UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

GERLANE LUZIANA DE MARIA

DIVERSIDADE DE *CANDIDA* SPP. ISOLADAS DE SOLOS DE ÁREA CULTIVADA NA PRESENÇA DE AGROTÓXICOS E DA MATA NATIVA ADJACENTE: SENSIBILIDADE PLANCTÔNICA E DE BIOFILMES

FORTALEZA
2020

GERLANE LUZIANA DE MARIA

DIVERSIDADE DE *CANDIDA* SPP. ISOLADAS DE SOLOS DE ÁREA CULTIVADA NA PRESENÇA DE AGROTÓXICOS E DA MATA NATIVA ADJACENTE: SENSIBILIDADE PLANCTÔNICA E DE BIOFILMES

Dissertação apresentada a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Micologia Médica.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha
Co-orientadora: Prof[a]. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D32d de Maria, Gerlane Luziana.
Diversidade de Candida spp. isoladas de solos de área cultivada na presença de agrotóxicos e da mata nativa adjacente: Sensibilidade planctônica e de biofilmes / Gerlane Luziana de Maria. – 2020.
61 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2020.
Orientação: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha.
Coorientação: Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.

1. Azólicos agrícolas. 2. Levedura. 3. Sensibilidade antifúngica. 4. Biofilmes. I. Título.
CDD 616.9

GERLANE LUZIANA DE MARIA

DIVERSIDADE DE *CANDIDA* SPP. ISOLADAS DE SOLOS DE ÁREA CULTIVADA NA PRESENÇA DE AGROTÓXICOS E DA MATA NATIVA ADJACENTE: SENSIBILIDADE PLANCTÔNICA E DE BIOFILMES

Dissertação apresentada a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Micologia Médica.

Aprovada em: 29 /01/ 2020.

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha (Orientador)

Universidade Estadual do Ceará (UECE)

_____

Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas

Universidade Estadual do Ceará (UECE)

_____

Prof. Dr. Manoel Paiva de Araújo Neto

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE)

A Deus.

Aos meus pais, Luzani e Antônio.

Às minhas irmãs, Girlania e Erlania.

À minha sobrinha, Mirian.

Ao meu esposo, Charles.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica.

A CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, por sua orientação, paciência, ensinamentos e confiança nesta pesquisa.

À coordenação e aos professores do PPGMM, pelas oportunidades e partilha de conhecimento.

Ao Centro Especializado de Micologia Médica e aos professores que o compõem, Prof. Dr. Júlio Sidrim, Prof. Dr. Marcos Fábio Rocha, Profª. Dra. Sâmia Brilhante, Profª. Dra. Débora Castelo-Branco e Profª. Dra. Rossana Cordeiro, pela oportunidade de realização desse curso e pelos materiais que proporcionaram a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Waldemiro de Aquino Pereira-Neto, pelo estudo da estatística desta pesquisa.

Aos professores participantes da banca examinadora, Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas e Prof. Dr. Manoel Paiva de Araújo Neto, pela disponibilidade e pelas valiosas colaborações e sugestões.

Ao Prof. Dr. Manoel Paiva de Araújo Neto, agradeço o apoio, os ensinamentos e a confiança desde a sua orientação no Laboratório de Biologia Ambiental e Microbiologia – LABIAM.

À Profª. Dra. Gláucia Guedes e a Terezinha de Jesus, pelos ensinamentos, dedicação e amizade.

À secretária Carolinda Soares, por sempre está disposta a me ajudar.

Ao Renan Vasconcelos e ao Jonathas Sales por partilharem comigo conhecimentos e pelas colaborações e ao Santiago Gonçalves pela contribuição no inglês.

À Gessica Araújo, que me ajudou na execução desde o início e não mediu esforços para me ajudar na conclusão do meu mestrado. Sem sua ajuda esse trabalho teria sido muito mais difícil.

Aos demais amigos do CEMM, em especial a Xhaulla Maria, Wilker Perez, Jaiane Alves, Maria Gleiciane e José Alexandre. Obrigada pelo carinho, amizade e apoio.

Aos meus pais, Luzanir Andrade e Antônio Edilson; às minhas irmãs, Girlania Luziete e Erlania Sônia; à minha sobrinha, Patrícia Mirian; ao meu esposo, Charles Ribeiro; e

ao meu cunhado, Olinto Pereira, pelo suporte e amparo nos momentos difíceis, pelo incentivo e apoio dado durante toda minha vida acadêmica e por todo amor e compreensão.

A Deus, por ser meu suporte, minha fortaleza, e me dar coragem para que eu não desistisse.

RESUMO

Áreas de mata nativa, em virtude da demanda populacional, estão sendo destinadas aos diversos sistemas de cultivo. E para atender e manter a produtividade nas áreas agrícolas tem se intensificado o uso de agrotóxicos. Dentre esses agrotóxicos, estão os antifúngicos, em especial os derivados azólicos, que são amplamente utilizados devido ao baixo custo e ao amplo espectro de ação. Estes produtos podem causar impactos negativos no meio ambiente, levando a contaminação do solo e ao impacto na microbiota. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi identificar *Candida* spp. isoladas de solos de área cultivada com aplicação de agrotóxicos e da mata nativa adjacente, assim como investigar a sensibilidade planctônica e de biofilmes dessas leveduras a antifúngicos clínicos e agrícolas. Para isso, os isolados foram identificados por testes fenotípicos, bioquímicos e moleculares. As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de fluconazol, itraconazol, voriconazol, anfotericina B e dos antifúngicos agrícolas, tetraconazol e tebuconazol, foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo. A sensibilidade do biofilme a voriconazol, tetraconazol e tebuconazol foi avaliada através do ensaio de redução de XTT. Assim, no solo cultivado foram identificadas 24 cepas, sendo 14 *C. parapsilosis stricto sensu,* 5 *C. albicans,* 2 *C. tropicalis,* 1 *C. fermentati* e 2 *C. metapsilosis,* enquanto no solo da mata nativa foram identificadas 22 cepas, sendo 12 *C. parapsilosis stricto sensu,* 5 *C. albicans,* 1 *C. tropicalis,* 3 *C. fermentati* e 1 *C. orthopsilosis.* Os intervalos das CIMs para anfotericina B, azólicos clínicos e agrícolas foram de ≤0,03 a 0,5 µg/mL, ≤0,03 a 4 µg/mL e 1 a 128 µg/mL, respectivamente. Todas as cepas, independente da área de isolamento, foram classificadas em moderada ou forte formadoras de biofilmes. Os intervalos das concentrações inibitórias mínimas dos biofilmes ($CIMB_{50}$) para voriconazol, tetraconazol e tebuconazol foram encontrados em 3/21, 10/21 e 10/21 cepas, respectivamente, com intervalos de 128 a 1024 µg/mL. Em síntese, o solo apresenta uma diversidade de leveduras do gênero *Candida*, com destaque para o complexo *C. parapsilosis*. Ademais, uma cepa de *C. parapsilosis stricto sensu* foi resistente ao itraconazol e seis cepas de *C. albicans* e uma cepa de *C. parapsilosis stricto sensu* apresentaram *trailing* para os azólicos clínicos. Todas as leveduras apresentaram elevado potencial à formação de biofilmes que, no geral, se mantiveram menos tolerantes aos antifúngicos agrícolas tetraconazol e tebuconazol, quando comparados ao voriconazol.

Palavras-chave: Azólicos agrícolas. Levedura. Sensibilidade antifúngica. Biofilmes.

ABSTRACT

The native forest areas are exposed to various cultivation systems due to population demand. The use of pesticides has intensified to maintain productivity in agricultural areas. Among these pesticides are antifungals drugs, especially azole derivatives, which are widely used due to their low cost and broad spectrum. These products can impact the environment, leading to soil contamination and impacting the microbiota. Therefore, the aim was to identify *Candida* spp. isolated from soils of cultivated area with pesticides application and adjacent native forest, as well as to investigate the planktonic and biofilm susceptibility of these yeasts to clinical and agricultural antifungals. For this, the isolates were identified by phenotypic, biochemical and molecular assays. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of fluconazole, itraconazole, voriconazole, amphotericin B and agricultural antifungals tetraconazole and tebuconazole were determined by the broth microdilution method. The biofilm susceptibility to voriconazole, tetraconazole and tebuconazole was assessed by the XTT reduction assay. Thus, 24 strains were identified in the cultivated soil, wich were 14 *C. parapsilosis sensu stricto*, 5 *C. albicans*, 2 *C. tropicalis*, 1 *C. fermentati* and 2 *C. metapsilosis*. On the other hand, 22 strains were identified in native forest soil, wich were 12 *C. parapsilosis sensu stricto*, 5 *C. albicans*, 1 *C. tropicalis*, 3 *C. fermentati* and 1 *C. orthopsilosis*. The amphotericin B MICs and clinical and agricultural azole MICs ranged from ≤0.03 to 0.5 µg/mL, ≤0.03 to 4 µg/mL and 1 to 128 µg/mL, respectively. All strains were classified as moderate or strong biofilm-forming regardless of isolation area. The minimum inhibitory biofilm concentration ($BMICs_{50}$) for voriconazole, tetraconazole and tebuconazole were found in 3/21, 10/21 and 10/21 strains, respectively, with ranged from 128 to 1024 µg/mL. In summary, the soil has a diversity of *Candida* spp., especially the *C. parapsilosis* complex. In addition one strain of *C. parapsilosis sensu stricto* was resistant to itraconazole and six strains of *C. albicans* and one strains of *C. parapsilosis sensu stricto* presented trailing to the azolics. All yeasts presented high potential for biofilm formation. Finally, these biofilms remained less tolerant to the agricultural antifungals tetraconazole and tebuconazole when compared to voriconazole.

Keywords: Agricultural azolics. Yeast. Antifungal susceptibility. Biofilms.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação toxicológica dos agrotóxicos..... 24
Tabela 2 - Fungicidas utilizados na área cultivada durante a realização das coletas..... 36
Tabela 3 - Distribuição das espécies de *Candida* spp. nos diferentes sítios de coleta..... 41
Tabela 4 - Sensibilidade de *Candida* spp. na forma planctônica aos antifúngicos clínicos..... 42
Tabela 5 - Sensibilidade de *Candida* spp. na forma planctônica aos antifúngicos agrícola..... 43
Tabela 6 - Classificação da formação dos biofilmes de *Candida* spp..... 44
Tabela 7 - Sensibilidade antifúngica de *Candida* spp., em biofilme..... 45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	*American Type Culture Collection*
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIMB	Concentrações Inibitórias Mínimas dos Biofilmes
CLSI	*Clinical Laboratory Standards Institute*
DTC	Ditiocarbamatos
DMDC	Dimetilditiocarbamatos
EBDCS	Etilenobisditiocarbamatos
ECV	*Epidemiological Cutoff Values*
MEC	Matriz extracelular polimérica
PBS	*Phosphate-buffered saline*
PCR	*Polymerase chain reaction*
SADH	*Secondary alcohol dehydrogenase*
RFLP	*Restriction fragment length polymorphism*

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	14
2	**REVISÃO DE LITERATURA**	16
2.1	**Microbiota do solo**	16
2.1.1	***Leveduras do solo***	17
2.2	**Gênero *Candida***	18
2.2.1	***Biofilme como estratégia de perpetuação***	20
2.3	**Agrotóxicos**	23
2.3.1	***Tebuconazol***	26
2.3.2	***Tetraconazol***	27
2.4	**Impacto ambiental dos agrotóxicos sobre os micro-organismos**	27
2.5	**Drogas antifúngicas utilizadas na prática clínica**	30
3	**HIPÓTESES**	34
4	**OBJETIVO**	35
4.1	**Objetivo geral**	35
4.2	**Objetivos específicos**	35
5	**MATERIAL E MÉTODOS**	36
5.1	**Área de estudo**	36
5.2	**Colheita de solo**	36
5.3	**Isolamento dos micro-organismos do solo**	37
5.4	**Identificação de *Candid*a spp**	37
5.5	**Teste de sensibilidade planctônica *in vitro***	38
5.6	**Formação de biofilme de *Candida* spp.**	39
5.7	**Teste de sensibilidade em biofilme de *Candida* spp.**	40
5.8	**Análise estatística**	40
6	**RESULTADOS**	41
6.1	**Identificação de *Candida* spp**	41
6.2	**Teste de sensibilidade planctônica *in vitro***	41
6.3	**Formação do biofilme de *Candida* spp.**	43
6.4	**Teste de sensibilidade em biofilme de *Candida* spp.**	45
7	**DISCUSSÃO**	46
8	**CONCLUÇÕES**	51

REFERÊNCIAS..... 52

1 INTRODUÇÃO

O solo é um ecossistema que abriga uma grande diversidade de micro-organismos, que têm papel na regulação do ciclo de nutrientes, mineralização, decomposição da matéria orgânica, compactação do solo, controle de patógenos, dentre outras funções (PANIZZON *et al*., 2015; SCHULZ *et al*., 2013).

Dentre os micro-organismos que fazem parte do solo, estão às leveduras, fungos unicelulares, que desempenham importantes funções para manutenção e equilíbrio do ecossistema (FRAC *et al*., 2018; YURKOV, 2018), e podem ser isoladas de uma variedade de solos, como solos extremamente ácidos, alcalinos e vulcânicos (YURKOV, 2018).

A atividade antrópica via uso da terra e atividades agrícolas podem causar impacto na estrutura das comunidades microbianas do solo, porque a agricultura é caracterizada por uma constante busca pelo aumento da produtividade das culturas por meio do uso de mecanização, irrigação, fertilização química e aplicação de agrotóxicos (PANIZZON *et al*., 2015).

O Brasil é um dos maiores produtores de *commodities* agrícolas do mundo, por isso o uso de agrotóxicos para fins de proteção dos cultivos contra patógenos microbianos e aumento da produtividade é feito de maneira intensa e constante (GURGEL *et al.*, 2017). As aplicações desses produtos são essenciais para o controle de doenças e, assim, garantem uma melhor produtividade e evitam perdas de safra, mas seu uso também pode trazer prejuízos como: contaminação de alimentos por resíduos de agrotóxicos, contaminação do solo, da vegetação, do ar, das águas superficiais e subterrâneas. Além disso, os produtos podem ser tóxicos para uma série de organismos, incluindo pássaros, peixes e insetos (AKTAR; SENGUPTA; CHOWDHURY, 2009).

Na comunidade microbiana, incluído as leveduras, os agrotóxicos podem ser metabolizados ou podem levar à eliminação, redução ou modificação desses micro-organismos (WALIA *et al*., 2014). No entanto, devido às repetidas aplicações desses produtos químicos, por pressão seletiva, as leveduras podem reproduzir linhagens adaptadas aos agrotóxicos, e as populações sensíveis que coabitam ambientes podem ser reduzidas pela seleção de isolados resistentes a fungicidas. As leveduras do gênero *Candida,* por exemplo, provenientes de ecossistemas agrícolas podem apresentar resistência aos azólicos utilizados na agricultura e na área médica (RIBAS *et al*., 2016). Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi identificar *Candida* spp. isoladas de solo de área cultivada com aplicação de

agrotóxicos e de mata nativa adjacente, e investigar a sensibilidade planctônica e dos biofilmes dessas leveduras a antifúngicos clínicos e agrícolas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2. 1 Microbiota do solo

Os solos possuem quatro categorias principais de componentes: minerais, orgânicos, líquidos e gases, e possuem propriedades físicas (porosidade e textura), químicas (pH e fosfato) e biológicas (biomassa microbiana) (DOMINATI; PATTERSON; MACKAY, 2010). E abriga uma grande diversidade de micro-organismos que participam de muitas funções ecossistêmicas, como fornecimento de benefícios às plantas, participação de ciclo de nutrientes, purificação da água, além disso, esses micro-organismos afetam propriedades físico-químicas, a dinâmica da estrutura do solo e influenciam na qualidade e na quantidade de matéria orgânica disponível (SCHULZ *et al*., 2013).

