco que os fungos presentes nestes locais oferecem à saúde de banhistas.

- A identificação de espécies de leveduras oportunistas isoladas a partir das amostras de água e areia coletadas nas praias dos estados do Rio de Janeiro e Paraná, bem como a presença de fatores de virulência e a ocorrência de resistência aos antifúngicos entre as mesmas, sugerem um risco potencial à saúde de pessoas que utilizam estes ambientes para recreação. Além disso, estes resultados merecem uma atenção especial quando se leva em consideração o fato de indivíduos imunossuprimidos e em extremos de idade também fazer parte do público destas praias.
- Os ensaios de virulência *in vivo* permitiram a avaliação do comportamento de linhagens de *C. albicans* isoladas a partir de amostras ambientais quando inoculadas em camundongos e confirmaram o potencial destas últimas de causar doenças, ratificando, assim, a existência de ameaça à saúde de indivíduos que porventura entrem em contato com as mesmas.
- A ausência de correlação entre bactérias indicadoras e espécies de leveduras oportunistas nas amostras de água e areia coletadas mostra a importância da utilização de outros parâmetros microbiológicos na avaliação da qualidade das praias.
- As areias das praias mostraram abrigar elevadas concentrações de bactérias indicadoras de contaminação fecal e de leveduras, podendo funcionar como reservatórios destes micro-organismos e, conseqüentemente, contaminar as águas adjacentes. Além disso, as areias podem contribuir para a exposição dos usuários das praias a leveduras oportunistas.
- O meio CHROMagar-Candida não foi efetivo no isolamento diferencial de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *P. kudriavzevii* a partir das amostras ambientais estudadas no presente trabalho. Dentre as leveduras que apresentaram colônias de colorações típicas às destas, foi possível identificar várias outras espécies.

- O meio mCA também não foi efetivo no isolamento seletivo e diferencial de *C. albicans*, tendo isolado 25 outras espécies de leveduras com colônias morfolologicamente típicas de *C. albicans*.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAE (Associação Bandeira Azul da Europa). Qualidade microbiológica de areias de praias litorais - Relatório Final. Alfragide: Ed. Instituto do Ambiente, 126 p., 2002.

ABAE (Associação Bandeira Azul da Europa). Monitorização da qualidade das areias em zonas balneares – época balnear 2010. Lisboa: Ed. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 31 p., 2011.

ABDELZAHER, A.M; WRIGHT, M.E.; ORTEGA, C.; SOLO-GABRIELE, H.M.; MILLER, G. ELMIR, S.; NEWMAN, X.; SHIH, P.; BONILLA, A.; BONILLA, T.D.; PALMER, C.J.; SCOTT, T.; LUKASIK, J.; HARWOOD, V.J.; MCQUAIG, S.; SINIGALLIANO, C.; GIDLEY, M.; PLANO, L.R.W.; ZHU, X.; WANG, J.D.; FLEMING, L.E. Presence of pathogens and indicator microbes at a non-point source subtropical recreational marine beach. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 3, p. 724 – 732, 2010.

ALM, E.W.; BURKE, J.; SPAIN, A. Fecal indicator bacteria are abundant in wet sand at freshwater beaches. *Water Research*, v. 37, p. 3978 – 3982, 2003.

ANDRAU, S. Aspectos microbiológicos da qualidade sanitária das águas do mar e areias das praias de Matinhos, Caiobá e Guaratuba-PR. 2006. 107 p. Dissertação de mestrado – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

ANGELOTTI, R.; NOERNBERG, M. A. Análise dos riscos ao banho de mar no município de Pontal do Paraná - PR – temporada 2003/2004. *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology*, v. 14, n.1, p. 65-75, 2010.

ARIKAN, S; HASÇELIK, G. Comparison of NCCLS microdilution method and Etest in antifungal susceptibility testing of clinical *Trichosporon asahii* isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 43, n. 2, p. 107 – 111, 2002.

ARVANITIDOU, M.; KANELLOU, K.; KATSOUYANNOPOULOS, V.; TSAKRIS, A. Occurrence and densities of fungi from northern Greek coastal bathing waters and their relation with faecal pollution indicators. *Water Research*, v. 36, n. 20, p. 5127-5131, 2002.

BAILLIE, G.S.; DOUGLAS, L.J. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *Journal of Medical Microbiology*, v. 48, n. 7, p. 671 – 679, 1999.

BARCHIESI, F.; TORTORANO, A.M.; DI FRANCESCO, L.F.; COGLIATI, M.; SCALISE, G.; VIVIANI, M.A. *In-vitro* activity of five antifungal agents against uncommon clinical isolates of *Candida* spp. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 43, p. 295 – 299, 1999.

BEVERSDORF, L.J.; BORNSTEIN-FORST, S.M.; MCLELLAN, S.L. The potential for beach sand to serve as a reservoir for *Escherichia coli* and the physical influences on cell die-off. *Journal of Applied Microbiology*, v. 102, p. 1372 – 1381, 2007.

BIASOLI, M.S.; TOSELLO, M.E.; MAGARÓ, H.M. Adherence of *Candida* strains isolated from the human gastrointestinal tract. *Mycoses*, v. 45, p. 465 – 469, 2002.

BONADONNA, L.; BRIANCESCO, R.; OTTAVIANI, M.; VESCHETTI, E. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in sewage effluents and correlation with microbial, chemical and physical water variables. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 75, p. 241 – 252, 2002.

BONILLA, T.D.; NOWOSIELSKI, K.; CUVELIER, M.; HARTZ, A.; GREEN, M.; ESIOLU, N.; MCCORQUODALE, D.S.; FLEISHER, J.M.; ROGERSON, A. Prevalence and distribution of fecal indicator organisms in South Florida beach sand and preliminary assessment of health effects associated with beach sand exposure. *Marine Pollution Bulletin*, v. 54, p. 1472 – 1482, 2007.

BOSSCHE, H. V. Mechanisms of antifungal resistance. *Revista Iberomamericana de Micologia*, v. 14, p. 44 – 49, 1997.

BOUKAI, N. Qualidade sanitária da areia das praias do município do Rio de Janeiro: diagnóstico e estratégia para monitoramento e controle. *Coleções Estudos Cariocas*, n. 20070101, p.1 - 45, 2007.

BRANDÃO, L.R., MEDEIROS, A.O., DUARTE, M.C.; BARBOSA, A.C.; ROSA C.A. Diversity and antifungal susceptibility of yeasts isolated by multiple-tube fermentation from three freshwater lakes in Brazil. *Journal of Water and Health*, v. 8, n. 2, p. 279 – 289, 2010.

BRANDT, M.E.; LOCKHART, S.R. Recent taxonomic developments with *Candida* and other opportunistic yeasts. *Current Fungal Infection Reports*, 8 p., 2012.

BRASIL. Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente nº. 274 de 29 de Novembro de 2000. Define os critérios de balneabilidade em águas brasileiras. Diário Oficial da União, Brasília, n. 018, seção 1, p. 70 – 71, 25 de janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério do Turismo e Secretaria Nacional de Políticas de Turismo. Anuário Estatístico de Turismo – 2013 (Ano base 2012), 40, 219 p., 2013.

BRAUN, D.K.; KAUFF, C.A. *Rhodotorula* fungaemia: a life-threatening complication of indwelling central venous catheters. *Mycoses*, v. 35, p. 305 – 308, 1992.

BROWN JR., D. H.; GIUSANI, A. D.; CHEN, X.; KUMAMOTO, C. A. Filamentous growth of *Candida albicans* in response to physical environmental cues, and its regulation by the unique CZF1 gene. *Molecular Microbiology*, v. 34, p. 651–662, 1999.

BRUDER-NASCIMENTO, A.; CAMARGO, C. H.; SUGIZAKI, M. F.; SADATSUNE, T.; MONTELLI, A. C.; MONDELLI, A. L.; BAGAGLI, E. Species distribution and susceptibility profile of *Candida* species in a Brazilian public tertiary hospital. *BMC Research Notes*, v. 3, n. 1, p. 1, 2010.

BUCK, J. D.; BUBUCIS, M. P. Membrane filter procedure for enumeration of *Candida albicans* in natural waters. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 35, n. 2, p. 237– 242, 1978.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. *Journal of Applied Microbiology*, v. 93, n. 6, p. 1020-1025, 2002.

BYAPPANAHALLI, M.N.; WHITMAN, R.L.; SHIVELY, D.A.; SADOWSKY, M.J.; ISHII, S. Population structure, persistence, and seasonality of autochthonous *Escherichia coli* in temperate, coastal forest soil from a Great Lakes watershed. *Environmental Microbiology*, v. 8, p. 504 – 513, 2006.

BYAPPANAHALLI, M.N.; ROLL, B.M.; FUJIOKA, R.S. Evidence for occurrence, persistence, and growth potential of *Escherichia coli* and Enterococci in Hawaii's Soil Environments. *Microbes and Environments*, v. 27, n. 2, p. 164 – 170, 2012.

CANUTO, M. M.; RODERO, F. G. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 2, p. 550 – 563, 2002.

CAPOOR, M.R.; AGARWAL, S.; YADAV, S.; SAXENA, A.K.; RAMESH, V. *Trichosporon mucoides* causing onychomycosis in an immunocompetent patient. *International Journal of Dermatology*, p. 1 - 4, 2013.

CENDEJAS-BUENO, E.; KOLECKA, A.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; THEELEN, B.; GROENEWALD, M.; KOSTRZEWA, M.; CUENCA-ESTRELLA, M.; GÓMEZ-LÓPEZ, A.; BOEKHOUT, T. Reclassification of the *Candida haemulonii* Complex as *Candida haemulonii* (*C. haemulonii* Group I), *C. duobushaemulonii* sp. nov. (*C. haemulonii* Group II), and *C. haemulonii* var. *vulnera* var. nov.: Three Multiresistant Human Pathogenic Yeasts. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 50, n. 11, p. 3641-3651, 2012.

CHAFFIN, W. L.; LÓPEZ-RIBOT, J. L.; CASANOVA, M.; GOZALBO, D.; MARTÍNEZ, J. P. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 62, p. 130 – 180, 1998.

CHAGAS-NETO, T.C.; CHAVES, G.M.; COLOMBO, A.L. Update on the Genus *Trichosporon*. *Mycopathologia*, v. 166, p. 121 – 132, 2008.

CHAN, G.F.; PUAD, M.S.A; CHIN, C.F.; RASHID, N.A.A. Emergence of *Aureobasidium pullulans* as human fungal pathogen and molecular assay for future medical diagnosis. *Folia Microbiologica*, v. 56, n. 5, p. 459 – 467, 2011.

CHANDRA, J.; KUHN, D. M.; MUKHERJEE, P. K.; HOYER, L. L.; MCCORMICK, T.; GHANNOUM, M. A. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *Journal of Bacteriology*, v. 183, p. 5385–5394, 2001.

CHAVANET, P.; LOPEZ, J.; GRAPPIN, M.; BONNIN, A.; DUONG, M.; WALDNER, A.; BUISSON, M.; CAMERLYNCK, P.; PORTIER, H. Cross-sectional study of the susceptibility of *Candida* isolates to antifungal drugs and in vitro in vivo correlation in HIV-infected patients. *AIDS*, v. 8, p. 945 – 950, 1994.

CHEN, Y.; YANAGIDA, F.; CHEN, L. Isolation of marine yeasts from coastal waters of northeastern Taiwan. *Aquatic Biology*, v. 8, p. 55 – 60, 2009.

CLARK, T.A.; SLAVINSKI, S.A.; MORGAN, J.; LOTT, T.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.A.; BRANDT, M.E.; WEBB, R.M.; CURRIER, M.; FLOWERS, R.H.; FRIDKIN, S.K.; HAJJEH, R.A. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, p. 4468 – 4472, 2004.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility test for yeasts. Approved Standard, Third Edition. CLSI document M7-A3, v. 28, n. 14, 25 p., 2008.

COLFORD, J.M.; WADE, T.J.; SCHIFF, K.C.; WRIGHT, C.C.; GRIFFITH, J.F.; SANDHU, S.K.; BURNS, S.; SOBSEY, M.; LOVELACE, G.; WEISBERG, S.B. Water quality indicators and the risk of illness at beaches with non-point sources of fecal contamination. *Epidemiology*, v. 18, n. 1, p. 27-35, 2007.

COLOMBO, A. L.; PADOVAN, A. C. B.; CHAVES, G. M. Current knowledge of *Trichosporon* spp. and Trichosporonosis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 24, n.4, p. 682 – 700, 2011.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T.; CAMARGO, L.F.A.; RICHTMANN, R.; DE QUEIROZ-TELLES, F.; SALLES, M.J.C.; CUNHA, C.A.; YASUDAG, M.A.S.; MORETTI, M.L.; NUCCI, M. Brazilian guidelines for the management of candidiasis – a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 17, n. 3, p. 283 – 312, 2013.

COOK, W. L.; SCHLITZER, R. L. Isolation of *Candida albicans* from Freshwater and Sewage. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 41, n. 3, p. 840 – 842, 1981.

COSTA, C.R.; PASSOS, X.S.; SOUZA, L.K.H.; LUCENA, P.A.; FERNANDES, O.F.L.; SILVA, M.R.R. Differences in exoenzyme production and adherence ability of *Candida* spp. isolates from catheter, blood and oral cavity. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 52, n. 3, p. 139 – 143, 2010.

CUI, H.; YANG, K.; PAGALING, E.; YAN, T. Spatial and temporal variation in enterococcal abundance and its relationship to the microbial community in Hawaii beach sand and water. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 79, n. 12, p. 3601 - 3609, 2013.

DAĞ, A.; CERİKÇIOĞLU, N. Investigation of some virulence factors of *Trichosporon asahii* strains isolated from the clinical samples of hospitalized patients. *Mikrobiyoloji bülteni*, v. 40, n. 3, p.225 – 235, 2006

D'ANTONIO, D.; ROMANO, F.; PONTIERI, E.; FIORITONI, G.; CARACCILOLO, C.; BIANCHINI, S.; OLIOSO, P.; STANISCIÀ, T.; SFERRA, R.; BOCCIA, S.; VETUSCHI, A.; FEDERICO, G.; GAUDIO, E.; CARRUBA, G. Catheter-related candidemia caused by *Candida lipolytica* in a patient receiving allogeneic bone marrow transplantation. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, p. 1381 – 1386, 2002.