Os micro-organismos que compõem o solo apresentam diferentes estados fisiológicos. Estes são frequentemente denominados como estados ativos, potencialmente ativos, dormentes e mortos, entre outras definições. Os ativos estão envolvidos na utilização contínua de substratos e transformações bioquímicas. Os potencialmente ativos estão em alerta fisiológico e pode mudar para a utilização de substratos em poucos minutos a algumas horas. Os dormentes não contribuem para os processos em curso no momento, mas podem contribuir em circunstâncias alteradas e os mortos não contribuem diretamente para nenhum processo em andamento, no entanto a biomassa microbiana afeta a disponibilidade de nutrientes (BLAGODATSKAYA; KUZYAKOV, 2013).

Os micro-organismos podem alterar as características físico-químicas do meio ambiente, participando dos processos de decomposição e transformação de matéria orgânica. Por isso, os sistemas enzimáticos microbianos envolvidos são vistos como os principais motores que impulsionam os ciclos biogeoquímicos como: hidrogênio (H), oxigênio (O), carbono (C), nitrogênio (N), enxofre (S) e fósforo (P) (GOUGOULIAS; CLARK; SHAW, 2014).

Um dos componentes biológicos presente no solo são os fungos, micro-organismos bem sucedidos devido à alta plasticidade e capacidade de adotar vários mecanismos em resposta as condições adversas ou desfavoráveis e devido à capacidade de produzir uma variedade de enzimas extracelulares, ademais convertem matéria orgânica em biomassa, dióxido de carbono, e ácidos orgânicos. Muitas espécies de fungos possuem a capacidade de agir como biossorventes de metais tóxicos, como cádmio, cobre, mercúrio,

chumbo e zinco, embora esses elementos possam inibir o crescimento e afetar a reprodução deles. A diversidade e a atividade dos fungos são reguladas por fatores bióticos (plantas e outros organismos) e abióticos (pH, umidade, salinidade, estrutura e temperatura do solo) (FRAC *et al*., 2018).

Dentre os fungos que compõe o ecossistema solo, há uma diversidade de leveduras presente em diferentes ambientes, desde solos florestais a agrícolas (GROENEWALD *et al*., 2018).

2.1.1 Leveduras do solo

O solo é a principal base de nutrientes e habitat para plantas e organismos, desempenhando papel como biorreator para degradar poluentes e facilitar a transformação de nutrientes (FLETCHER, 2015). É um ecossistema complexo, composto por micro-organismos como bactérias e fungos (YURKOV *et al*., 2016). Dentre os fungos, as leveduras do gênero *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Lipomyces* e *Candida* estão entre os mais frequentemente relatados (YURKOV, 2018).

As leveduras presentes no solo desempenham funções como: decomposição e transformação de nutrientes, processos necessários para manter a fertilidade e a produtividade das culturas, e interagem com outros organismos por meio de relações de competição, amensalismo e simbiose. E são classificadas em espécies alóctones, que são transitórias ou eventualmente presentes no solo e se originam de outros habitats como vegetação, detritos ou animais; ou podem ser autóctones do solo, ou seja, são oriundos do solo e incluem espécies de ascomicetos e basidiomicetos, na maioria dos casos (BOTHA, 2011).

As leveduras têm sido isoladas de vários tipos de solo e, em especial, aqueles ricos em matéria orgânica geralmente produzem maiores números de colônias de levedura. A abundância é maior em solos agrícolas fertilizados e em solos temperados e boreais não fertilizados, onde as taxas de decomposição da matéria orgânica são lentas. A quantidade de células geralmente diminui com a profundidade do solo, uma tendência que tem sido explicada pela quantidade de nutrientes disponíveis e matéria orgânica no solo (YURKOV, 2018).

A diversidade está relacionada à estrutura diversa do habitat presente. Em solos florestais, as comunidades de leveduras são espacialmente heterogêneas e refletem propriedades da vegetação acima (YURKOV *et al*., 2016). Nas áreas agrícolas, aplicação de

produtos químicos e o pastoreio modificam consideravelmente o ambiente mudando a composição florística, a produtividade, a decomposição, as taxas de contaminação e muitas propriedades do solo, refletindo nos micro-organismos presentes no solo (YURKOV; KEMLER; BEGEROW, 2012).

2.2 Gênero *Candida*

O gênero *Candida* pertence ao filo Ascomycota, classe Saccharomycetes, ordem Saccharomycetales (LEVETIN *et al*., 2016). Os fungos desse gênero são encontrados na natureza, vivendo como saprófitas no solo e em ambientes aquáticos (WILLIAMS; LEWIS, 2011).

No solo essas leveduras são isoladas de uma variedade de ambientes, desde florestas a terras cultiváveis, e estão presentes em todos os tipos de solos manejados, algumas delas, são restritas a uma estação individual, horizonte ou local do solo, enquanto outras estão presentes o tempo todo (BOTHA, 2011), mas também são frequentes em solo não cultivados (JAMALI; GHARAEI; ABBASI, 2016).

No ambiente *C. albicans* tem sido isolada da água, do solo, incluído solos agrícolas (MACIEL *et al*., 2019; WACHOWSKA; IRZYKOWSKI; JĘDRYCZKA, 2018), onde está susceptível a pressão de seleção devido ao uso generalizado de fungicidas azólicos (WACHOWSKA; IRZYKOWSKI; JĘDRYCZKA, 2018), podendo desenvolver mecanismo de adaptação que confere resistência a antifúngicos tanto agrícolas quanto clínicos (DALHOFF, 2018).

Assim como outras espécies, *C. tropicalis* tem como um dos habitats o solo, e alguns estudos têm sido realizados no intuito de compreender a relação dessa levedura com o solo. Yang *et al*. (2012), relataram a ocorrência de cepas do solo e clínica de *C. tropicalis* resistentes a fluconazol. Chandran e Das (2012), descreveram cepas ambientais com potencial para degradar óleo diesel e Dimova *et al*. (2010) verificaram que essa espécie é capaz de crescer e utilizar alguns resíduos agrícolas (farelo de trigo, aveia e casca de arroz) como única fonte de carbono e energia.

Por outro lado, *C. parapsilosis* tem sido isolada de ambientes como: solo multicontaminados com metais pesados, com petróleo, em ambiente de solos seco e areia de praia (GLUSHAKOVA *et al*., 2015; AZCÓN *et al*., 2010). Um estudo demonstrou que essa levedura é capaz de tolerar condições estressantes sendo capaz de sobreviver nestes ambientes

(AZCÓN *c* 2010). Além disso, tem sido relatado que *C. parapsilosis* pode degradar pesticidas (SINGH; WALKER, 2006).

Quanto aos isolados de *C. parapsilosis* são fenotipicamente indistinguíveis, mas são geneticamente heterogêneos. Com base em diferentes metodologias como: análises de DNA polimórfico amplificado por eletroforese de enzima *multilocus*, morfotipagem, diferenças na sequência de DNA, análise da sequência do gene da topoisomerase II do DNA dentre outras, verificou-se que *C. parapsilosis* forma um complexo composto por três grupos geneticamente distintos (SILVA *et al*., 2009).

Com o intuito de distinguir as três espécies, Tavanti *et al*. (2005) propuseram a análise do polimorfismo, através da restrição do gene *SADH*, que codifica uma desidrogenase secundária de álcool e é comum a todas as três espécies, no qual sugeriram que *C. parapsilosis* fosse dividida em *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*.

C. fermentati pertence ao complexo *C. guilliermondii,* assim como as espécies *C. guilliermondii*, *C. carpophila* e *C. xestobii*. Este complexo é amplamente distribuído no ambiente, é frequentemente isolada do solo, plantas, insetos, água e do ar (CHEN *et al*., 2013).

Métodos moleculares como: polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição por PCR (RFLP), e PCR (Reação em cadeia de polimerase) em tempo real, técnicas Luminex e cariotipagem eletroforética têm sido utilizadas para distinguir as espécies desse complexo (FENG *et al*., 2014).

Essas leveduras também vivem como comensais na microbiota humana e de outras espécies de animais. No hospedeiro humano são isoladas no trato gastrointestinal, geniturinário e na pele. Em condições especiais, espécies de *Candida* podem causar infecções oportunistas, e alguns fatores podem ser relacionados com o surgimento dessas infecções como: alterações nos níveis de pH, diabetes, desnutrição, pacientes com leucemia, linfoma, HIV/AIDS e uso prolongado de antibióticos, corticosteroides, uso de anticoncepcionais orais, cirurgias, uso de cateteres, entre outros (VÁZQUEZ-GONZÁLEZ *et al*., 2013).

Segundo Giolo e Svidzinski (2010), as infecções causadas por *Candida* spp. são denominadas candidíase ou candidose e variam de infecções superficiais em mucosas até infecções invasivas de alta gravidade. As infecções superficiais incluem candidíase orofaríngea, esofágica, oral e vulvovaginal (WILLIAMS; LEWIS, 2011; VAZQUEZ, 2010).

Entre as infecções invasivas estão candidemia, endocardite e infecções do sistema nervoso central (XIAO *et al*., 2019; SCEMLA *et al*., 2016).

C. albicans é considerada a principal levedura patogênica oportunista por ser a espécie mais frequentemente isolada em humanos. Entretanto, nas últimas décadas tem sido observado significativo aumento de outras espécies como: *C. tropicalis*, complexo de espécies *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. rugosa*, complexo de espécies *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae* e *C. auris*. Essas e outras espécies, que são conhecidas como não-*albicans*, têm sido cada vez mais implicadas em processo infeccioso humano (XIAO *et al*., 2019; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

C. parapsilosis gera preocupação principalmente em neonatos gravemente doentes, nos quais está frequentemente associada à mortalidade neonatal (TROFA; GÁCSER; NOSANCHUK, 2008). *C. orthopsilosis* permanece como um patógeno raro em infecções em humanos, apesar de seu isolamento em vários espécimes clínicos (HESLOP *et al*., 2015). *C. metapsilosis* embora em uma frequência menor também tem sido relata como causadora de infecções oportunistas (GOMEZ-LOPEZ *et al*., 2008).

C. tropicalis, por sua vez, tem sido associada a infecções principalmente em pacientes neutropênicos, ou em indivíduos que estejam em terapia com antimicrobianos ou apresentando danos na mucosa gastrintestinal (ZUZA-ALVES; SILVA-ROCH; CHAVES, 2017).

E *C. fermentati* representa cerca de 9% dos isolados do complexo *C. guilliermondii*. Este complexo é frequentemente associado à onicomicose e raramente é visto como causa de infecção invasiva, mas pode exibir sensibilidade reduzida a fluconazol. E embora incomum, é mais provável que seja isolado do sangue, no qual a incidência é cerca de 1 a 3% do número total de casos de candidemia (AL-SWEIH *et al*., 2015; CHEN *et al*., 2013).

2.2.1 Biofilme como estratégia de perpetuação

O gênero *Candida* coloniza diversos nichos no hospedeiro humano, sendo isolado das mucosas de indivíduos saudáveis sem produzir sinais de doenças em condições normais do hospedeiro. O equilíbrio da relação entre o hospedeiro e este fungo comensal pode se transformar em uma relação parasitária, com o desenvolvimento de infecções denominadas candidíases e depende do balanço entre a virulência do micro-organismo e as defesas do hospedeiro (ALVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007)

Vários fatores podem contribuir para a transição de leveduras comensais para formas patogênicas e estão relacionados ao comprometimento do sistema imune do hospedeiro associado à virulência do micro-organismo. Os principais fatores de virulência de *Candida* spp. incluem morfogênese, formação de tubo germinativo, adesão a células epiteliais e endoteliais humanas, formação de biofilme, capacidade de secretar enzimas hidrolíticas (principalmente proteinases e fosfolipases) e comutação fenotípica (SILVA-ROCHA *et al*., 2014).

Uma das formas de doença causadas por esse patógeno está associada à formação de biofilme em superfícies hospedeiras, como tecidos e órgãos ou abióticas, como cateteres, próteses e válvulas cardíacas (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018).

Os fungos podem colonizar praticamente todos os ambientes da terra e formar biofilmes em várias superfícies, como grão de areia e matéria orgânica, o que influencia sua distribuição nos solos (BOTHA, 2011).

Um biofilme consiste em uma comunidade de micro-organismos que estão ligados a uma superfície, material inerte ou tecido vivo, embutida em uma matriz extracelular polimérica (MEC). Os micro-organismos em biofilmes exibem menores taxas de crescimento e maior resistência ao tratamento antimicrobiano, comportando-se de forma muito diferente das células planctônicas (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018).

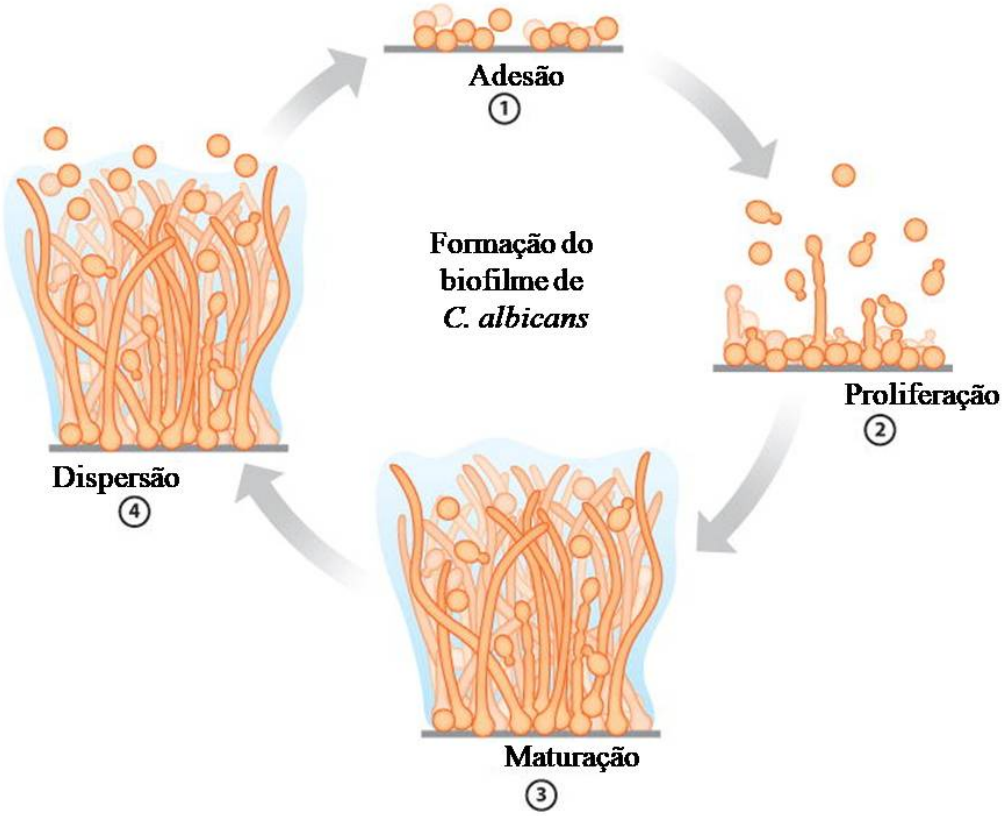
Os biofilmes oferecem vantagem no que se refere à reprodução, crescimento e heterogeneidade fisiológica em comparação com as células planctônicas. Os micro-organismos formam biofilmes como uma estratégia para superar o estresse, como a depleção de nutrientes, alterações no pH ou a presença de radicais de oxigênio, desinfetantes e antimicrobianos em seu ambiente. Além disso, a produção de biofilme é um mecanismo para permanecer em um lugar propício através da colonização efetiva (VELMOUROUGANE; PRASANNA; SAXENA, 2017).