DEAK, T. Environmental factors influencing yeasts. In: ROSA, C. A.; PÉTER, G. (Eds.) Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. Germany: Springer Berlin Heidelberg, p. 155– 174, 2006.

DE BARROS LOPES, M; SODEN, A.; HENSCHKE, P.A.; LANGRIDGE, P. PCR Differentiation of Commercial Yeast Strains Using Intron Splice Site Primers. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n. 12, p. 4514–4520, 1996.

DE BARROS LOPES, M; SODEN, A.; MARTENS, A.L.; HENSCHKE, P.A.; LANGRIDGE, P. Differentiation and species identification of yeasts using PCR. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 48, p. 279-286, 1998.

DE BERNARDIS, F.; MONDELLO, F.; SAN MILLAN, R.; PONTON, J.; CASSEONE, A. Biotyping and virulence properties of skin isolates of *Candida parapsilosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, p. 3282 – 3286, 1999.

DESMARAIS, T.R.; SOLO-GABRIELE, H.M.; PALMER, C.J. Influence of soil on fecal indicator organisms in a tidally influenced subtropical environment. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, p. 1165 – 1172, 2002.

DIEKEMA, D.J.; MESSER, A.; BOYKEN, L.B.; HOLLIS, R.J.; KROEGER, J.; TENDOLKAR, S.; PFALLER, M.A. In vitro activity of seven systemically active antifungal agents against a large global collection of rare *Candida* species as determined by CLSI broth microdilution methods. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 47, n.10, p. 3170 – 3177, 2009.

DONLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, v. 8, n. 9, p. 881 - 90, 2002.

EFSTRATIOU, M.A.; MAVRIDOU, A.; RICHARDSON, S.C.; PAPADAKIS, J.A. Correlation of bacterial indicator organisms with *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* in sea water. *Letters in Applied Microbiology*, v. 26, p. 342 – 346, 1998.

ELMANAMA, A.A.; FAHD, M.I.; AFIFI, S.M.; ABDALLAH, S.; BAHR, S. Microbiological and beach sand quality in Gaza Strip in comparison to seawater quality. *Environmental Research*, v. 99, p. 1 – 10, 2005.

ESPÍRITO SANTO, L.C. Ocorrência, susceptibilidade à antifúngicos e fatores de virulência de populações de *Candida albicans* e outras leveduras oportunistas isoladas de ambientes aquáticos de Minas Gerais. 2014. 137 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

ESTRADA-BARRAZAA, D.; MARTÍNEZA, A.D.; FLORES-PADILLA, L.; ELIAS, R.M.; SÁNCHEZ-VARGASA, L. O. Comparación entre métodos convencionales, ChromAgar Candida® y el método de la PCR para la identificación de especies de *Candida* en aislamientos clínicos. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 28, n. 1, p. 36 – 42, 2011.

EU (European Union). Directive 2006/7/EC of the European Parliament and of the Council of 15 February 2006 concerning the management of bathing water quality and repealing directive 76/160/EEC, *Official Journal of the European Union*, v. 64, p. 37–51, 2006.

FALAGAS, M. E.; APOSTOLOU, K. E.; PAPPAS, V. D. Attributable mortality of candidemia: a systematic review of matched cohort and case-control studies. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 25, p. 419–425, 2006.

FALAGAS, M.E.; ROUSSOS, N.; VARDAKAS, K.Z. Relative frequency of albicans and the various non-*albicans* *Candida* spp. among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. *International Journal of Infectious Disease*, v. 14, n. 11, e954 – e966, 2010.

FELL, J. W.; AHEARN, D. G.; MEYERS, S. P.; ROTH, F. J. Isolation of yeasts from Biscayne Bay, Florida and adjacent benthic areas. *Limnology and Oceanography*, v. 5, p. 366 – 371, 1960.

FELL, J.W. Yeasts in marine environment. In: JONES, E.B.G.; PANG, K. (Eds.) *Marine fungi and fungal-like organisms*. Berlin: De Gruyter, p. 91 - 102, 2012.

FERGUSON, D.; SIGNORETTO, C. Environmental persistence and naturalization of fecal indicator organisms. In: HAGEDORN, C.; BLANCH, A.R.; HARWOOD, V.J. (Eds.) *Microbial Source Tracking: Methods, Applications, and Case Studies*. New York, Springer, p. 379-397, 2011.

FLEISHER, J.M.; FLEMING, L.E.; SOLO-GABRIELE, H.M.; KISH, J.K.; SINIGALLIANO, C.D.; PLANO, L.; ELMIR, S.M.; WANG, J.D.; WITHUM, K.; SHIBATA, T.; GIDLEY, M.L.; ABDELZAHER, A.; HE, G.; ORTEGA, C.; ZHU, X.; WRIGHT, M.; HOLLENBECK, J.; BACKER, L.C. The Beaches Study: health effects and exposures from non-point source microbial contaminants in subtropical recreational marine waters. *International Journal of Epidemiology*, v. 39, p. 1291 – 1298, 2010.

FLEMING, R.V.; WALSH, T.J.; ANAISSIE, E.J. Emerging and less common fungal pathogens. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 16, p. 915 – 933, 2002.

FRANCIS, M. A preliminary investigation of marine yeast biodiversity in New Zealand waters. 2013. 156 p. Master thesis (Master of Science) - Victoria University of Wellington, Wellington, New Zealand, 2013.

GADANHO, M.; ALMEIDA, J.; SAMPAIO, J.P. Assessment of yeast diversity in a marine environment in the south of Portugal by microsatellite-primed PCR. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 84, p. 217 – 227, 2003.

GHANNOUM, M. A. Is antifungal susceptibility testing useful in guiding fluconazole therapy? *Clinical Infectious Diseases*, v. 22, p. 161 – 165, 1996.

GHANNOUM, M. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 13, p. 122 – 143, 2000

GILLUM, A.M.; TSAY, E.Y.H.; KIRSCH, D.R. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Molecular and General Genetics*, v. 198, n.1, p. 179 – 182, 1984.

GILMAN, A. G. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 9a ed. Rio de Janeiro, McGraw-Hill Interamericana, 1436 p., 1996.

GOZALBO, D.; ROIG, P.; VILLAMÓN, E.; GIL, M. L. *Candida* and Candidiasis: The cell wall as a potential molecular target for antifungal therapy. *Current Drug Targets - Infectious Disorders*, v. 4, p. 117–135, 2004.

GRIFFIN, D.W.; LIPP, E.K.; MCLAUGHLIN, M.R.; ROSE, J.B. Marine Recreation and Public Health Microbiology: Quest for the Ideal Indicator. *BioScience*, v. 51, n. 10, p. 817 - 825, 2001.

GRIFFIN, D.W.; DONALDSON, K.A.; PAUL, J.H.; ROSE, J.B. Pathogenic human viruses in coastal waters. *Clinical Microbiology Reviews*, v.16, n. 1, p. 129 - 143, 2003.

GROENEWALD, M.; BOEKHOUT, T.; NEUVÉGLISE, C.; GAILLARDIN, C.; VAN DIJCK, P. W.; WYSS, M. *Yarrowia lipolytica*: Safety assessment of an oleaginous

yeast with a great industrial potential. *Critical Reviews in Microbiology*, p. 1 - 20, 2013.

GUO, L.; XIAO, M.; KONG, F.; CHEN, S.C.; WANG, H.; SORRELL, T.C.; JIANG, W.; DOU, H.; LI, R.; XU, Y. Three-locus identification, genotyping, and antifungal susceptibilities of medically important *Trichosporon* species from China. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 49, n. 11, p. 3805 – 3811, 2011.

HAGLER, A.N.; MENDONÇA-HAGLER, L.C. Yeasts from marine and estuarine waters with different levels of pollution in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 41, n. 1, p. 173 – 178, 1981.

HAGLER, A. L.; AHEARN, D. G. Ecology of aquatic yeasts. In: ROSE, A. H., HARRISON, J. S. *The Yeasts*, 2nd ed., v. 1, London: Academic Press, p. 181 – 205, 1987.

HAGLER, A.N. Yeasts as indicators of environmental quality. In: ROSA, C. A.; PÉTER, G. (Eds.) *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Germany: Springer Berlin Heidelberg, p. 515 – 532, 2006.

HAILE, R.W.; WITTE, J.S.; GOLD, M.; CRESSEY, R.; MCGEE, C.; MILLIKAN, R.C.; GLASSER, A.; HARAWA, N.; ERVIN, C.; HARMON, P.; HARPER, J.; DERMAND, J.; ALAMILLO, J.; BARRETT, K.; NIDES, M.; WANG, G. The health effects of swimming in ocean water contaminated by storm drain runoff. *Epidemiology*, v. 10, p. 355 – 363, 1999.

HALLER, L.; AMEDEGNATO, E.; POTÉ, J.; WILDI, W. Influence of freshwater sediment characteristics on persistence of fecal indicator bacteria. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 203, n. 1 – 4, p. 217 – 227, 2009.

HALLIDAY, E.; GAST, R.J. Bacteria in beach sands: an emerging challenge in protecting coastal water quality and bather health. *Environmental Science & Technology*, v. 45, p. 370 – 379, 2011.

HANCOCK, L.E.; GILMORE, M.S. Pathogenicity of enterococci. In: FISCHETTI, V.A.; NOVICK, R.P.; FERRETTI, J.J.; PORTNOY, D.A.; ROOD, J.I. (eds.) Gram-positive pathogens. Washington: ASM Press; p. 299 – 311, 2006.

HARTZ, A.; CUVELIER, M.; NOWOSIELSKI, K.; BONILLA, T.D.; GREEN, M.; ESIOBU, N.; MCCORQUODALE, D.S.; ROGERSON, A. Survival potential of *Escherichia coli* and Enterococci in subtropical beach sand: implications for water quality managers. *Journal of Environmental Quality*, v. 37, n. 3, p. 898 – 905, 2008.

HEANEY, C.D.; SAMS, E.; WING, S.; MARSHALL, S.; BRENNER, K.; DUFOUR, A.P.; WADE, T.J. Contact with beach sand among beachgoers and risk of illness. *American Journal of Epidemiology*, v. 170, n. 2, p. 164 – 172, 2009.

HEANEY, C.D.; SAMS, E.; DUFOUR, A.P.; BRENNER, K.P.; HAUGLAND, R.A.; CHERN, E.; WING, S.; MARSHALL, S.; LOVE, D.C.; SERRE, M.; NOBLE, R.; WADE, T.J. Fecal indicators in sand, sand contact, and risk of enteric illness among beachgoers. *Epidemiology*, v. 23, n. 1, p. 95 – 106, 2012.

JUNQUEIRA, J.C.; VILELA, S.F.; ROSSONI, R.D.; BARBOSA, J.O.; COSTA, A.C.B.; RASTEIRO, V.; SULEIMAN, J.M.A.H; JORGE, A. O. C. Oral colonization by yeasts in HIV-positive patients in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 54, n. 1, p. 17-24, 2012.

KANDASAMY, K.; ALIKUNHI, N. M.; SUBRAMANIAN, M. Yeasts in marine and estuarine environments. *Journal of Yeast and Fungal Research*, v. 3, n. 6, p. 74 - 82, 2012.

KIMURA, L. H.; PEARSALL, N. N. Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. *Infectious Immunology*, v.21, p. 64 – 68, 1978.

KINZELMAN, J.; NG, C.; JACKSON, E.; GRADUS, S.; BAGLEY, R. Enterococci as indicators of Lake Michigan recreational water quality: comparison of two

methodologies and their impacts on public health regulatory events. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, p. 92 – 96, 2003.

KOHLMEYER, J., KOHLMEYER, E. (Eds.). *Marine Mycology: The Higher Fungi*. New York, Academic Press, 1979.

KRCMERY, V.; BARNES, A. J. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *Journal of Hospital Infection*, v. 50, n. 4, p. 243 - 260, 2002.

KUHN, D.M.; GHANNOUM, M.A. *Candida biofilms*: antifungal resistance and emerging therapeutic options. *Current Opinion in Investigational Drugs* (London, England: 2000), v. 5, n. 2, p. 186 - 197, 2004.

KURTZMAN, C.P; FELL, J.W. (Eds), *The yeasts - a taxonomic study*. 4th Edition. Amsterdam: Elsevier, 1055 p., 1998.

KURTZMAN, C. P.; ROBNET, C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 73, p. 331–371, 1998.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. Yeast systematics and phylogeny - implications of molecular identification methods for studies in ecology. In: ROSA, C.A.; PETER, G. (Eds.) *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Germany: Springer Berlin Heidelberg, p. 11 – 30, 2006.

KURTZMAN, C.P; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. (Eds.) *The yeasts – a taxonomic study*. 5th edition. Amsterdam: Elsevier Science. Volume 1, 290 p., 2011.

KUTTY, S.N.; PHILIP, R. Marine yeasts — a review. *Yeast*, v. 25, p. 465–483, 2008.

LAI, C.; GAU, S.; HSUEH, P. Fungemia caused by non-*Candida* species. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 45, n. 3, p. 262 – 263, 2012.

LEE, Y.; WU, H.; HSU, C.; LIANG, H.; YUAN, C.; JANG, H. A rapid and selective method for monitoring the growth of coliforms in milk using the combination of amperometric sensor and reducing of methylene blue. *Sensors and Actuators B*, v. 141, p. 575 – 580, 2009.

LIPP, E.K.; FARRAH, S.A.; ROSE, J.B. Assessment and impact of microbial fecal pollution and human enteric pathogens in a coastal community. *Marine Pollution Bulletin*, v. 42, n. 4, p. 286-293, 2001.

LO, H.J.; KOHLER, J.R.; DIDOMENICO, B.; LOEBENBERG, D.; CACCIAPOUTI, A.; FINK, G.R. Nonfilamentous *Candida albicans* mutants are avirulent. *Cell*, v. 90, n. 5, p. 939 - 949, 1997.