A formação de biofilme, apesar de ser um processo presente em todas as espécies de *Candida* spp., possui características que diferem significativamente de espécie para espécie, e na dependência de superfície, nicho de hospedeiro e outros fatores. Por exemplo, biofilmes maduros de *C. albicans* exibem uma estrutura mais heterogênea, composta por blastoconídios e hifas circundados por uma matriz extracelular polimérica. A MEC fornece estrutura para a adesão entre as células e com diferentes superfícies, e uma barreira entre as células do biofilme e o ambiente vizinho. Dentro da estrutura desses biofilmes, geralmente há canais de água ao redor das microcolônias. O biofilme de *C.*

tropicalis é composto por uma rede de leveduras, pseudo-hifas e hifas, com brotamento intenso da hifa. Por sua vez, *C. parapsilosis* exibe um biofilme formado por aglomerados de células aderidas à superfície, com pouca MEC. Essas diferenças destacam a complexidade dos processos de formação do biofilme e a dificuldade de encontrar uma maneira única de erradicar o biofilme de *Candida* spp. (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018).

A formação do biofilme compreende quatro estágios temporais: (1) aderência a uma superfície, (2) proliferação para formar uma camada basal de células de ancoragem, (3) crescimento de hifas ou pseudo-hifas concomitante com a produção de material de matriz extracelular polimérica, e (4) dispersão lenta de células a partir do biofilme para semear novos locais (Figura 1) (NOBILE; JOHNSON, 2015).

Figura 1 - Processo de formação do biofilme.



Fonte: NOBILE; JOHNSON, 2015.
Legenda: Estágios de formação do biofilme de *Candida albicans*. (1) Adesão das células em uma superfície. (2) Início da proliferação celular, formando uma camada basal de ancoragem. (3) Maturação, iniciando o crescimento de hifas com a produção de material da matriz extracelular polimérica. (4) Dispersão das células do biofilme para colonizar novos locais.

Devido à matriz extracelular polimérica do biofilme que atua como uma barreira protetora, tornando as células microbianas mais resistentes às terapias antifúngicas convencionais e ao sistema imune do hospedeiro, bem como outras perturbações ambientais, as infecções por *Candida* spp. formadoras de biofilme são mais difíceis de tratar e as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos antifúngicos relacionadas ao biofilme são frequentemente mais altas que as CIMs para células planctônicas. Além da presença da matriz extracelular polimérica, a resistência aumentada às drogas antifúngicas também está relacionada com a densidade celular, regulação de bombas de efluxo, alteração de esteróis nas membranas, a ativação de mecanismos de resposta ao estresse e presença de células persistentes, que são um subconjunto de células de leveduras metabolicamente dormentes dentro dos biofilmes (ROSCETTO *et al*., 2018).

No passado, as pesquisas sobre biofilmes concentravam-se principalmente nos setores da saúde e indústria, no entanto, nos últimos anos tem-se estudado os biofilmes na agricultura, isso porque os biofilmes desempenham um papel importante na colonização de superfícies, no solo, nas raízes ou parte aérea das plantas, e permitem a proliferação no nicho desejado, além de aumentar a fertilidade do solo. Ademais, como os biofilmes microbianos são compostos principalmente por polissacarídeos, existe a possibilidade de melhoria das propriedades físicas do solo, como: uma melhor agregação do solo, redução da densidade, melhor retenção de água e nutrientes e têm importância agrícola como remediadores ambientais por desempenhar um papel de biorremediação de produtos químicos agrícolas (VELMOUROUGANE; PRASANNA; SAXENA, 2017).

E no meio ambiente formação do biofilme é afetada pelos fatores externos, e a estrutura depende em grande parte dos fatores ambientais, o que implica que os biofilmes são modelados para se adaptarem às condições locais (TOYOFUKU *et al*., 2016).

2.3 Agrotóxicos

Os agrotóxicos, também denominados de pesticidas, defensivos agrícolas ou agroquímicos, são quaisquer compostos destinados à agricultura e que têm como ação a prevenção ou redução dos efeitos causados por micro-organismos, pragas, doenças, ervas daninhas, entre outros (SOARES; FARIA; ROSA, 2016). E segundo a ANVISA são classificados pela toxicidade em 6 categorias (Tabela 1).

Tabela 1 – Classificação toxicológica dos agrotóxicos.

Categoria	Classificação toxicológica	Cor da faixa
Categoria 1	Produto extremamente tóxico	Vermelha
Categoria 2	Produto altamente tóxico	Vermelha
Categoria 3	Produto moderadamente tóxico	Amarela
Categoria 4	Produto pouco tóxico	Azul
Categoria 5	Produto improvável de causar dano agudo	Azul
Não classificado	Produto não classificado	Verde

Fonte: ANVISA, 2020.

Os agrotóxicos de acordo com sua função são classificados em inseticidas, fungicidas, herbicidas, fumigantes, nematicidas, moluscicidas e acaricidas (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012).

Os fungicidas são um grupo de pesticidas utilizados na agricultura para proteger as culturas contra os fungos. Dependendo da classe química, eles agem na divisão celular, inibição da respiração, síntese de ácidos nucléicos, aminoácidos, proteínas, lipídios e membrana celular, bem como na melanina da parede celular, e também podem agir na inibição de biossíntese de esteróides. E podem afetar tanto os fungos alvos da aplicação como os não-alvos (BAĆMAGA; WYSZKOWSKA; KUCHARSKI, 2018).

O acúmulo desses produtos no ambiente aumenta o risco de efeitos negativos nos ecossistemas como: contaminação das águas, do solo, do ar e da vegetação e causa redução de populações de espécies benéficas (AKTAR; SENGUPTA; CHOWDHURY, 2009).

No final do século XIX e o início do século XX, foram desenvolvidos esquemas de proteção química de plantas, com cobre e enxofre como agentes antifúngicos para controlar o míldio e o oídio, doenças que afetam as plantações. Esses tratamentos iniciais levaram ao estabelecimento de uma indústria multibilionária que desenvolveu fungicidas modernos eficientes pertencentes a várias classes químicas, diferindo em seu modo de ação contra patógenos e características de absorção e distribuição dentro da planta. Hoje, a proteção das culturas à base de fungicidas é indispensável para uma produção agrícola eficiente e em larga escala (DEISING; REIMANN; PASCHOLATI, 2008).

Alguns fatores podem explicar o uso generalizado de produtos químicos na produção de alimentos. Um dos fatores é a população em geral está em constante crescimento

e, como consequência, há uma necessidade de aumento na demanda por produtos agrícolas. O uso de agrotóxicos é uma ferramenta utilizada para manter a oferta estável de produtos agrícolas, para atender a essa necessidade (ROCCA *et al*., 2017).

Desta forma, é compreensível a utilização de antifúngicos na agricultura a fim de evitar os prejuízos, uma vez que, nas plantações, as infecções fúngicas têm causado uma considerável perda na produção de safra a nível mundial (BOWYER; DENNING, 2014).

O crescente consumo de agrotóxicos e fertilizantes químicos pela agricultura brasileira é proporcional ao aumento das monoculturas, ou seja, produção ou cultura de apenas um único tipo de produto agrícola é cada vez mais dependente dos insumos químicos. E alguns fatores são responsáveis por esse consumo como: aumento da produção dos transgênicos, que são culturas geneticamente modificadas, crescimento de áreas destinadas ao cultivo de milho e soja no país, o aumento do cultivo da cana-de-açúcar para a produção de etanol e o baixo custo dos agroquímicos e fertilizantes e energia para a produção agrícola. Devido a esses fatores o país se tornou um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo (GURGEL *et al*., 2017).

Vários compostos foram descritos por sua atividade antifúngica, entre eles, estrobilurinas, ditiocarbamatos, benzimidazóis e derivados azólicos (BERGER *et al*., 2017; HOF, 2001).

As estrobilurinas são um grupo de compostos químicos extraídos do fungo *Strobilurus tenacellus*. Estes compostos fazem parte do grupo dos inibidores de quinona oxidase (QoI), cuja toxicidade advém da inibição da cadeia respiratória ao nível do complexo III, impedindo a cadeia bioquímica de transferência de elétrons na mitocôndria, interferindo na respiração celular do patógeno (PARREIRA; NEVES; ZAMBOLIM, 2010).

Os ditiocarbamatos (DTCs) são fungicidas muito utilizados na agricultura devido à sua alta eficiência no controle de patógenos fúngicos, baixos custos de produção e toxicidade aguda relativamente baixa em mamíferos. Além disso, esses compostos são também usados como aceleradores de vulcanização e antioxidantes na indústria da borracha (PIZZUTTI *et al*., 2017).

Os ditiocarbamatos são compostos derivados do ácido ditiocarbâmico e são subdivididos em dimetilditiocarbamatos (DMDC), como ferbam, ziram; e etilenobisditiocarbamatos (EBDCs), como mancozebe, manebe, zinebe e propinebe (LEMES *et al*., 2005).

Os ditiocarbamatos são quelantes de metais à base de enxofre que contêm um grupo funcional ditiocarboxílico conjugado a um grupo amino secundário alifático. E são conhecidos por exercerem efeitos pró-oxidantes e antioxidantes tanto em sistemas livres de células quanto biológicos (MATIAS *et al*., 2013).

Os benzimidazóis são usados para controlar doenças em plantas, cereais e frutas, possuem eficácia tanto em relação à sua atividade inibitória quanto a sua seletividade. Os benzimidazóis bloqueiam a divisão celular, agindo na síntese de DNA e RNA (ZHOU *et al*., 2016).

Os derivados azólicos são utilizados na fase pré-colheita, na cultura de grãos e na fase pós-colheita para evitar a deterioração ocasionada pelos fungos do gênero *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Aspergillus* e *Fusarium.* O modo de ação dos derivados azólicos agrícola, assim como os clínicos também se dá através da inibição da via biossintética do ergosterol fúngico, a enzima 14-α-demetilase, que é responsável pela transformação do lanosterol em ergosterol, um constituinte essencial da membrana citoplasmática dos fungos (BOWYER; DENNING, 2014).

Dentre os derivados azólicos, estão os triazólicos, antifúngicos sistêmicos mais utilizados na agricultura. Eles são absorvidos pelas plantas, onde atuam preventivamente ou curativamente, afetando a formação de tubo germinativo e apressórios ou no desenvolvimento do crescimento micelial. Cerca de um terço de todos os fungicidas utilizados para a proteção dos rendimentos das culturas incluem os triazólicos, entre os quais em torno de 99% são inibidores da desmetilação (DMI). Esses produtos também são conhecidos por apresentar estabilidade a longo prazo, permitindo que eles permaneçam ativos em certos nichos ecológicos, como solo e água, por vários meses (RIBAS *et al*., 2016).

2.3.1 Tebuconazol

O tebuconazol ((RS)-1-p-clorofenil-4,4-dimetil-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil) pentan-3-ol) é um triazólico utilizado em culturas como o trigo, soja, milho, cevada, alho, cebola, uva, tomate, batata, café, cacau, morango, amendoim, maçã, pêssego, dentre outras. Possui atividade antifúngica de amplo espectro (SOARES; MARTIN, 2015). E segundo a ANVISA (2019), possui classificação toxicológica na categoria IV.

O tebuconazol é persistente e adsorvido pelos solos, ou seja, as moléculas são fixadas principalmente na camada superficial (HERRERO-HERNÁNDEZ *et al*., 2011).

O acúmulo desse fungicida em solos agrícolas pode representar um risco para os ecossistemas (SAHA; PIPARIYA; BHADURI, 2016), uma vez que eles podem ocasionar redução da respiração basal, modificação no metabolismo e na diversidade da biomassa microbiana residente (MUÑOZ-LEOZ, 2011).

Em espécies do gênero *Candida* que são expostas a compostos azólicos, como o tebuconazol, pode ocorrer seleção de isolados fúngicos que apresentam sensibilidade reduzida a antifúngicos clínicos e agrícolas (RIBAS *et al*., 2016; YANG et al., 2012).

2.3.2 Tetraconazol

O triazólico tetraconazol ((RS) -2- (2,4-diclorofenil) -3- (1H-1,2,4-triazol-1- il) propil-1,1,2,2-tetrafluoroetil) age como inibidor da desmetiliação de esteróis, tem amplo espectro de atividade, sendo utilizado no controle de doenças em frutas, legumes e cereais (ZHANG *et al*., 2014), e segundo a ANVISA (2019) possui classificação toxicológica na categoria II.

Os fungicidas podem afetar os micro-organismos, interferindo na diversidade microbiana afetando indiretamente a agregação do solo e a fertilidade (YOUSAF; KHAN; ASLAM, 2013). Ademais, podem persistir e acumular-se no solo com sucessivas aplicações anuais (SUŁOWICZ; CYCOŃ; PIOTROWSKA-SEGET, 2016.)

Embora a concentração residual dos pesticidas no solo se degrade com uma extensa incubação, seus efeitos em organismos não-alvo e sobre as comunidades microbianas e qualidade do solo podem persistir por longos períodos. O tetraconazol afeta a atividade microbiana, a biomassa e a diversidade fúngica (ZHANG *et al*., 2014).

Além disso, estudos têm mostrado em teste de indução *in vitro,* com *C. parapsilosis,* que quando exposta a concentrações crescentes de tetraconazol apresenta maior tolerância chegando a ser capaz de crescer em concentrações mais altas do que as concentrações iniciais dos estudos (BRILHANTE *et al*., 2019; ROCHA *et al*., 2016).

2.4 Impacto ambiental dos agrotóxicos sobre os micro-organismos

Os agrotóxicos podem ser depositados no solo de várias formas: pela aplicação direta do produto, através da utilização de água contaminada pela aplicação de produtos químicos, contaminação pelo contato do solo com embalagens, através da deriva de produtos

aplicados sobre as plantações, principalmente, quando a aplicação é realizada via pulverização aérea e deposição sobre o solo devido à volatilização (STEFFEN; STEFFEN; ANTONIOLLI, 2011).

Após a aplicação, os pesticidas e seus principais metabólitos tendem a se mover no meio ambiente, aderindo à matéria orgânica do solo, às raízes ou a partes aéreas das plantas e podem entrar na cadeia alimentar. A vaporização é outra maneira pela qual estes produtos podem se mover para a atmosfera, e uma quantidade de pesticida aplicada pode infiltrar-se no solo e contaminar os aquíferos de água doce ou atingir corpos de água de superfície. Além disso, uma pequena quantidade é mineralizada e degradada pela luz solar (fotodegradação) e por micro-organismos (degradação microbiana) presentes no solo (KALIA; GOSAL, 2011). Esses pesticidas podem representar um risco ecotoxicológico para os micro-organismos (RIVERA-BECERRIL *et al*., 2017).