LOCKHART, S.R.; MESSER, S.A.; PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. *Lodderomyces elongisporus* masquerading as *Candida parapsilosis* as a cause of blood stream infections. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 46, n. 1, p. 374 – 376, 2008.

LOUREIRO, S.T.A.; CAVALCANTI, M.A.Q.; NEVES, R.P.; PASSAVANTE, J.Z.O. Yeasts isolated from sand and sea water in beaches of Olinda, Pernambuco state, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 36, p. 333 – 337, 2005.

LUNARDI, L.W.; AQUINO, V.R.; ZIMERMAN, R.A.; GOLDANI, L.Z. Epidemiology and outcome of *Rhodotorula* fungemia in a tertiary care hospital. *Clinical Infectious Diseases*, v. 43, p. e60 – e63, 2006.

LYON, J.P.; RESENDE, M.A. Evaluation of adhesion to buccal epithelial cells in *Candida* species obtained from denture wearers after exposure to fluconazole. *Mycoses*, v. 50, p. 21- 24, 2007.

MAIDAN, M. M.; DE ROP, L.; SERNEELS, J.; EXLER, S.; RUPP, S.; TOURNU, H.; THEVELEIN, J.M.; VAN DIJCK, P. The G protein-coupled receptor Gpr1 and the Ga protein Gpa2 act through the cAMP-PKA pathway to induce morphogenesis in *Candida albicans*. *Molecular Biology of the Cell*, v. 16, p. 1971–1986, 2005.

MAIDAN, M.M.; DE ROP, L.; RELLOSO, M.; DIEZ-OREJAS, R.; THEVELEIN, J.M.; VAN DIJCK, P. Combined inactivation of the *Candida albicans* GPR1 and TPS2 genes results in avirulence in a mouse model for systemic infection. *Infection and Immunity*, v. 76, n. 4, p. 1686 - 1694, 2008.

MALLIN, M.A.; WILLIAMS, K.E.; ESHAM, E.C.; LOWE, R.P. Effect of human development on bacteriological water quality in coastal watersheds. *Ecological Applications*, v. 10, n. 4, p. 1047–1056, 2000.

MARR, K. A.; SEIDEL, K.; WHITE, T. C.; BOWDEN, R. A. Candidemia in allogeneic blood and marrow transplant recipients: evolution of risk factors after the adoption of prophylactic fluconazole. *Journal of Infectious Disease*, v. 181, p. 309–316, 2000.

MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycosis: the dimension of the problem of a neglected disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 43, n. 4, p. 480 – 480, 2010.

MATES, A. Quatitative determination of *Candida albicans* in sea water. *Microbios*, v. 79, p. 27 – 30, 1994.

MAYER, F.L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, v. 4, n. 2, p. 119 - 128, 2013.

MC CULLOUGH, M. J.; ROSS, B. C.; READE, P. C. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 25, p. 136 – 144, 1996.

MEDEIROS, A.O.; KOHLER, L.M.; HAMDAN, J.S.; MISSAGIA, B.S.; BARBOSA, F.A.R.; ROSA, C.A. Diversity and antifungal susceptibility of yeasts from tropical freshwater environments in Southeastern Brazil. *Water Research*, v. 42, p. 3921 – 3929, 2008.

MEDEIROS, A.O.; MISSAGIA, B.S.; BRANDÃO, L.R.; CALLISTO, M.; BARBOSA, F.A.R.; ROSA, C.A. Water quality and diversity of yeasts from tropical lakes and rivers from the Rio Doce basin in southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, p. 1582 - 1594, 2012.

MENDES, B. Microbiologia da água. In: FERREIRA, W.F.C; SOUSA, J.C.F.; LIMA, N. (eds.) Microbiologia. Lisboa: Lidel-Edições técnicas, p. 506-522, 2010.

MESSENGUY, F.; ANDRÉ, B.; DUBOIS, E. Diversity of nitrogen metabolism among yeast species: regulatory and evolutionary aspects. In: ROSA, C. A.; PÉTER, G. (Eds.) Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. Germany: Springer Berlin Heidelberg, p. 123– 153, 2006.

MESSER, S.A.; JONES, R.N.; FRITSCHÉ, T.R. International surveillance of *Candida* spp. and *Aspergillus* spp.: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2003). *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, p. 1782 – 1787, 2006.

MICELI, M.H.; DÍAZ, J.A.; LEE, S.A. Emerging opportunistic yeast infections. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 11, n. 2, p. 142 - 151, 2011.

MISHRA, N. N.; PRASAD, T.; SHARMA, N.; PAYASI, A.; PRADAS, R.; GUPTA, D. K.; SINGH, R. Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, v.54, n. 3, p. 201–235, 2007.

MORAN, C.; GRUSSEMEYER, C. A.; SPALDING, J. R.; BENJAMIN, D. K.; REED, S. D. *Candida albicans* and non-*albicans* bloodstream infections in adult and pediatric patients: comparison of mortality and costs. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 28, p. 433-435, 2009.

MOTTA, A. L.; ALMEIDA, G. M. D. D.; ALMEIDA JÚNIOR, J. N. D.; BURATTINI, M. N.; ROSSI, F. Candidemia epidemiology and susceptibility profile in the largest Brazilian teaching hospital complex. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 14, n. 5, p. 441 - 448, 2010.

MOWAT, E.; BUTCHER, J.; LANG, S.; WILLIAMS, C.; RAMAGE, G. Development of a simple model for studying the effects of antifungal agents on multicellular communities of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Medical Microbiology*, v. 56, n. 9, p. 1205 – 1212, 2007.

MUDRYK, Z.J.; PERLIŃSKI, P.; SKÓRCZEWSKI, P.; WIELGAT, M.; ZDANOWICZ, M. Distribution and abundance of microflora in sandy beaches on the southern coast of the Baltic Sea. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, v. 42, n. 3, p. 324 - 331, 2013.

MUNN, C.B. (ed.). Marine eukaryotic microbes. In: *Marine Microbiology – Ecology and its applications*. London: Garland Science BIOS Scientific Publishers, p.135–136, 2004.

NAGAHAMA, T. Yeast biodiversity in freshwater, marine and deep-sea environments. In: ROSA, C. A.; PÉTER, G. (Eds.) *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Germany: Springer Berlin Heidelberg, p. 241 – 262, 2006.

NAGLIK, J.R.; CHALLACOMBE, S.J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 67, n. 3, p. 400 – 428, 2003.

NANBAKHSH, H.; DIBA, K.; HAZARTI, K. Study of fungal contamination of indoor public swimming pools. *Iranian Journal of Public Health*, v. 33, n. 1, 2004.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility test for yeasts. Approved standard - NCCLS document M7-A2, v. 22, n. 15, 51 p., 2002.

NOBLE, R.T.; FUHRMAN, J.A. Enteroviruses detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction from the coastal waters of Santa Monica Bay, California: low correlation to bacterial indicator levels. *Hydrobiologia*, v. 460, p. 175 – 184, 2001.

NUCCI, M.; COLOMBO, A.L. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 58, n. 1, p. 77 – 82, 2007.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; ALVARADO-MATUTE, T.; TIRABOSCHI, I.N.; CORTES, J.; ZURITA, J.; GUZMAN-BLANCO, M.; SANTOLAYA, M.E.; THOMPSON, L.; SIFUENTES-OSORNIO, J.; ECHEVARRIA, J.I.; COLOMBO, A.L. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *Plos One*, v. 8, n. 3, e59373, 2013.

OKSUZ, S.; SAHIN, I.; YILDIRIM, M.; GULCAN, A.; YAVUZ, T.; KAYA, D.; KOC, A. N. Phospholipase and proteinase activities in different *Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, v. 60, n. 5, p. 280 - 283, 2007.

PANDA, A.; DAS, H.; DEB, M.; KHANAL, B.; KUMAR, S. *Aureobasidium pullulans* keratitis. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, v. 34, n. 3, p. 260 – 264, 2006.

PANIZO, M.M.; REVIÁKINA, V.; FLORES, Y.; MONTES, W.; GONZÁLEZ, G. Actividad de fosfolipasas y proteasas en aislados clínicos de *Candida* spp. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, v. 25, n. 2, p. 88-95, 2005.

PAPADAKIS, J.A.; MAVRIDOU, A.; RICHARDSON, S.C.; LAMPIRI, M.; MARCELOU, U. Bather-related microbial and yeast populations in sand and seawater. *Water Research*, v. 31, n. 4, p. 799 – 804, 1997.

PAPHITOU, N.I.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PAETZNICK, V.L.; RODRIGUEZ, J.R.; CHEN, E.; REX, J.H. *In vitro* antifungal susceptibilities of *Trichosporon* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, n. 4, p. 1144 – 1146, 2002.

PAYMENT, P.; FRANCO, E. *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking-water treatment for viruses and protozoan cysts. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, p. 2418 – 2424, 1993.

PFALLER, M.A.; HOUSTON, A.; COFFMANN, S. Application of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *Journal Of Clinical Microbiology*, v. 34, n. 1, p. 58 – 61, 1996.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 10, p. 4419 - 4431, 2004.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 20, p. 133–163, 2007.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; GIBBS, D.L.; NEWELL, V.A.; MEIS, J.F.; GOULD, I.M.; FU, W.; COLOMBO, A.L.; RODRIGUEZ-NORIEGA, E. and the Global Antifungal Surveillance Group. Results from the ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, n. 12, p. 1735 – 1745, 2007.

PFALLER, M.; NEOFYTOS, D.; DIEKEMA, D.; AZIE, N.; MEIER-KRIESCHE, H.U.; QUAN, S.P.; HORN, D. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) registry, 2004-2008. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 74, n. 4, p. 323 – 331, 2012.

PINTO, A.B.; OLIVEIRA, A.J.F.C. Diversidade de microrganismos indicadores utilizados na avaliação da contaminação fecal de areias de praias recreacionais marinhas: estado atual do conhecimento e perspectivas. *O Mundo da Saúde*, v. 35, n.1, p.105-114, 2011.

PINTO, K.C.; HACHICH, E.M.; SATO, M.I.Z.; DI BARI, M.; COELHO, M.C.L.S.; MATTÉ, M.H.; LAMPARELLI, C.C.; RAZZOLINI, M.T.P. Microbiological quality assessment of sand and water from three selected beaches of South Coast, São Paulo State, Brazil. *Water Science & Technology*, p. 2475 – 2482, 2012.

POTERA, C. Forging a link between biofilms and disease. *Science*, v. 283, n. 5409, p. 1837 – 1838, 1999.

PRADO, M.; SILVA, M. B.; LAURENTI, R.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 513 -521, 2009.

PRESCOTT, L.M.; HARLEY, J.P.; KLEIN, D.A. Microbiology. 4th Edition. WCB McGraw-Hill, Boston. 962 pp, 1999.

PRIETO, M.D.; LOPEZ, B.; JUANES, J.A.; REVILLA, J.A.; LLORCA, J.; DELGADO-RODRÍGUEZ, M. Recreation in coastal waters: health risks associated with bathing in sea water. *Journal of Epidemiology & Community Health*, v. 55, p. 442 – 447, 2001.

PRUSS, A. Review of epidemiological studies on health effects from exposure to recreational water. *International Journal of Epidemiology*, v. 27, p. 1 – 9, 1998.

RAMAGE, G.; SAVILLE, S.P.; THOMAS, D.P.; LÓPEZ-RIBOT, J.L. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryotic Cell*, v. 4, n. 4, p. 633 - 638, 2005.

RAMAGE, G.; MARTÍNEZ, J.P.; LÓPEZ-RIBOT, J.L. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Research*, v. 6, n. 7, p. 979 - 986, 2006.

RIBEIRO, E. L.; GUIMARÃES, R. I.; INÁCIO, M. C. C.; FERREIRA, W. M.; CARDOSO, C. G.; DIAS, S. M. S.; NAVES, P. L. F. Aspectos das leveduras de *Candida* vinculadas as infecções nosocomiais. *NewsLab*, v. 64, p. 106 – 124, 2004.

RIBEIRO, P. M.; KOGA-ITO, C. Y.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A. O. C. Isolamento de *Candida* spp. com utilização de meio de cultura cromogênico CHROMagar-Candida. *Brazilian Dental Science*, v. 12, n. 4, p. 40 - 45, 2009.

RICICOVA, M.; KUCHARIKOVA, S.; TOURNU, H.; HENDRIX, J.; BUDJAKOVA, H.; VAN ELDERE, J.; LAGROU, K.; VAN DIJCK, P. *Candida albicans* biofilm formation in a new *in vivo* rat model. *Microbiology*, v. 156, n. 3, p. 909–919, 2010.

RIO DE JANEIRO. Resolução SMAC Nº. 468 de 28 de janeiro de 2010. Dispõe sobre a análise e informações das condições das areias das praias no Município do Rio de Janeiro. Diário Oficial da Prefeitura do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, ano XXIII, n. 211, 84 p., 29 de janeiro de 2010.

RIOTUR (Empresa de Turismo do Município do Rio de Janeiro). Disponível em <http://www.rio.rj.gov.br/web/riotur/exibeconteudo?article-id=106718>. Data de acesso: 27 de junho de 2012.

ROBERTSON, W.J.; TOBIN, R.S. The relationship between three potential pathogens and pollution indicator organisms in Nova Scotian coastal waters. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 29, p. 1261– 1269, 1983.

RODRIGUES, F; LUDOVICO, P.; LEÃO, C. Sugar metabolism in yeasts : an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism. In: ROSA, C. A.; PÉTER, G. (Eds.) Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. Germany: Springer Berlin Heidelberg, p. 101– 121, 2006.

RODRÍGUEZ-ANGELES, G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*, v. 44, p. 9-15, 2002.

ROSA, C.A.; RESENDE, M.A.; FRANZOT, S.P.; MORAIS, P.B.; BARBOSA, F.A.R. Distribuição de leveduras e coliformes em um lago do Karst do Planalto de Lagoa Santa-MG, Brasil. *Revista de Microbiologia*, v. 21, n. 1, p. 19 - 24, 1990.