Absorção e persistência desses produtos no ambiente varia com a composição, pH e temperatura do solo (YOUSAF; KHAN; ASLAM, 2013).

O destino na aplicação de pesticidas no solo e os processos de transporte envolvidos dependem dos efeitos cumulativos das características do produto (adsorção, solubilidade, volatilidade e taxa de degradação), mas também das características do solo (textura e matéria orgânica), dos métodos de aplicação utilizados (aéreo ou terrestre) e das condições do local (topografia, clima e irrigação) (JEONG, 2004).

Os agrotóxicos afetam a microbiota e o solo, pois esses produtos podem causar a morte de certos grupos específicos, e uma consequente diminuição no número de micro-organismos pode desequilibrar processo específico na cadeia alimentar realizado por esses organismos. Modificações na comunidade microbiana podem causar alterações na agregação, química, pH, e na estrutura do solo à medida que a matéria orgânica do solo é esgotada. O solo degradado torna-se mais propenso à erosão dos corpos d'água das águas superficiais após fortes chuvas e responde menos a entrada de fertilizantes. O solo torna-se infértil por um período, porque fica apenas matéria orgânica que não é capaz de sustentar o crescimento e desenvolvimento microbiano (KALIA; GOSAL, 2011; CHOWDHURY *et al*., 2008). Isso porque a fertilidade do solo é determinada pela presença de nutrientes e pela diversidade da microbiota presente no solo. A diversidade microbiana deve-se principalmente à ocorrência de vários tipos de substratos orgânicos no solo (KALIA; GOSAL, 2011).

Quanto aos fungicidas, devido à maioria das doenças fúngicas nas plantações serem difíceis de tratar, os fungicidas pode ser aplicado várias vezes durante a estação de

crescimento ou mesmo durante várias estações. Alguns desses produtos podem inibir ou mesmo eliminar grupos microbianos, enquanto outros agem como estimuladores de crescimento para populações selecionando os micro-organismos do solo. Essas mudanças podem ser atribuídas à capacidade dos micro-organismos de degradar agroquímicos ou modificar a estrutura das comunidades microbianas (BAĆMAGA; WYSZKOWSKA; KUCHARSKI, 2018).

Os fungos, quando ameaçados, podem desenvolver mecanismos adaptativos que lhes confiram resistência a produtos tóxicos, para que se perpetue a sobrevivência da espécie. A grande capacidade de multiplicação e a diversidade dos fungos fornecem oportunidades para a seleção de linhagens resistentes. A aplicação de fungicida seleciona as células resistentes, eliminando as sensíveis. Ao longo dos anos, com o uso intensivo desses produtos, os fungos adquirem resistência aos produtos tóxicos (RIBAS *et al*., 2016; PARREIRA; NEVES; ZAMBOLIM, 2009). O desenvolvimento da resistência afeta inclusive fungos com relevância médica, que causam doenças em humano (BRAUER *et al*., 2019).

O risco hipotético de que o uso maciço de azólicos na agricultura induz resistência antifúngica entre patógenos humanos começou a ser discutido há vários anos (AZEVEDO *et al*., 2015). Tem sido relatada a ocorrência de cepas ambientais de *Candida* spp. com resistência tanto aos azólicos utilizados na agricultura, quanto aos clínicos, e o uso de fungicidas agrícolas têm sido associados a essa resistência. O isolamento de leveduras ambientais do gênero *Candida* com resistência é alarmante e demonstra que o uso agrícola de antifúngicos pode desencadear o desenvolvimento de resistência além dos limites das classes estruturais de antifúngicos usados na agricultura, criando assim uma ameaça à saúde humana (DALHOFF, 2018).

O uso de antifúngicos na agricultura aumentou nos últimos anos e, além disso, a recente taxa de emergência de fungos patogênicos resistentes a fungicidas restringiu o número de agentes antifúngicos comumente usados. Isso mostra a relevância do monitoramento de cepas ambientais, uma vez que estudos analisando questões ambientais e sua relação com leveduras indicam, que a resistência de cepas ambientais não é um mecanismos tão raro quanto esperado (BRAUER *et al*., 2019; MILANEZI; WITUSK; VAN DER SAND, 2019).

2.5 Drogas antifúngicas utilizadas na prática clínica

O número de classes de medicamentos que podem ser usados para o tratamento de doenças fúngicas é relativamente pequena se comparada ao grande número de antibacterianos. Quatro classes principais de drogas antifúngicas são usadas para tratar a maioria das infecções fúngicas que são: azólicos, polienos, equinocandinas e análogos de nucleosídeos. A semelhança na célula dos hospedeiros e dos fungos patogênicos leva a uma toxicidade de certos medicamentos, frequentemente impedindo seu uso durante a terapia (KOŁACZKOWSKA; KOŁACZKOWSKI, 2016). Neste trabalho foram destacados os que foram utilizados neste estudo.

O grupo de drogas azólicas teve o uso clínico iniciado em meados da década de 1970, causando grande impacto na terapia antifúngica, pelo seu amplo espectro de ação (MARTINEZ, 2006).

Os derivados azólicos inibem o crescimento de células fúngicas, ligando-se a enzima lanosterol 14α-demetilase, uma enzima do citocromo P450, codificada pele gene *ERG11*. Isso leva à interrupção da biossíntese do ergosterol. A inibição do lanosterol 14α-demetilase ou *ERG11* leva ao esgotamento do ergosterol das membranas celulares. Isso afeta a fluidez da bicamada lipídica e retarda o crescimento dos fungos. A inibição do *ERG11* também resulta no acúmulo de metabólitos tóxicos, como o 14α-metil-3,6-diol formado a partir do 14-metil-fecosterol (SAGATOVA *et al*., 2015).

Dentre os azólicos, o fluconazol foi o primeiro triazólico aprovado para uso clínico nos Estados Unidos em 1990. É um triazólico de primeira geração, que tem uma meia-vida mais longa e uma biodisponibilidade superior à dos triazólicos de segunda e terceira geração, como itraconazol, voriconazol e o posaconazol. Apesar das propriedades farmacocinéticas favoráveis e interações medicamentosas limitadas, o fluconazol é menos potente do que outros triazólicos e não exibe atividade contra infecções invasivas, sendo essencialmente limitado a *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans* e fungos dimórficos. Dentre as espécies de *Candida,* estudos mostram que este antifúngico é mais ativo contra *C. albicans, C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. A espécie *C. glabrata* demonstra frequentemente sensibilidade dose dependente, enquanto *C. krusei* é intrinsecamente resistente (POUND e*t al*., 2011).

Dois anos mais tarde do início da utilização do fluconazol, o itraconazol passou a ser comercializado e provou ser eficaz no tratamento de várias infecções fúngicas incluído:

criptococose, candidíase, aspergilose, esporotricose, blastomicose, histoplasmose e coccidiomicose (MALAYERI; REZAEI; RAIESI, 2018).

As formulações do itraconazol são significativamente afetadas tanto pela co-administração de alimentos como pelo pH gástrico e sua biodisponibilidade absoluta é >55%. Este fármaco é contra-indicado em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva ou história de insuficiência cardíaca congestiva devido a seus efeitos negativos (MÜLLER; KARA-JOSÉ; CASTRO, 2013; POUND *et al*., 2011).

O voriconazol é um triazólico de segunda geração, estruturalmente relacionado ao fluconazol, com biodisponibilidade de 60% (SANDHU *et al*., 2014), e possui atividade contra uma ampla gama de patógenos fúngicos e tem atividade aumentada contra a maioria das espécies de *Candida* spp., incluindo *C. krusei*, e outros fungos como *Aspergillus* spp., *Scedosporium* spp., *Fusarium* spp., *Cryptococcus* spp. e fungos dimórficos (MÜLLER; KARA-JOSÉ; CASTRO, 2013).

O uso constante de fármacos azólicos pode ser um problema, já que eles são fungistáticos e não fungicidas, os fungicidas são fármacos capazes de matar ou destruir os fungos, enquanto os fungistáticos inibem o crescimento de fungos, em parte devido à sua capacidade de interagir com fatores de transcrição e induzir superexpressão de bombas de efluxo de drogas. Isso dá origem tolerância às drogas que pode proporcionar tempo para a mudança genética (KENIYA; RUMA; MONK, 2018).

Em 1950 foi disponibilizada no mercado a anfotericina B, cujo espectro antifúngico e eficácia a colocaram na posição, ainda mantida, de droga de referência no controle de infecções sistêmicas graves. A anfotericina B pertence ao grupo poliênico e atua ligando-se ao ergosterol das membranas das células fúngicas, essa ligação ocorre através de interações hidrofóbicas, interrompendo a integridade da membrana e resultando na formação de poros, que permitem o vazamento do conteúdo celular, o que eventualmente resulta em apoptose. Os canais na membrana celular permitir o efluxo de íons pequenos e outras macromoléculas, como potássio e magnésio e outras moléculas. Estudos evidenciam que a ligação ao ergosterol e a formação de poros podem não ser o único mecanismo levando à morte celular fúngica. Foi relatado que anfotericina B poderia matar leveduras através do sequestro de ergosteróis das camadas lipídicas da membrana celular. Além disso, foi proposto que a anfotericina B causa acúmulo de reativas intracelulares de oxigênio, o que também contribui para o efeito da droga (MESA-ARANGO; SCORZONI; ZARAGOZA, 2012).

A anfotericina B tem sido usada para o tratamento de infecções fúngicas potencialmente fatais, como meningite criptocócica e zigomicose invasiva, mas também é utilizada em outras micoses, como aspergilose, candidíase, histoplasmose, blastomicose, coccidioidomicose, esporotricose, e fusariose nos casos de falta de resposta aos azólicos ou equinocandinas (MESA-ARANGO; SCORZONI; ZARAGOZA, 2012; POUND *et al*., 2011).

Contudo, apesar dos avanços nas interações preventivas, diagnósticas e tratamento, as infecções fúngicas causam altas taxas de morbimortalidade em pacientes imunocomprometidos. A falha no tratamento das infecções fúngicas muitas vezes esta associada à resistência a medicamentos clínicos, que ocorre quando o paciente não responde ao medicamento utilizado (COWEN *et al*., 2015).

O surgimento dos mecanismos de resistência antifúngica é o resultado da seleção natural após origem de adaptações genéticas benéficas das adaptações fisiológicas aos compostos antifúngicos (HOKKEN *et al*., 2019).

Os mecanismos de resistência aos azólicos esta relacionado à superexpressão ou alteração do alvo da droga, regulação positiva de transportadores de drogas ou alterações celulares que reduzem a toxicidade da droga ou permite a tolerância ao estresse induzido pelo fármaco. A resistência fúngica à anfotericina B é rara e geralmente está associada à diminuição do ergosterol alvo atribuído a uma mutação de perda de função nos genes responsáveis pela biossíntese do ergosterol (COWEN *et al*., 2015). E dependem de uma variedade de fatores e condições, como os mecanismos de ação do composto, o local alvo no organismo, o risco de transferência de resistência entre organismos individuais e espécies, e o mecanismo de tal resistência (AZEVEDO *et al*., 2015).

A resistência aos azólicos pode ocorrer *in vivo* (pacientes tratados com azólicos) ou devido à presença destes compostos no ambiente, que são usados na agricultura. O uso de azólicos na agricultura pode afetar espécies da microbiota fúngica, tanto em natureza, como espécies de nichos endógenos humanos, uma vez que, este distúrbio na microbiota fúngica pode resultar em mudanças na população de fungos patogênicos medicamente importantes que podem persistir e prosperar em contato com o hospedeiro humano (AZEVEDO *et al*., 2015).

Segundo Azevedo *et al*. (2015), pode haver uma relação direta entre o desenvolvimento de resistência aos azólicos utilizados na prática agrícola e o desenvolvimento de resistência aos azólicos clínicos, isso porque a pressão exercida pelo uso constante de antifúngicos agrícola sobre a população fúngica pode levar a seleção de isolados

resistentes. E como o mecanismo de ação de todos os azólicos independentemente de sua estrutura química e propriedades biológicas variáveis baseia-se em interferência na atividade do lanosterol 14α-demetilase fúngica, sendo os azólicos o principal grupo de medicamentos utilizados no tratamento de doenças fúngicas humanas e agrícolas, poderia ocorrer o surgimento de resistência cruzada, impulsionados pelo uso massivo de fungicidas azólicos na agricultura (FARIA-RAMOS *et al*., 2014).

Desta forma deve ser dada atenção especial à avaliação do desenvolvimento de resistência cruzada, sendo importante o monitoramento do surgimento de linhagens de fungos com mecanismos de resistência (AZEVEDO *et al*., 2015).

3 HIPÓTESES

1. As células planctônicas de *Candida* spp. isoladas de solo de área cultivada com aplicação de agrotóxicos apresentam resistência a derivados azólicos;

2. As cepas de *Candida* spp. isoladas de solo de área cultivada na presença de agrotóxicos são forte formadoras de biofilme *in vitro*;

3. Os biofilmes formados por *Candida* spp. isoladas de solo de área cultivada com aplicação de agrotóxicos são mais tolerantes a derivados azólicos.

4 OBJETIVO

4.1 Objetivo geral

Identificar *Candida* spp. isoladas de solo de área cultivada com aplicação de agrotóxicos e da mata nativa adjacente, assim como investigar a sensibilidade aos antifúngicos clínicos e agrícolas destas leveduras, nas formas planctônica e de biofilme.

4.2 Objetivos específicos

1. Identificar espécies de *Candida* spp. isoladas de solo de área cultivada com aplicação de agrotóxicos e de mata nativa;

2. Investigar a sensibilidade antifúngica de *Candida* spp. a anfotericina B e aos derivados azólicos fluconazol, itraconazol, voriconazol, tetraconazol e tebuconazol;

3. Avaliar a produção de biofilme por *Candida* spp. isoladas das áreas de estudo;

4. Investigar a sensibilidade antifúngica dos biofilmes de *Candida* spp. a voriconazol, tetraconazol e tebuconazol.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Área de estudo

O presente estudo foi desenvolvido no Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) pertencente ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC).

5.2 Colheita do solo

As amostras foram obtidas no perímetro irrigado Baixo Acaraú, localizado na região Norte do estado do Ceará, Brasil (2° 53’ 08” latitude e 40° 07’ 12” longitude), em duas áreas diferentes: uma área cultivada com aplicação de agrotóxicos e uma área de mata nativa. As amostras de solo foram colhidas segundo Rech et al. (2013), com modificações.

A serapilheira presente na superfície do solo foi removida manualmente com a utilização de luvas. Foram selecionadas dez plantas em cada área, nas quais foram selecionados três pontos próximos de cada planta e, com o auxílio de uma espátula estéril, foi colhido o solo a uma profundidade de 0-20 cm.

Os fungicidas que eram utilizados na área cultivada durante a realização da colheita das amostras são ilustrados na tabela 2.

Tabela 2 - Fungicidas utilizados na área cultivada durante a realização das coletas.