RUAN, S.; CHIEN, J.; HSUEH, P. Invasive trichosporonosis caused by *Trichosporon asahii* and other unusual *Trichosporon* species at a medical center in Taiwan. *Clinical Infectious Diseases*, v. 49, n. 1, e11 - e17, 2009.

SABINO, R.; VERÍSSIMO, C.; BRANDÃO, J.; ALVES, C.; PARADA, H.; ROSADO, L.; PAIXÃO, E.; VIDEIRA, Z.; TENDEIRO, T.; SAMPAIO, P.; PAIS, C. Epidemiology of candidemia in oncology patients: a 6-year survey in a Portuguese central hospital. *Medical Mycology*, v. 48, p. 346 – 354, 2010.

SABINO, R.; VERÍSSIMO, C.; CUNHA, M.A.; WERGIKOSKI, B.; FERREIRA, F.C.; RODRIGUES, R.; PARADA, H.; FALCÃO, L.; ROSADO, L.; PINHEIRO, C.; PAIXÃO, E.; BRANDÃO, J. Pathogenic fungi: an unacknowledged risk at coast resorts? New insights on microbiological sand quality in Portugal. *Marine Pollution Bulletin*, v. 62, p. 1506-1511, 2011.

SAMBROOK, J. & RUSSEL, D.W. Molecular cloning, a laboratory manual. 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova York, 800 p.,2006.

SAMPAIO, J. P.; GADANHO, M.; SANTOS, S.; DUARTE, F. L.; PAIS, C.; FONSECA, A.; FELL, J. W. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodospordium*: *Rhodospordium kratochvilovae* and related anamorphic species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 51, p. 687-697, 2001.

SARDI, J.C.O.; GULLO, F.; PITANGUI, N.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. *In vitro* antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolates from patients with chronic periodontitis and diabetes. *Clinical Microbiology*, v. 2, p. 103, 2013.

SATO, M.I.Z.; DI BARI, M.; LAMPARELLI, C.C.; TRUZZI, A.C.; COELHO, M.C.L.S.; HACHICH, E.M. Sanitary quality of sands from marine recreational beaches of São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 36, p. 321 – 326, 2005.

SAUNTE, D.M.; TARAZOOIE, B.; ARENDRUP, M.C.; DE HOOG, G.S. Black yeast-like fungi in skin and nail: it probably matters. *Mycoses*, v. 55, n. 2, 2011.

SAVINI, V.; CATAVITELLO, C.; ONOFRILLO, D.; MASCIARELLI, G.; ASTOLFI, D.; BALBINOT, A.; FEBBO, F.; D'AMARIO, C.; D'ANTONIO, D. What do we know about *Candida guilliermondii*? A voyage throughout past and current literature about this emerging yeast. *Mycoses*, v. 54, n. 5, p. 434 – 441, 2011.

SCHWAB, K.J. Are existing bacterial indicators adequate for determining recreational water illness in waters impacted by nonpoint pollution? *Epidemiology*, v. 18, n. 1, p. 21-22, 2007.

SCOTT, T.M.; ROSE, J.B.; JENKINS, T.M.; FARRAH, S.R.; LUKASIK, J. Microbial source tracking: current methodology and future directions. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, p. 5796 – 5803, 2002.

SENEVIRATNE, C. J.; JIN, L.; SAMARANAYAKE, L. P. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral Diseases*, v. 14, p. 582–590, 2008.

SETU-PR (Secretaria de Estado do Turismo – Estado do Paraná)^a. Estudo da demanda turística litoral-PR 2000-2006. 30 p., 2008.

SETU-PR (Secretaria de Estado do Turismo – Estado do Paraná)^b. Plano estratégico de desenvolvimento do Turismo Regional 2008-2011. Região turística - litoral do Paraná. 33 p., 2008.

SHAABAN, H.; CHOO, H.F.; BOGHOSSIAN, J.; PEREZ, G. *Kodamaea ohmeri* fungemia in an immunocompetent patient treated with micafungin: case report and review of the literature. *Mycopathologia*, v. 170, p. 223 – 228, 2010.

SHAH, A. H.; ABDELZAHER, A. M.; PHILLIPS, M.; HERNANDEZ, R.; SOLO-GABRIELE, H. M.; KISH, J.; SCORZETTI, G.; FELL, J. W.; DIAZ, M. R.; SCOTT, T. M.; LUKASIK, J.; HARWOOD, V. J.; MCQUAIG, S.; SINIGALLIANO, C.D.; GIDLEY, M. L.; WANLESS, D.; AGER, A.; LUI, J.; STEWART, J. R.; PLANO, L. R. W.; FLEMING, L. E. Indicator microbes correlate with pathogenic bacteria, yeasts and helminthes in sand at a subtropical recreational beach site. *Journal of Applied Microbiology*, v. 110, p. 1571 – 1583, 2011.

SHANG, S.T.; LIN, J.C.; HO, S.J.; YANG, Y.S.; CHANG, F.Y.; WANG, N.C. The Emerging life-threatening opportunistic fungal pathogen *Kodamaea ohmeri*: optimal treatment and literature review. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 43, n. 3, p. 200 - 206, 2010.

SHEIKH, N.; JAHAGIRDAR, V.; KOTHADIA, S.; NAGOBA, B. Antifungal drug resistance in *Candida* species. *European Journal of General Medicine*, v. 10, n. 4, p. 254 – 258, 2013.

SHERRY, J. P.; KUCHMA, S. R.; DUTKA, B. J. The occurrence of *Candida albicans* in lake Ontario bathing beaches. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 25, p. 1036 – 1044, 1979.

SHERRY, J. P.; QURESCHI, A. A. Isolation and enumeration of fungi using membrane filtration. In: DUTKA, B. J. (Ed.). *Membrane Filtration—Applications, Techniques, and Problems*. Marcel Dekker, New York, p. 189 – 212, 1981.

SHIBATA, T.; SOLO-GABRIELE, H.M.; FLEMING, L.E.; ELMIR, S. Monitoring marine recreational water quality using multiple microbial indicators in an urban tropical environment. *Water research*, v. 38, n. 13, p. 3119 - 3131, 2004.

SHIBATA, T.; SOLO-GABRIELE, H.M. Quantitative Microbial Risk Assessment of Human Illness from exposure to marine beach sand. *Environmental Science & Technology*, v. 46, p. 2799 – 2805, 2012.

SHUVAL, H. Estimating the global burden of thalassogenic diseases: human infectious diseases caused by wastewater pollution of the marine environment. *Journal of Water and Health*, v. 2, p. 53 – 64, 2003.

SIFUENTES-OSORNIO, J.; CORZO-LEÓN, D.E.; PONCE-DE-LEÓN, L.A. Epidemiology of invasive fungal infections in Latin America. *Current Fungal Infection Reports*, v. 6, n. 1, p. 23 – 34, 2012.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 36, n. 2, p. 288 – 305, 2012.

SINGH, G.; SHIVAPRAKASH, M.R.; DE, D.; GUPTA, P.; Gupta, S.; KANWAR, A.J.; CHAKRABARTI, A. Chronic disfiguring facial lesions in an immunocompetent patient due to *Exophiala spinifera*: a case report and review of literature. *Mycopathologia*, v. 174, n. 4, p. 293 – 299, 2012.