Princípio ativo	Grupo químico
Clorotalonil + tiofanato-metílico	Carbonitrila+ benzimidazol
Azoxistrobina+ ciproconazol	Estrobilurina+ triazol
Piraclostrobina+Epoxiconazol	Estrobilurina+ triazol
Tiofanato-metílico	Benzimidazol
Carbendazim	Benzimidazol
Difenoconazol	Triazol
Mancozebe	Ditiocarbamato
Tiabendazol	Benzimidazol

As amostras foram transferidas para frascos estéreis, acondicionadas em caixas isotérmicas e devidamente transportadas ao Laboratório de Biologia Ambiental e Microbiologia – LABIAM, no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará *Campus* Acaraú para o processamento.

5.3 Isolamento dos micro-organismos do solo

O isolamento dos micro-organismos foi realizado através da técnica de diluição seriada segundo Abboud (2014) e Pinotti *et al*. (2011), com modificações, nas quais 1g do solo foi homogeneizado com 9 mL de solução salina (0,9% NaCl) estéril. Em seguida 1 mL dessa solução foi adicionada em 9mL de salina (0,9% NaCl) estéril, foram então realizadas diluições seriadas de 10^{-1} até chegar em diluição de 10^{-3}. Da diluição final (10^{-3}), foi retirada uma alíquota de 20 µL para semeadura em placa, que foram incubadas a 35°C por até 10 dias. Foi utilizado ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol (0,5 g/L) (HiMedia laboratories, Mumbai, Indía) para o isolamento primário.

As colônias foram repicadas e mantidas em ágar batata dextrose (Difco Laboratories, USA). As cepas foram mantidas na micoteca do Centro Especializado em Micologia Médica da Universidade Federal do Ceará – CEMM/UFC.

5.4 Identificação de *Candid*a spp.

As colônias foram semeadas em meio ChromAgar *Candida*® (Becton Dickinson, EUA) para verificar a pureza das cepas. Posteriormente, as leveduras foram cultivadas em ágar *Corn Meal* (HiMedia laboratories, Mumbai, Índia) acrescido de Tween-80 para realização do microcultivo. Além disso, também foram realizados testes de assimilação e fermentação de carboidrato baseado em DE HOOG; GUARRO; GEN (2000), e de formação de tubo germinativo.

A identificação molecular dos isolados de *C. parapsilosis sensu lato* foi realizada baseado em Tavanti *et al*. (2005) e as espécies do complexo de *C. famata / C. guilliermondii* foram baseada em Feng *et al*. (2014). Para tanto as colônias foram semeadas em meio ChromAgar *Candida*® (Becton Dickinson, EUA) e em seguida repicadas em ágar YEPD (extrato de levedura 1%; dextrose 2%; peptona 2%), após 48 horas foi realizado um inóculo

em água milli-Q estéril. A extração do DNA foi feita por meio do kit *High Pure PCR Template Preparetion* (Roche Applied Science kit, Germany).

Em seguida foi realizada a reação em cadeia de polimerase (PCR) convencional utilizado os primers SADH (F: 5 - GTTGATGCTGTTGGATTGT - 3 e R: 5 - CAATGCCAAATCTCCCAA - 3) para o complexo *C. parapsilosis* e ITS2F (5′– GATGTATTAGGTTTATCCAACTCGTTAC - CCTACTTCATTCC - CCC - CCC - ACTCCC - ACC - ACC - ACC - ACC)] - 3 ') para os complexos *C. famata / C. guilliermondii.* Posteriormente, os amplicons de *C. parapsilosis* foram digeridos usando a enzima *Ban I* (Termo Lab - Lituânia) (TAVANTI *et al*., 2005) e *C. famata / C. guilliermondii* foram submetidos a dupla digestão com as enzimas *BsaH I* e *Xba I* (Termo Lab - Lituânia) (FENG *et al*., 2014).

As digestões foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante e incubadas em banho-maria por até 16 h a 37º C, posteriormente, foi feita a eletroforese em gel de agarose a 3% para visualização dos produtos digeridos e a identificação das cepas de acordo com os padrões de corte das bandas.

5.5 Teste de sensibilidade planctônica *in vitro*

O teste de sensibilidade foi realizado com 46 cepas de *Candida* spp., sendo 24 da área cultivada com aplicação de agrotóxicos e 22 da área de mata nativa. O teste de sensibilidade foi realizado através do método de microdiluição em caldo de acordo com documento M27-A3 (CLSI, 2008).

Os antifúngicos clínicos fluconazol (0,125-64 µg/mL; Sigma Chemical Corporation, USA), itraconazol (0,0313-16 µg/mL; Sigma Chemical Corporation, USA), voriconazol (0,0313-16 µg/mL; Sigma Chemical Corporation, USA) e anfotericina B (0,0313-16 µg/mL; Sigma Chemical Corporation, USA), e os antifúngicos agrícolas tetraconazol (1-512 µg/mL; Domark 100 EC, IsagroSpA, Itália) e tebuconazol (1-512 µg/mL; Sigma Chemical Corporation, Alemanha) foram utilizados no experimento.

Os testes foram feitos em placas de 96 poços a um volume final de 200 µL por poço. O inóculo foi feito até atingir a turbidez equivalente a 0,5 na escala de Mc Farland a partir de colônias crescidas a 35º C por 24 horas, em seguida foram realizadas diluições de 1:50 e 1:20 em meio RPMI 1640. As placas foram incubadas à 35º C por 24 horas. Após o período de incubação foram realizadas leituras de inibição do crescimento fúngico de 50 e

100%, quando comparada ao controle de crescimento sem a droga, sendo 50% de inibição para fluconazol, itraconazol e voriconazol, e de 100% para anfotericina B. Para os antifúngicos agrícolas foram realizadas leituras de 50, 80 e 100% de inibição de crescimento fúngico quando comparado ao controle sem a droga. Como controle de qualidade do experimento, utilizou-se *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258.

5.6 Formação de biofilme de *Candida* spp.

A formação do biofilme foi feito segundo Brilhante *et al*. (2016), com modificações. O teste foi realizado com 46 cepas de *Candida* spp., o inóculo foi preparado em meio RPMI 1640, a suspensão foi ajustada até atingir a turbidez equivalente a 1 na escala de Mc Farland a partir de colônias crescidas a 35º C por 24 horas. Em seguida 200 µL do inóculo fúngico foram transferidos para placas de 96 poços de fundo chato, as quais foram incubadas a 37 ºC por 48 horas. Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi aspirado e os poços lavados duas vezes com tampão fosfato-salino (PBS) estéril. Posteriormente, os poços foram lavados com 200 µL de metanol (100%) e o sobrenadante foi aspirado. Foram adicionados 200 µL de cristal violeta (0,3%) em cada poço. Após 20 minutos, o corante foi aspirado e os poços lavados com 200 µL de água destilada, em seguida 200 µL de ácido acético (33%) foram adicionados aos poços corados, os quais foram transferidos para uma nova placa de 96 poços de fundo chato. Poços contendo apenas meio de cultura sem inóculo foram utilizados como controle negativo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. *C. albicans* ATCC 10231 foi utilizada como controle de produção de biofilme.

As leituras das placas foram realizadas no espectrofotômetro a 590nm para obtenção dos valores de OD. A absorbância dos valores do ponto de corte dos controles (ODc) foram então comparadas com absorbância dos valores de ponto de corte das amostras (ODt). Os valores de ODc foi definido como três desvios padrões acima da média de OD590nm do controle negativo. As cepas foram classificadas como não formadora ($ODt<ODc$), fraca formadora ($ODc < ODt \leq 2x\ ODc$), moderada formadora ($2xODc < ODt \leq 4x\ ODc$) ou forte formadora de biofilme ($ODt > 4x\ ODc$) (CORDEIRO *et al*., 2015).

5.7 Teste de sensibilidade em biofilme de *Candida* spp.

O teste de sensibilidade antifúngica em biofilme de *Candida* spp. foi realizado com 21 cepas e uma *C. albicans* ATCC 10231, sendo 12 *C. parapsilosis stricto sensu* (6 da área cultivada e 6 da área de mata nativa), 5 *C. albicans* (2 da área cultivada e 3 da área de mata nativa) e 4 *C. fermentati* (1 da área cultivada e 3 de mata nativa).

Os biofilmes foram formados como descrito no item 5.6. Após formação, os poços foram lavados duas vezes com PBS estéril para remoção das células não aderentes e, posteriormente, 200 µL de meio RPMI 1640 contendo diluições seriadas de cada antifúngico foram adicionadas aos poços contendo biofilme de *Candida* spp. As placas foram incubadas a 37º C por 24 horas. As drogas utilizadas no experimento foram: voriconazol (64-1024 µg/mL), tetraconazol (64-1024 µg/mL) e tebuconazol (64 -1024 µg/mL).

A atividade metabólica foi avaliada pelo ensaio de redução de XTT (sal de tetrazólio 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5- sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida, XTT; Sigma Chemical Co., EUA). Após o término do tempo de incubação as placas foram lavadas duas vezes com PBS e posteriormente foi adicionado 100 µL do mix do XTT (50 µl de PBS, 75 µl de XTT (1 mg mL^{-1} Sigma)) e 6 µl de Menadiona (1mM em acetona; Sigma Chemical Co). As placas foram incubadas no escuro a 37º C por 3 horas. A análise foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 492 nm.

A concentração inibitória mínima do biofilme (CIMB) foi determinada como a concentração capaz de causar 50% ($CIMB_{50}$) de redução da atividade metabólica do biofilme, quando comparada à atividade metabólica do biofilme sem droga. Poços com biofilme sem a adição de drogas foram utilizados como controle de crescimento e poços sem crescimento de biofilme como controle de esterilidade (BRILHANTE *et al*., 2016).

5.8 Análise estatística

Para a análise dos resultados de isolamento de espécies por área foi utilizado o Teste Qui-quadrado e nos resultados de $CIMB_{50}$ entre as drogas foi utilizado o Teste Exato de Fisher. Em todas as situações, o nível de significância máximo, adotado para conclusões afirmativas, foi de 5%.

6 RESULTADOS

6.1 Identificação de *Candida* spp.

Foram isoladas e identificadas 46 leveduras do gênero *Candida* nas duas áreas de estudo. As espécies identificadas foram: *C. parapsilosis stricto sensu* (26/46), *C. albicans* (10/46), *C. fermentati* (4/46), *C. tropicalis* (3/46), *C. metapsilosis* (2/46) e *C. orthopsilosis* (1/46), sendo verificada uma maior ocorrência da espécie *C. parapsilosis stricto sensu* na área cultivada com aplicação de agrotóxico (p=0,0253) e na mata nativa (p=0,0378), quando comparada às outras espécies investigadas (Tabela 3).

Com relação à distribuição das espécies fúngicas nas diferentes áreas de coleta, a área cultivada com aplicação de agrotóxico apresentou 24/46 isolados, sendo *C. parapsilosis stricto sensu, C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. metapsilosis* e *C. fermentati.* E a área de mata nativa apresentou 22/46 dos isolados, sendo *C. parapsilosis stricto sensu*, o isolado mais frequente, seguido de *C. albicans*, *C. fermentati*, *C. tropicalis* e *C. orthopsilosis* (Tabela 3).

Tabela 3 - Distribuição das espécies de *Candida* spp. nos diferentes sítios de coleta.

Espécies	Área cultivada	Área de mata nativa
C. parapsilosis stricto sensu	14	12
C. albicans	5	5
C. fermentati	1	3
C. tropicalis	2	1
C. metapsilosis	2	0
C. orthopsilosis	0	1
Total	24	22

Legenda: Comparação da ocorrência das espécies de *Candida* nas áreas de isolamento.

6.2 Teste de sensibilidade planctônica *in vitro*

As CIMs encontradas para os antifúngicos clínicos testados foram: 0,25-2 µg/mL e 0,25-4 µg/mL de fluconazol para as cepas do solo da área cultivada e de mata nativa, respectivamente; O itraconazol inibiu o crescimento fúngico nas concentrações de ≤0,03-0,06 µg/mL e ≤0,03-1 µg/mL nas cepas da área cultivada e de mata nativa, respectivamente.

Enquanto, o voriconazol inibiu o crescimento fúngico nas concentrações de ≤0,03-0,06 µg/mL e ≤0,03-0,5 µg/mL para os isolados da área cultivada e de mata nativa, respectivamente. E anfotericina B mostrou inibição em 0,03- 0,5 µg/mL para os isolados da área cultivada e ≤0,03-0,5 µg/mL para os de mata nativa (Tabela 4).

Tabela 4 - Sensibilidade de *Candida* spp. na forma planctônica aos antifúngicos clínicos.

Origem	Espécies(n)	CIM (µg/mL)			
		FLU	ITR	VOR	AMB
AC	*C. parapsilosis stricto sensu* (14)	0,25-1	≤0,03	≤0,03	0,03-0,5
MN	*C. parapsilosis stricto sensu* (12)	0,25-4[NTS]	≤0,03-1[R/ NTS]	≤0,03-0,5[NTS]	≤0,03-0,25
AC	*C. albicans* (5)	0,25-1 [NTS]	0,06	0,03-0,06[NTS]	0,06-0,125
MN	*C. albicans* (5)	0,25-1 [NTS]	0,03-0.06	0,03	0,03-0,125
AC	*C. fermentati* (3)	1-2	0,03-0.06	0,03-0,06	0,125-0,5
MN	*C. fermentati* (1)	1	0,06	0,03	0,5
AC	*C. tropicalis* (2)	0,5-1	≤0,03	≤0,03	0,125
MN	*C. tropicalis* (1)	0,5	0,06	0,03	0,125
AC	*C. metapsilosis* (2)	0,25-0,5	0,03	≤0,03	0,5
MN	*C. orthopsilosis* (1)	0,25	0,03	0,03	0,03
	C. parapsilosis ATCC 22019 (1)	1	0,06	0,03	0,125
	C. krusei ATCC 6258 (1)	8	1	0,06	0,5

Legenda: CIM = Concentração inibitória mínima, FLU= Fluconazol, ITC = Itraconazol, VOR= Voriconazol, AMB = Anfotericina B. MN= Área de mata nativa. AC= Área cultivada. [R] = Resistência de uma cepa (Ponto de corte, CLSI); [NTS] = Cepa tipo não selvagem (Ponto de corte epidemiológico). As CIMs apresentadas acima expressam a leitura de 24 horas.

Vale destacar o isolamento de uma cepa de *C. parapsilosis stricto sensu* resistente ao itraconazol. E algumas cepas isoladas tanto do solo da área cultivada, como da mata nativa foram classificadas como não selvagem para os azólicos clínicos, sendo: Uma cepa de *C. parapsilosis stricto sensu* e duas cepas de *C. albicans* ao fluconazol; Uma cepa de *C. parapsilosis stricto sensu* ao itraconazol; Uma cepa de *C. parapsilosis stricto sensu* e duas cepas *C. albicans* ao voriconazol de acordo com o ponto de corte epidemiológico.

Além disso, quatro cepas de *C. albicans* do solo da área cultivada apresentaram *trailing* para todos os azólicos clínicos testados, bem como duas cepas de *C. albicans* e uma cepa de *C. parapsilosis stricto sensu* isoladas da mata nativa.

Considerando a leitura de 50% de inibição do crescimento fúngico para o antifúngico agrícola tetraconazol os intervalos das CIMs encontradas foram de 1-4 µg/mL e 1-8 µg/mL para os isolados da área cultivada e da mata nativa, respectivamente. Enquanto, a CIM80% e CIM100% foram de 1-16 µg/mL e 1-128 µg/mL, respectivamente, para ambas as áreas pesquisadas.

Tebuconazol inibiu em 50% o crescimento fúngico nas concentrações de 1-8 µg/mL para os isolados da área cultivada e de 1-4 µg/mL para os isolados de mata nativa. Enquanto, a CIM80% foram de 1-16 µg/mL para ambas as áreas pesquisadas. A CIM100% foram de 1-32 µg/mL para os isolados da área cultivada e de 1- 64 µg/mL para os isolados de mata nativa (Tabela 5).

Tabela 5 - Sensibilidade de *Candida* spp. na forma planctônica aos antifúngicos agrícola.

		CIM (µg/mL)					
		Tetraconazol			**Tebuconazol**		
Origem	**Espécies (n)**	**50%**	**80%**	**100%**	**50%**	**80%**	**100%**
AC	*C. parapsilosis stricto sensu* (14)	1	1-2	1-64	NA	1	1-8
MN	*C. parapsilosis stricto sensu* (12)	1-8	1-16	1-128	NA	1	1-8
AC	*C. albicans* (5)	1-2	1-16	16-128	1-8	1-16	16-32
MN	*C. albicans* (5)	1-2	1-8	32-64	2-4	8-16	32-64
AC	*C. fermetati* (1)	4	8	32	1	4	32
MN	*C. fermetati* (3)	1-4	1-8	1-64	NA	1	1-8
AC	*C. tropicalis* (2)	NA	1	16-64	1	1-4	16
MN	*C. tropicalis* (1)	NA	1	8	1	2	16
AC	*C. metapsilosis* (2)	1	2	64	NA	NA	1
MN	*C. orthopsilosis* (1)	4	16	128	NA	1	8
	C. parapsilosis ATCC 22019 (1)	4	32	64	NA	NA	4
	C. krusei ATCC 6258 (1)	8	32	128	NA	NA	4

Legenda: CIM = Concentração inibitória mínima. MN= Área de mata nativa. AC= Área cultivada. NA= Não apresentou leitura. As CIMs apresentadas acima expressam a leitura de 24 horas.

6.3 Formação do biofilme de *Candida* spp.

As 46 cepas de *Candida* spp. avaliadas no estudo apresentaram capacidade de formar biofilme *in vitro,* sendo 28 classificadas como forte formadoras (60,9%) e 18 classificadas como moderada formadoras de biofilme (39,1%).

Em relação às diferentes áreas 15 cepas da área cultivada foram classificadas como forte formadora, sendo 12 *C. parapsilosis stricto sensu* e 3 *C. albicans.* E nove cepas classificadas como moderada formadoras de biofilme, sendo 2 *C. parapsilosis stricto sensu,* 2 *C. albicans,* 2 *C. tropicalis,* 1 *C. fermetati* e 2 *C. metapsilosis.*

Na área de mata nativa 13 cepas foram classificadas como forte formadora sendo 9 *C. parapsilosis stricto sensu,* 3 *C. albicans,* 1 *C. fermentati.* E 9 cepas foram classificadas como moderada formadora, sendo 3 *C. parapsilosis stricto sensu*, 2 *C. albicans*, 1 *C. tropicalis*, 2 *C. fermentati* e 1 *C. orthopsilosis* (Tabela 6).

Tabela 6 - Classificação da formação dos biofilmes de *Candida* spp..

Origem	Espécies (n)	Classificação
AC	*C. parapsilosis stricto sensu* (2)	Moderada
	C. parapsilosis stricto sensu (12)	Forte
MN	*C. parapsilosis stricto sensu* (3)	Moderada
	C. parapsilosis stricto sensu (9)	Forte
AC	*C. albicans* (2)	Moderada
	C. albicans (3)	Forte
MN	*C. albicans* (2)	Moderada
	C. albicans (3)	Forte
AC	*C. tropicalis* (2)	Moderada
MN	*C. tropicalis* (1)	Moderada
AC	*C. fermentati* (1)	Moderada
MN	*C. fermentati (*2)	Moderada
	C. fermentati (1)	Forte
AC	*C. metapsilosis* (2)	Moderada
MN	*C. orthopsilosis* (1)	Moderada

Legenda: MN= Área de mata nativa. AC=Área cultivada.

6.4 Teste de sensibilidade em biofilme de *Candida* spp.

Os antifúngicos agrícola tetraconazol e tebuconazol reduziram em 50% (p=0,0431) a atividade metabólica de 10/21cepas sendo 1 *C. parapsilosis stricto sensu,* 5 *C. albicans* e 4 *C. fermentati* com ranges variando de 128-1024 µg/mL, mas esta atividade no geral, não foi encontrada para o voriconazol, que apresentou atividade apenas para 2 cepas de *C. fermentati* e 1 *C. albicans* com $CIMB_{50}$ de 512 µg/mL (Tabela 7).

Tabela 7 - Sensibilidade antifúngica de *Candida* spp., em biofilme.

		$CIMB_{50}$ (µg/mL)		
		Voriconazol	**Tetraconazol**	**Tebuconazol**
Origem	**Espécies (n)**	**50%**	**50%**	**50%**
AC	*C. parapsilosis stricto sensu* (6)	>1024	512->1024	512->1024
MN	*C. parapsilosis stricto sensu* (6)	>1024	>1024	>1024
AC	*C. albicans* (2)	512->1024	1024	256-512
MN	*C. albicans* (3)	>1024	256-1024	128- 512
AC	*C. fermentati* (1)	512	128	512
MN	*C. fermentati* (3)	512->1024	256-512	256-512
	C. albicans ATCC 10321 (1)	64	64	64

Legenda: Comparação dos resultados de $CIMB_{50.}$ CIMB = Concentração inibitória mínima do biofilme de *Candida* spp. MN= Área de mata nativa. AC=Área cultivada.

7 DISCUSSÃO

O solo é um ecossistema heterogêneo, e contêm uma grande diversidade de micro-organismos, dentre eles, as leveduras, que podem estar presentes no solo ou podem ser introduzidas nele a partir dos organismos que vivem dentro ou sobre o solo (WÓJCIK; KURNATOWSKI; BŁASZKOWSKA, 2013; BOTHA, 2011).

A composição e diversidade de espécies nos diferentes locais dependem de fatores abióticos e bióticos presentes no solo, como compostos químicos orgânicos e inorgânicos e umidade, bem como outros organismos que vivem acima e no solo (WÓJCIK; KURNATOWSKI; BŁASZKOWSKA, 2013).

No presente trabalho, foram isoladas e identificadas nas duas áreas de estudo as espécies *C. parapsilosis stricto sensu, C. albicans, C. fermentati, C. tropicalis, C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*. Outros autores relataram a ocorrências dessas espécies no solo (MACIEL *et al*., 2019; CARVALHO *et al*., 2013; PANNEERSELVAM; ARUMUGAM, 2012).

A espécie mais frequente foi *C. parapsilosis*, uma espécies isolada com frequência de ambientes de solo, como foi observado em outros trabalhos (YURKOV *et al*., 2016; PANNEERSELVAM; ARUMUGAM, 2012). Além disso, vale ressaltar que o isolamento *C. fermentati* espécie que pertence ao complexo de *C. guilliermondii* é pouco frequente no solo, sendo comumente relacionada a infecções fungicas ou como comensal da microbiota humana.

O isolamento dessas leveduras gera preocupação uma vez que, o gênero *Candida* é reconhecido como a quarta causa mais comum de doenças infecciosas, e são responsáveis por causar infecções oportunistas, com taxas brutas de mortalidade de 40%. Mais de 90% das infecções invasivas por *Candida* são atribuídas a cinco espécies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (SHAPIRO; ROBBINS; COWEN, 2011), das quais, destas, três foram isoladas no presente estudo.

No solo as leveduras desempenham papeis importantes como: contribuição na estrutura do solo, reciclagem de nutrientes, decomposição de material orgânico, formação de agregados do solo, além disso, possui elevada capacidade de retenção de água e promoção do crescimento de plantas (MASINOVÁ *et al*., 2017).

Não houve diferença na diversidade fúngica das espécies isoladas entre as áreas de estudo, resultado que corrobora com Castañeda *et al*. (2018), que observaram não haver

diferença na diversidade fúngica de isolados de ambiente florestais e de cultivo de uva. Sendo assim, as florestas nativas poderiam contribuir para as comunidades microbianas das vinhas agindo como reservatórios da diversidade microbiana.

Além disso, a ocorrência de dispersão fúngica por meio das plantas, do ar, de sementes e animais não é limitada localmente, e a composição de comunidades fúngicas transportadas pelo ar não difere entre áreas cultivadas e fragmentos florestais (CASTAÑEDA *et al*., 2018; FORT *et al*., 2016), o que explicaria o fato das espécies isoladas na área cultivada serem as mesmas espécies presente na área de mata nativa, desta forma, as práticas agrícolas poderiam não afetar a diversidade fúngica.

Em relação à sensibilidade antifúngica, os valores das CIMs de fluconazol, itraconazol, voriconazol e anfotericina B foram baixas em comparação com os descritos por Yang *et al*. (2012), que relataram CIMs de 64 mg/L para fluconazol, 8 mg/L para voriconazol e 1 mg/L para anfotericina e Maciel *et al*. (2019), observaram CIMs de 64 µg/mL para fluconazol, 16 µg/mL para itraconazol e 8 µg/mL para anfotericina B em cepas de *Candida* spp. isoladas do solo.

No presente trabalho foi observada uma cepa de C. *parapsilosis stricto sensu* resistente ao itraconazol. Por isso, o monitoramento de leveduras ambientais é importante, uma vez que, populações sensíveis ou não, que coabitam ambientes podem ser reduzidas pela seleção de isolados resistentes a antifúngicos, e fungos provenientes de ecossistemas agrícolas como patógenos oportunistas, possui maior possibilidade de ter tolerância cruzada aos azólicos usados no campo médico (RIBAS *et al*., 2016).

Ademais, embora não tenha sido observada resistência nas demais cepas, considerando o ponto de corte epidemiológico (ECVs), que classifica os isolados em tipo selvagem (TS) e não selvagem (não-TS), algumas cepas isoladas da área cultivada e da mata nativa foram classificadas como não selvagem para os azólicos clínicos, sendo: uma cepa de *C. parapsilosis stricto sensu* e duas cepas de *C. albicans* para fluconazol; uma cepa de *C. parapsilosis stricto sensu* para itraconazol; uma cepa de *C. parapsilosis stricto sensu* e duas cepas *C. albicans* para voriconazol de acordo com o ponto de corte epidemiológico estabelecido por CLSI (2018); Pfaller *et al*. (2014); Espinel-ingroff *et al*. (2012) e Pfaller e Diekema (2012).

Os dados do ECV são relevantes, pois o ECV é um valor limiar inicial de CIM que permite a discriminação de cepas do tipo selvagem (aquelas sem mecanismos de resistência mutacionais ou adquiridos) de cepas não selvagens (aquelas com mecanismos de

resistência mutacionais ou adquiridas). E assim, os valores do ECVs podem ser usados como um meio de monitorar o surgimento de resistência a antifúngico (PFALLER; DIEKEMA (2012).

Foi observado que cepas de C. *albicans* do solo da área cultivada e da mata nativa, bem como, cepa de *C. parapsilosis stricto sensu* da área de mata nativa apresentaram *trailing* para todos os azólicos clínicos. O termo *trailing* é usado para descrever o crescimento reduzido, mas persistente, que alguns isolados de *Candida* spp. exibem em concentrações acima da CIM em testes de diluição em caldo com antifúngicos azólicos (LEE *et al*., 2004). E está relacionado com a capacidade do micro-organismos de tolerar a presença de antifúngicos azólicos, sendo os isolados capazes de sobreviver e proliferar na presença desses antifúngicos (LUNA-TAPIA; BUTTS; PALMERA, 2018).

Quanto aos antifúngicos agrícolas as CIMs também foram baixas, mas as cepas apresentaram diferentes perfis de sensibilidade, no qual para inibir 100% do crescimento fúngico foram necessárias uma concentração de tetraconazol que variou de 1-128 µg/mL, enquanto, tebuconazol as concentrações variaram de 1-64 µg/mL.

Além disso, as cepas apresentaram perfil de sensibilidade semelhante nas duas áreas de estudo, o que poderia ser explicado pelo fato de que, no meio ambiente os agrotóxicos que são aplicados em determinada área podem ser deslocados para outras áreas por meio do vento ou outros compartimentos do agroecossistema como, por exemplo, pela água e são depositados em outras áreas (RIVERA-BECERRIL, 2017; SOCORRO *et al*., 2016), desta forma, as leveduras da área de mata nativa poderiam ser influenciada pelos agrotóxicos que são pulverizados na área cultivada.

As 46 cepas isoladas no estudo foram capazes de formar biofilmes e foram classificadas como forte ou moderada formadora.

Os biofilmes são um dos estilos de vida mais distribuídos e bem-sucedidos da terra. Em particular, a maioria dos micro-organismos não existe em um estado de vida livre, mas formam biofilmes para aumentar sua aptidão e tornarem-se mais adaptados para sobreviver em ambientes estressantes. Os biofilmes de leveduras são encontrados em quase toda parte, no solo, na água ou colonizando animais, incluindo seres humanos (ALTERIIS *et al*., 2018).

No solo os biofilmes estão aderentes a partículas do solo ou superfícies bióticas como raízes, folhas, troncos ou em matéria orgânica em decomposição. E embora os solos sejam um ambiente complexo e dinâmico, os biofilmes podem estabilizar as condições que

cercam os micro-organismos, e confere proteção contra predação, dessecação e exposição a antimicrobianos, melhorando a disponibilidade de nutrientes e oxigênio (CAI *et al*., 2019).

Em relação a sensibilidade dos biofilmes, as cepas em biofilmes foram tolerantes as altas concentrações de voriconazol, sendo este antifúngico capaz de reduzir em 50% o biofilme de apenas uma cepa de *C. albicans* e duas *C. fermentati*.

O fenômeno de resistência dos biofilmes aos antimicrobianos, dentre outros fatores está relacionado ao aumento da atividade metabólica, alta densidade de células microbianas que formam a estrutura madura do biofilme, baixa penetração das drogas microbianas através da matriz extracelular, efluxo de drogas intracelulares através de bombas e proteínas transportadoras, e a presença de uma subpopulação pequena e distinta de células microbianas denominadas persistentes que é formada espontaneamente dentro de um biofilme (SANTOS *et al*., 2018).

A tolerância dos biofilmes de *Candida* ao voriconazol já foi relatada por outros autores (PULCRANO *et al*., 2012; KUHN *et al*., 2002). No presente estudo os biofilmes foram menos tolerantes aos antifúngicos agrícolas, sendo encontrado $CIMB_{50}$ para 10/21 cepas, sendo uma *C. parapsilosis stricto sensu*, 5 C. *albicans* e 4 C. *fermentati*.

Pouco se sabe sobre o efeito do tetraconazol e tebuconazol sobre os biofilmes de *Candida* spp.. Entretanto, sabe-se que o tebuconazol age inibido a formação e crescimento de hifas e pseudohifas dos fungos causando modificações que inclui formação de septos incompletos, vacuolização excessiva e necrose progressiva (SCHOLZE, 2006). Desta forma, sendo as hifas e pseusohifas um dos principais componentes dos biofilmes, antifúngicos que possam atravessar a matriz extracelular polimérica e afetar essas estruturas podem comprometer a estabilidade do biofilme e causar sua redução ou morte.