SINIGALLIANO, C.D.; FLEISHER, J.M.; GIDLEY, M.L.; SOLO-GABRIELE, H.M.; SHIBATA, T.; PLANO, L.R.W.; ELMIR, S.M.; WANLESS, D.; BARTKOWIAK, J.; BOITEAU, R.; WITHUM, K.; ABDELZAHER, A.M.; HE, G.; ORTEGA, C.; ZHU, X.; WRIGHT, M.E.; KISH, J.; HOLLENBECK, J.; SCOTT, T.; BACKER, L.C.; FLEMING, L.E. Traditional and molecular analyses for fecal indicator bacteria in non-point source subtropical recreational marine waters. *Water Research*, v. 44, p. 3763 – 3772, 2010.

SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidosis. *Lancet*, v. 369, p. 1961-71, 2007.

SOLO-GABRIELE, H.M.; WOLFERT, M.A.; DESMARAIS, T.R.; PALMER, C.J. Sources of *Escherichia coli* in a coastal subtropical environment. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 1, p. 230 – 237, 2000.

SOTERO-MARTINS, A.; DUARTE, A. N.; CARVAJAL, E.; DE MOURA SARQUIS, M. I.; FERNANDES, O. C. C. Controle da qualidade microbiológica e parasitária em áreas de recreação. *Gestão e Saúde*, v. 4, n. 3, p. 1084 – 1101, 2013.

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *Biomed Research International*, v. 2013, ID 204237, 13 p., 2013.

SUDBERY, P.E. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nature Reviews Microbiology*, v. 9, n. 10, p. 737 - 748, 2011.

SUGITA, T.; KUROSAKA, S.; YAJITATE, M.; SATO, H.; NISHIKAWA, A. Extracelular proteinase and phospholipase activity of three genotypic strains of a human pathogenic yeast, *Candida albicans*. *Microbiology and Immunology*, v. 46, p. 881 – 883, 2002.

TAKESUE, Y.; KAKEHASHI, M.; OHGE, H.; IMAMURA, Y.; MURAKAMI, Y.; SASAKI, M.; MORIFUJI, M.; YOKOYAMA, Y.; KOUYAMA, M.; YOKOYAMA, T.; SUEDA, T. Combined assessment of beta-D-glucan and degree of *Candida* colonization before starting empiric therapy for candidiasis in surgical patients. *World Journal of Surgery*, v. 28, p. 625–630, 2004.

TALLON, P.; MAGAJNA, B.; LOFRANCO, C.; LEUNG, K. Microbial indicators of fecal contamination in water: a current perspective. *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 166, p. 139 – 166, 2005.

TOURNU, H.; VAN DIJCK, P. *Candida* biofilms and the host: models and new concepts for eradication. *International Journal of Microbiology*, v. 12, p. 1-16, 2012.

TROFA, D.; GÁCSEK, A.; NOSANCHUK, J.D. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 21, p. 606 – 625, 2008.

TUON, F.F.; COSTA, S.F. *Rhodotorula* infection. A systematic review of 128 cases from literature. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 25, p. 135 – 140, 2008.

UPPULURI, P.; CHATURVEDI, A. K.; SRINIVASAN, A.; BANERJEE, M.; RAMASUBRAMANIAM, A. K.; KÖHLER, J. R.; KADOSH, D.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. *Plos Pathogens*, v. 6, n. 3, p. 1-13, 2010.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). Action plan for beaches and recreational waters. Office of Research and Development and Office of Water, Washington, DC, 27 p., 1999.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). Recreational water quality criteria. U.S. EPA Office of Water, Document 820-F-12-058, Washington, D.C., 2012.

VAN DIJCK, P.; DE ROP, L.; SZLUFCHIK, K.; VAN AEL, E.; THEVELEIN, J.M. Disruption of the *Candida albicans* TPS2 gene encoding trehalose-6- phosphate phosphatase decreases infectivity without affecting hypha formation. *Infection and Immunity*, v. 70, p. 1772–1782, 2002.

VANHONI, F; MENDONÇA, F. O clima do litoral do estado do Paraná. *Revista Brasileira de Climatologia*, p. 49-63, 2008.

VAZ, A.B.M.; ROSA, L.H.; VIEIRA, M.L.A.; GARCIA, V.; BRANDÃO, L.R.; TEIXEIRA, L.C.R.S.; MOLINÉ, M.; LIBKIND, D.; VAN BROOCK, M.; ROSA, C.A. The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.42, n.3, p. 937-947. 2011.

VIEIRA, R.H.S.F.; RODRIGUES, D.P; MENEZES, E.A.; EVANGELISTA, N.S.S.; REIS, E.M.F.; BARRETO, L.M.; GONÇALVES, F.A. Microbial contamination of sand from major beaches in Fortaleza, Ceará State, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 32, p. 77 – 80, 2001.

VIUDES, A.; PEMAN, J.; CANTON, E.; UBEDA, P.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; GOBERNADO, M. Candidemia at a tertiary-care hospital: epidemiology, treatment, clinical outcome and risk factors for death. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 21, p. 767–774, 2002.

VOGEL, C.; ROGERSON, A.; SCHATZ, S.; LAUBACH, H.; TALLMAN, A.; FELL, J. Prevalence of yeasts in beach sand at three bathing beaches in South Florida. *Water Research*, v. 41, p. 1915 – 1920, 2007.

WADE, T.J.; PAI, N.; EISENBERG, J.N.S.; COLFORD, J.M. Do U.S. Environmental Protection Agency Water Quality Guidelines for Recreational Waters prevent gastrointestinal illness? A systematic review and meta-analysis. *Environmental Health Perspectives*, v. 111, n. 8, p. 1102 – 1109, 2003.

WALKER, G.M. Yeasts. In: SCHAECHTER, M. (Ed.) Eukaryotic microbes. Amsterdam: Academic Press, p. 3-18, 2011.

WANG, L.; CHI, Z.; YUE, L.; CHI, Z.; ZHANG, D. Occurrence and diversity of *Candida* genus in marine environments. *Journal of Ocean University of China*, v. 7, n. 4, p. 416 – 420, 2008.

WHITMAN, R.L.; NEVERS, M.B. Foreshore sand as a source of *Escherichia coli* in nearshore water of a Lake Michigan beach. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, p. 5555 – 5562, 2003.

WILLIAMS, D. A.; LEMKE, T. L. Foye's Principles of Medicinal Chemistry. 5a ed. Philadelphia, Lippincot Williams & Wilkins. p.1114. 2002.

WIRTH, F.; GOLDANI, L.Z. Epidemiology of *Rhodotorula*: an emerging pathogen. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, v. 2012, ID 465717, 7 p., 2012.

WOOLLETT, L. L.; HEDRICK, L. R. Ecology of yeasts in polluted water. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 36, p. 427-435, 1970.

YAMAHARA, K.M.; SASSOUBRE, L.M.; GOODWIN, K.D.; BOEHMA, A.B.
Occurrence and persistence of bacterial pathogens and indicator organisms in beach
sand along the California coast. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, n. 6,
p. 1733 – 1745, 2012.