Além disso, já foi relato que o voriconazol mesmo quando consegue entrar no biofilme de *Candida* falha em produzir a morte das células do biofilme (SINGH *et al*., 2018; AL-FATTANI; DOUGLAS, 2004).

Desta forma, os biofilmes podem expressar mecanismos de resistência ao voriconazol, dos quais não foram capazes de expressar ou produzir para os azólicos agrícolas que ao entrarem no biofilme foram capazes de ter efeito. Mas outros estudos devem ser realizados para determinar quais são esses mecanismos de resistência.

Vale destacar, que tetraconazol e tebuconazol apresentaram redução de $CIMB_{50}$ de apenas uma cepa de *C. parapsilosis stricto sensu*, fato que pode ter ocorrido em virtude do isolamento de *C. parapsilosis stricto sensu*, ser mais comum no solo do que as outras duas

espécies e poderia ser mais frequentemente exposto a azólicos agrícolas, apresentando maior tolerância a esses antifúngicos.

O uso de fungicidas azólicos na agricultura é um fator de risco potencial para o desenvolvimento e / ou transmissão de resistência a azólicos clínicos em fungos clinicamente importantes, resultado em resistência cruzada. Desta forma, o uso de azólicos tanto na medicina como na agricultura exige precauções. Vale destacar que a identificação e os testes de sensibilidade *in vitro* de isolados ambientais contribuem para o monitoramento destes fungos (MULLER *et al*., 2007).

8 CONCLUSÕES

- O solo apresenta uma diversidade de leveduras do gênero *Candida*, com destaque para o complexo *C. parapsilosis*;

- As cepas de *Candida* spp., independentes da área de estudo, não apresentaram resistência aos antifúngicos azólicos e anfotericina B, excetuando-se uma *C. parapsilosis stricto sensu* isolada do solo da mata nativa, que mostrou resistência ao itraconazol;

- Todas as cepas foram capazes de formar biofilmes, sendo classificadas em moderada ou forte formadoras de biofilmes;

- Os biofilmes, no geral, foram menos tolerantes aos antifúngicos agrícolas tetraconazol e tebuconazol, quando comparados ao voriconazol.

REFERÊNCIAS

ABBOUD, M. A. AL. Bioimpact of application of pesticides with plant growth hormone (*gibberellic acid*) on target and non-target microorganisms. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, n. 6, p. 1005–1010, 2014.

AL-FATTANI, M. A.; DOUGLAS, L. J. Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 9, p. 3291–3297, 2004.

AL-SWEIH, N.; AHMAD, S.; JOSEPH, L.; KHAN, S.; VAYALIL, S.; CHANDY, R.; KHAN, Z. *Candida fermentati* as a cause of persistent fungemia in a preterm neonate successfully treated by combination therapy with amphotericin B and caspofungin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 3, p.1038 –1041, 2015.

ÁLVARES, C. A.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Candidíase vulvovaginal: Fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 5, p. 319-327, 2007.

ANVISA - Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. **Agrotóxicos: Monografias autorizadas**. Disponível em http://portal.anvisa.gov.br/registros eautorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas, acesso em novembro, 2019.

ANVISA - Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução- RE Nº 2.080, de 31 de julho de 2019**. Disponível em http://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-re-n-2080-de-31-de-julho-de-2019-208203097, acesso em Janeiro, 2020.

AKTAR, W.; SENGUPTA, D.; CHOWDHURY, A. Impact of pesticides use in agriculture: Their benefits and hazards. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 2, n. 1, p. 1–12, 2009.

AZCÓN, R.; PERÁLVAREZ, M. C.; ROLDAN, A.; BAREA, J. M. Arbuscular mycorrhizal fungi, *Bacillus cereus*, and *Candida parapsilosis* from a multicontaminated soil alleviate metal toxicity in plants. **Microbial Ecology**, v. 59, n. 4, p. 668–677, 2010.

AZEVEDO, M. M.; FARIA-RAMOS, I.; CRUZ, L.; PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A. G. Genesis of azole antifungal resistance from agriculture to clinical settings. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 34, p.7463-7468, 2015.

ALTERIIS, E.; LOMBARDI, L.; FALANGA, A.; NAPOLANO, M.; GALDIERO, S.; SICILIANO, A.; CAROTENUTO, R.; GUIDA, M.; GALDIERO, F. Polymicrobial antibiofilm activity of the membrano tropic peptide gH625 and its analogue. **Microbial Pathogenesis**, v. 125, p. 189–195, 2018.

BAĆMAGA, M.; WYSZKOWSKA, J.; KUCHARSKI, J. The influence of chlorothalonil on the activity of soil microorganisms and enzymes.**Ecotoxicology**, v. 27, n. 9, p.1188–1202, 2018.

BERGER, S.; CHAZLI, Y. E.; BABU, A. F.; COSTE, A. T. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: A Consequence of Antifungal Use in Agriculture? **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.

BLAGODATSKAYA, E.; KUZYAKOV, Y. Active microorganisms in soil: Critical review of estimation criteria and approaches. **Soil Biology and Biochemistry**,v. 67, p.192–211, 2013.

BOTHA, A. The importance and ecology of yeasts in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 43, p. 1-8, 2011.

BOWYER, P.; DENNING, D. W. Environmental fungicides and triazole resistance in *Aspergillus*. **Pest Management Science**, v. 70, n. 2, p.173–178, 2014.

BRAIBANTE, M. A. F.; ZAPPE, J. A. A quimica dos agrotóxicos. **Química nova escola**, v. 34, n.1, p. 10-15, 2012.

BRAUER, V. S.; REZENDE, C. P.; PESSONI, A. M.; PAULA, R. G.; RANGAPPA, K. S.; NAYAKA, S. C.; GUPTA, V. K.; ALMEIDA, F. Antifungal Agents in Agriculture: Friends and Foes of Public Health. **Biomolecules**, v. 9, n. 10, p. 521, 2019.

BRILHANTE, R. S. N.; ALENCAR, L. P.; BANDEIRA, S. P.; SALES, J. A.; EVANGELISTA, A. J. J. J.; SERPA, R.; CORDEIRO, R. A.; PEREIRA-NETO, W. A.; SIDRIM, J. J. C.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; ROCHA, M. F. G. Exposure of *Candida parapsilosis* complex to agricultural azoles: An overview of the role of environmental determinants for the development of resistance. **Science of the Total Environment**, v. 650, p. 1231–1238, 2019.

BRILHANTE, R. S. N.; OLIVEIRA, J. S.; EVANGELISTA, A. J. J.; SERPA, R.; SILVA, A. L.; AGUIAR, F. R. M.; PEREIRA, V. S.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; PEREIRA-NETO, W. A.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Candida tropicalis* from veterinary and human sources shows similar in vitro hemolytic activity, antifungal biofilm susceptibility and pathogenesis against *Caenorhabditis elegans.* **Veterinary Microbiology**, v. 192, p. 213–219, 2016.

CAI, P.; SUN, X.; WU, Y.; GAO, C.; MORTIME, M.; HOLDEN, P. A.; REDMILE-GORDON, M.; HUANG, Q. Soil biofilms: Microbial interactions, challenges, and advanced techniques for *ex-situ* characterization. **Soil Ecology Letters**, v.1, p. 85-93, 2019.

CASTAÑEDA, L. E.; MIURA, T.; SANCHEZ, R.; AND BARBOSA, O. Effects of agricultural management on phyllosphere fungal diversity in vineyards and the association with adjacent native forests. **PeerJ***,* v. 6, p. 5715, 2018.

CARVALHO, F. P.; SOUZA, A. C.; GUEDES, K. T. M.; DIAS, D, T.; SILVA, C, F.; SCHWAN, R. F.Yeasts diversity in Brazilian Cerrado soils: Study of the enzymatic activities. **African Journal of Microbiology**, v. **7**, p. 4176–4190, 2013.

CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M. C. *Candida* Biofilms: Threats, challenges, and promising strategies. **Frontiers in Medicine**, v. 5, n. FEB, p. 1–15, 2018.

CHANDRAN, P.; DAS, N. Role of plasmid in diesel oil degradation by yeast species isolated from petroleum hydrocarbon-contaminated soil. **Environmental Technology**, v. 33, n. 6, p. 645–652, 2012.

CHEN, C. Y.; UANG, S.; TANG, J.; TSAY, W.; YAO, M.; KO, B.; CHOU, W.; TIEN, H.; HSUEH, P. Clinical features of patients with infections caused by *Candida guilliermondii* and *Candida fermentati* and antifungal susceptibility of the isolates at a medical centre in Taiwan, 2001–10. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n.11, p. 2632–2635, 2013.

CHOWDHURY, A.; PRADHAN, S.; SAHA, M.; SANYAL, N. Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies. **Indian Journal of Microbiology**, v. 8, p. 114–127, 2008.

CLSI (2018). Epidemiological Cutoff Values for Antifungal Susceptibility Testing. 2st ed. CLSI supplement M59. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

CLSI (2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved Standard. CLSI Document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

CORDEIRO, R. A.; OLIVEIRA, J. S.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; TEXEIRA, C. E. C.; MARQUES, F. J. F.; BITTENCOURT, P. V.; CARVALHO, V. L.; BANDEIRA, T. J. P. G.; BRILHANTE, R. S. N.; MOREIRA, J. L. B.; PEREIRA-NETO, W. A.; COSTA SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Candida tropicalis* isolates obtained from veterinary sources show resistance to azoles and produce virulence factors. **Medical Mycology**, v. 53, p. 145–152, 2015.

COWEN, L. E.; SANGLARD, D.; HOWARD, S. J.; ROGERS, P. D.; PERLIN, D. S. Mechanisms of antifungal drug resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v.5, p. a019752, 2015.

DALHOFF, A. Does the use of antifungal agents in agriculture and food foster polyene resistance development? A reason for concern. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 13, p. 40–48, 2018.

DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GEN´, E. J. **Atlas of Clinical Fungi** 2nd edition. Washington: American Society for Microbiology, 2000.

DEISING, H. B.; REIMANN, S.; PASCHOLATI, S. F. Mechanisms and significance of fungicide resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 286–295, 2008.

DIMOVA, N. D.; IOVKOVA, Z. S.; BRINKOVA, M.; GODJEVARGOVA, T S. I. Production of *Candida* biomass from hydrolysed agricultural biowaste. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 24, n. 1, p. 1577–1581, 2010.

DOMINATI, E.; PATTERSON, M.; MACKAY, A. A framework for classifying and quantifying the natural capital and ecosystem services of soils. **Ecological Economics**, v. 69, n. 9, p.1858–1868, 2010.
ESPINEL-INGROFF, A.; PFALLER, M. A.; BUSTAMANTE, B.; CANTON, E.; FOTHERGILL, A.; FULLER, J.; GONZALEZ, C.; LASS-FLÖRL, S. R.; LOCKHART, E.;

MARTIN-MAZUELOS, J. F.; MEIS, M. S. C.; MELHEM, L.; OSTROSKY-ZEICHNER, T.; PELAEZ, M. W.; SZESZS, G.; ST- GERMAIN, L. X.; BONFIETTI, J.; GUARRO, J.; TURNIDGE. Multilaboratory study of epidemiological cutoff values for detection of resistance in eight *Candida* species to fluconazole, posaconazole, and voriconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n.4, p. 2006–2012, 2012.

FARIA-RAMOS, I.; FARINHA, S.; NEVES-MAIA, J.; TAVARES, P. R.; MIRANDA, I. M.; ESTEVINHO, L. M.; PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, C. G. Development of cross-resistance by *Aspergillus fumigatus* to clinical azoles following exposure to prochloraz, an agricultural azole. **BMC Microbiology**, v. 14, p. 155, 2014.

FENG, X.; WU, J.; LING, B.; YANG, X.; LIAO, W.; PAN, W.; YAO, Z. Development of two molecular approaches for differentiation ofc linically relevant yeast species closely related to *Candida guilliermondii* and *Candida famata.* **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 9, p. 3190–3195, 2014.

FLETCHER, S. Understanding the contribution of environmental factors in the spread of antimicrobial resistance. **Environmental Health and Preventive Medicine**, v. 20, n. 4, p. 243–252, 2015.

FORT, T.; ROBIN, C.; CAPDEVIELLE, X.; DELIÈRE, L.; VACHER, C. Foliar fungal communities strongly differ between habitat patches in a landscape mosaic. **Peerj**, v. 4, p. 2656, 2016.

FRAC, M.; HANNULA, S. E.; BELKA, M.; DRYCZA, M. J. Fungal biodiversity and their role in soil health. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. APR, p. 1–9, 2018.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 225–234, 2010.

GLUSHAKOVA, A. M.; KACHALKIN, A. V.; ZHELTIKOVA, M. T.; CHERNOV, I. Y. Resistance of various yeast ecological groups to prolonged storage in dry state. **Microbiology**, v. 84, n. 3, p. 442–448, 2015.

GOMEZ-LOPEZ, A.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; RODRIGUEZ, D.; ALMIRANTE, B.; PAHISSA, A.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; CUENCA-ESTRELLA, M. Prevalence and susceptibility profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: Results from population-based surveillance of candidemia in Spain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1506–1509, 2008.

GOUGOULIAS, C.; CLARK, J. M.; SHAW, L. J. The role of soil microbes in the global carbon cycle: Tracking the below-ground microbial processing of plant-derived carbon for manipulating carbon dynamics in agricultural systems. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 12, p. 2362–2371, 2014.

GROENEWALD, M.; LOMBARD, L.; VRIES, M.; LOPEZ, A. G.; SMITH, M.; CROUS, P. W. Diversity of yeast species from dutch garden soil and the description of six novel Ascomycetes. **FEMS Yeast Research**, v. 18, n.7, 2018.

GURGEL, A. M.; GUEDES, C. A.; GURGEL, I. G. D.; AUGUSTO, I. G. S. Reflexos da perda do controle estatal sobre os agrotóxicos no Brasil e sua regulação pelo mercado. **Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde**, v. 11, n. 3, 2017.

HERRERO-HERNÁNDEZ, E.; ANDRADES. M. S.; MARÍN-BENITO, J. M.; SANCHEZ-MARTIN, M. J.; RODRIGUEZ-CRUZ, M. S. Field-scale dissipation of tebuconazole in a vineyard soil amended with spent mushroom substrate and its potential environmental impact. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 6, p. 1480–1488, 2011.

HESLOP, O. D.; DE CEULAER, K.; RAINFORD, L.; NICHOLSON, A. M. A case of *Candida orthopsilosis* associated septic arthritis in a patient with Systemic Lupus Erythematosus (SLE). **Medical Mycology Case Reports**, v. 7, p. 1–3, 2015.

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

HOKKEN, M. W, J.; ZWAAN, B. J.; MELCHERS, W. J. G ; VERWEIJ, P. E. Facilitators of adaptation and antifungal resistance mechanisms in clinically relevant fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 132, p. 1087-1845, 2019.

JAMALI, S.; GHARAEI, M.; ABBASI, S. Identification of yeast species from un cultivated soils by sequence analysis of the hypervariable D1/D2 domain of LSU–rDNA gene in Kermanshah province, Iran. **Mycologia Iranica**, v. 3, n. 2, p. 87–98, 2016.

JEONG, H. M. A. Essays on agricultural externalities and benefit transfer of recreational fishing value. (**Dissertation**). Department of Agricultural, Environmental and Development Economics. Graduate School of The Ohio State University, 2004.

KALIA, A.; GOSAL, S. K. Effect of pesticide application on soil microorganisms. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 57, n. 6, p. 569–596, 2011.

KENIYA, M. V.; RUMA,Y. N.; TYNDALL, J. D. A.; MONK, B. C. Heterologous expression of full-length lanosterol 14α-Demethylases of prominent fungal pathogens *Candida albicans* and *Candida glabrata* provides tools for antifungal discovery. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, p. e01131-18, 2018.

KOŁACZKOWSKA, A.; KOŁACZKOWSKI, M. Drug resistance mechanisms and their regulation in non-albicans *Candida* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 6, p. 1438–1450, 2016.

KUHN, D. M.; GEORGE, T.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM. A. M. Antifungal susceptibility of *Candida* Biofilms: Unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1773–1780, 2002.

LEE. M.; WILLIAMS, L. E.; WARNOCK, D. W.; ARTHINGTON-SKAGGS, B. A. Drug resistance genes and trailing growth in *Candida albicans* isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, p. 217–224, 2004.

LEMES, V. R. R.; BARRETTO, H. H. C.; KUSSUM, T. A.; COLACIOPPO, S. Avaliação de resíduos de ditiocarbamatos e etilenotiouréia (ETU) em mamão e sua implicação na saúde pública. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 64 (1), p. 50-57, 2005.

LEVETIN, E.; HORNER, W. E.; SCOTT, J. Taxonomy of allergenic fungi. **Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 4, n. 3, p. 375–385.e1, 2016.

LUNA-TAPIA, A.; BUTTS, A.; PALMER, G. E. Loss of C-5 Sterol desaturase activity in *Candida albicans*: Azole resistance or merely trailing growth?. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 1, p. e01337-18, 2019.

MACIEL, N. O.; JONANN, S.; BRANDÃO, L. R.; KUCHARÍKOVA, S.; MORAIS, C. G. M.; OLIVEIRA, A. P.; FREITAS, G. J. C.; BORELLI, B. M.; PELLIZZARI. F.; SANTO, D. A.; DIJCK, P. V.; ROSA, C. A. Occurrence, antifungal susceptibility, and virulence factors of opportunistic yeasts isolated from Brazilian beaches. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, p. 1–16, 2019.

MALAYERI, F. A.; REZAEI, A. A.; RAIESI, O. Antifungal agents: Polyene, azole, antimetabolite, other and future agents. **Journal of Basic Research in Medical Science**, v. 5(2), p. 48-55. 2018.

MASÍNOVÁ, T.; BAHNMANN, B. D.; VETROVSKÝ, T.; TOMSOVSKÝ, M.; MERUNKOVÁ, K.; BALDRIAN, P. Drivers of yeast community composition in the litter and soil of a temperate forest. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 2, 2017.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia,** v. 32, n. 5, p. 449–60, 2006.

MATIAS, A. C.; MANIERI, T. M.; CIPRIANO, S. S.; CARIONI, V. M. O.; NOMURA, C. S.; MACHADO, C. M. L.; CERCHIARO, G. Diethyldithiocarbamate induces apoptosis in neuroblastoma cells by raising the intracellular copper level, triggering cytochrome c release and caspase activation. **Toxicology in Vitro**, v. 27, p. 349–357, 2013.

MESA-ARANGO, A. C.; SCORZONI, L.; ZARAGOZA, O. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. AUG, p. 1–10, 2012.

MILANEZI, A. C. M.; WITUSK, J. P. D.; VAN DER SAND, S. T. Antifungal susceptibility of yeasts isolated from anthropogenic watershed. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 91, n. 1, p. e20170369, 2019.

MÜLLER, G. G.; KARA-JOSÉ, N.; CASTRO, R. S. DE. Antifúngicos em infecções oculares: Drogas e vias de administração. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v.72, n. 2, p. 132–141, 2013.

MÜLLER, F. M. C.; STAUDIGEL, A.; SALVENMOSER, S.; TREDUP, A.; MILTENBERGER, R.; HERRMANN, J. V. Cross-resistance to medical and agricultural azole drugs in yeasts from the oropharynx of human immunodeficiency virus patients and from environmental bavarian vine grapes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 8, p. 3014–3016, 2007.

MUÑOZ-LEOZ, E. T.; RUIZ-ROMERA, E.; ANTIGÜEDAD, I.; GARBISU, C. Tebuconazole application decreases soil microbial biomass and activity. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 10, p. 2176–2183, 2011.

NOBILE, C. L.; JOHNSON A. D. *Candida albicans* biofilm and human disease. **Annual review of microbiology**, v. 69, p. 71–92, 2015.

PANIZZON, J. P.; JÚNIOR, H. L. P.; KNAAK, N.; RAMOS, R. C.; ZIEGLER, D. R.; FIUZA, L. M. Microbial diversity: Relevance and relationship between environmental conservation and human health. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.58, n.1, p. 137-145, 2015.

PANNEERSELVAM, A.; ARUMUGAM, G. Isolation and identification of fungal strains from Lake soil in and Around Ranipet area, Vellore District. **International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives**, v. 3, n. 6, p.1424-1426, 2012.

PARREIRA, D. F.; NEVES, W. DOS, S.; ZAMBOLIM, L. Resistência de fungos a fungicidas inibidores de quinona. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 3, n. 2, p. 1–11, 2010.

PFALLER, M. A.; CASTANHEIRA, M.; MESSER, S. A.; RHOMBERG, P. R.; JONES, R. N. Comparison of EUCAST and CLSI Broth Microdilution Methods for the Susceptibility Testing of 10 Systemically active antifungal agents when tested against *Candida* spp. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 79, p. 198–204, 2014.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute Broth Microdilution Methods, 2010 to 2012. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 9, p. 2846–2856, 2012.

PINOTTI, M. M. Z.; SANTOS, J. C. P.; KLAUBERG-FILHO, O.; MICHELLUTI, D. J.; CASTRO, D. R. L. Isolamento de fungos de solo associados a culturas de amora, framboesa e mirtilo no Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 6, n. 1, p. 67–80, 2011.

PIZZUTTI, I. R.; KOK, A.; SILVA, R. C.; ROHERS, G. N. Comparison between three chromatographic (GC-ECD, GC-PFPD and GC-ITD-MS) methods and a UV-Vis spectrophotometric method for the determination of dithiocarbamates in lettuce. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 5, p.775-781, 2017.

POUND, M. W.; TOWNSEND, M. L.; DIMONDI, V.; WILSON, D.; DREW, R. H. Overview of treatment options for invasive fungal infections. **Medical Mycology**, v. 49, p. 561–580. 2011.

PULCRANO, G.; PANELLIS, D.; DOMENICO, G.; ROSSANO, F.; CATANIA, R. Ambroxol influences voriconazole resistance of *Candida parapsilosis* biofilm. **FEMS Yeast Research**, v. 12, p. 430–438, 2012.

RECH, M.; PANSERA, M. R.; SARTORI, V. C.; RIBEIRO, R. T. S. Microbiota do solo em vinhedos agroecológico e convencional e sob vegetação nativa em Caxias do Sul, RS. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 8, n. 3, p. 141–151, 2013.

RIBAS. A. D.; SPOLTI, P.; PONTEB, E. M. D.; DONATO, K. Z.; SCHREKKER, H.; FUENTEFRIA, A. M. Is the emergence of fungal resistance to medical triazoles related to their use in the agroecosystems? A mini review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 793–799, 2016.

RIVERA-BECERRIL, F.; TUINEN, D. V.; CHATAGNIER, O.; ROUARD, N.; BÉGUET, J.; KUSZALA, C.; SOULAS, G.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; MARTIN-LAURENT, F. Impact of a pesticide cocktail (fenhexamid, folpel, deltamethrin) on the abundance of Glomeromycota in two agricultural soils. **Science of the Total Environment**, v. 577, p. 84–93, 2017.

ROCHA, M. F. G.; ALENCAR, L. P.; PAIVA, M. A. N.; MELO, L. M.; BANDEIRA, S. P.; PONTE, Y. B.; SALES, J. A.; GUEDES, G. M. M.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; BANDEIRA, T. J. P. G.; CORDEIRO, R. A.; PEREIRA-NETO, W. A.; BRANDINE, G. S.; MOREIRA, J. L. B.; SIDRIM, J. J. C.; BRILHANTE, R. S. N. Cross-resistance to fluconazole induced by exposure to the agricultural azole tetraconazole: An environmental resistance school?. **Mycoses**, v. 59, n. 5, p. 281–290, 2016.

ROCCA, L.; CECCA, J.; L'EPISCOPO, N.; FABRIZI, G. Ambient mass spectrometry: Direct analysis of dimethoate,tebuconazole, and trifloxystrobin on olive and vine leaves by desorption electrospray ionization interface. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 52, p.709–719, 2017

ROSCETTO, E.; CONTURSI, P.; VOLLARO, A.; FUSCO, S.; NOTOMISTA, E.; CATANIA, M. R. Antifungal and anti-biofilm activity of the first cryptic antimicrobial peptide from an archaeal protein against *Candida* spp. clinical isolates. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

SAGATOVA, A. A.; KENIYA, M. V.; WILSON, R. K.; MONK, B. C.;TYNDALL, J. D. A. Structural insights into binding of the antifungal drug fluconazole to *Saccharomyces cerevisiae* lanosterol 14α-demethylase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 4982–4989, 2015.

SAHA, A.; PIPARIYA, A.; BHADURI, D. Enzymatic activities and microbial biomass in peanut field soil as affected by the foliar application of tebuconazole. **Environmental Earth Sciences**, v. 75, n. 7, p. 1–13, 2016.

SANDHU, S. S.; SHUKLA, H.; AHARWAL, R. P.; KUMAR, S.; SHUKLA, S. Antifungal azole derivatives and their pharmacological potential: Prospects & retrospects. **The Natural Products Journal**, v. 4, n. 2, p. 140–152, 2014.

SANTOS, A. L.; GALDINO, A. C. M.; MELLO, T. P.; RAMOS, L. S.; BRANQUINHA, M. B.; BOLOGNESE, A. M.; NETO, J. C.; ROUDBARY, M. What are the advantages of living in a community? A microbial biofilm perspective. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.113(9), p. 180-212, 2018.

SCEMLA, A.; CHARLIER, C.; NOEL, L. H.; AMAZZOUGH, K.; VON ROSEN, F. T.; LESAVRE, P.; LORTHOLARY. Pauci-immune crescentic glomerulonephritis without

ANCA in a patient presenting with *Candida parapsilosis* endocarditis. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 46, n. 3, p. 163–165, 2016.

SCHULZ, S.; BRANKATSCHK, R.; DUMIG, A.; KOGEL-KNABNER, I.; SCHLOTER, M.; ZEYER, J. The role of microorganisms at different stages of ecosystem development for soil formation. **Biogeosciences**, v. 10, n. 6, p. 3983–3996, 2013.

SCHOLZE, J. G. Produção de defensivos agrícolas: Melhoras na síntese e fabricação de tebuconazol na Milênia Agrociência S.A. **Dissertação** (Pós-graduação em Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

SHAPIRO, R. S.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 2, p. 213-267, 2011.

SILVA-ROCHA, W. P.; LEMOS, V. L. B.; SVIDIZISNKI, T. I. E.; MILAN, E. P.; CHAVES, G. M. *Candida* species distribution, genotyping and virulence factors of *Candida albicans* isolated from the oral cavity of kidney transplant recipients of two geographic regions of Brazil. **BMC Oral Health**, v. 14, n. 1, p. 1–9, 2014.

SILVA, A. P.; MIRANDA, I. M.; LISBOA, C.; PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A. G. Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis, C. orthopsilosis,* and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 8, p. 2392–2397, 2009.

SINGH, R.; KUMARI, A.; KAUR, K.; SETHI, P.; CHAKRABARTI, A. Relevance of antifungal penetration in biofilm-associated resistance of *Candida albicans* and non-albicans *Candida* species. **Journal of Medical Microbiology**,v. 67, p. 922–926, 2018.

SINGH, B. K.; WALKER, A. Microbial degradation of organophosphorus compounds. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 3, p. 428–471, 2006.

SOARES, D. F.; FARIA, A. M.; ROSA, A, H. Análise de risco de contaminação de águas subterrâneas por resíduos de agrotóxicos no município de Campo Novo do Parecis (MT), Brasil. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 22, n. 2, p. 277-284, 2016.

SOARES, J. S.; MARTIN, M. R. C. Toxicidade materna e fetotoxicidade de ratas *wistar* tratadas com tebuconazol, durante o período organogênico. **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 16, p.7-19, 2015.

SOCORRO, J.; DURAND, A.; TEMIME-ROUSSEL, B.; GLIGOROVSKI, S.; WORTHAM, H.; QUIVET, E. The persistence of pesticides in atmospheric particulate phase: An emerging air quality issue. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–7, 2016.

SUŁOWICZ, S.; CYCOŃ, M.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Non-target impact of fungicide tetraconazole on microbial communities in soils with different agricultural management. **Ecotoxicology**, v. 25, p. 1047–1060, 2016.

STEFFEN, G. P. K.; STEFFEN, R. B.; ANTONIOLLI, Z. I. Contaminação do solo e da água pelo uso de agrotóxicos. **Tecno-Lógica**, v. 15, n. 1, p. 15-21, 2011.

TAVANTI, A.; DAVIDSON, A. D.; GOW, N. A. R.; MAIDEN, M. C. J.; ODDS, F. C. *Candida parapsilosis* Groups II and III. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 284–292, 2005.

TOYOFUKU, M.; INABA, T.; KIYOKAWA, T.; OBANA, N.; YAWATA, Y.; NOMURA, N. Environmental factors that shape biofilm formation. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 80, n. 1, p. 7–12, 2016.

TROFA, D.; GÁCSER, A.; NOSANCHUK, J. D. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 4, p. 606–625, 2008.

VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, D.; PERUSQUÍA-ORTIZ, A. M.; HUNDEIKER, M.; BONIFAZ, A. Opportunistic yeast infections: Candidiasis, cryptococcosis, trichosporonosi*s* and geotrichosis. **JDDG - Journal of the German Society of Dermatology**, v. 11, n. 5, p. 381–395, 2013.

VAZQUEZ, J. A. Optimal management of oropharyngeal and esophageal candidiasis in patients living with HIV infection. **HIV/AIDS - Research and Palliative Care**, v. 2, p. 89–101, 2010.

VELMOUROUGANE, K.; PRASANNA, R.; SAXENA, A. K. Agriculturally important microbial biofilms: Present status and future prospects. **Journal of Basic Microbiology**, v. 57, n. 7, p. 548–573, 2017.

WACHOWSKA, U.; IRZYKOWSKI, W.; JĘDRYCZKA, M. Agrochemicals: Effect on genetic resistance in yeasts colonizing winter wheat kernels. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 162, n. March, p. 77–84, 2018.

WALIA, A.; MEHTA, P.; GULERIA, S.; CHAUHAN, A.; SHIRKOT, C. K. Impact of fungicide mancozeb at different application rates on soil microbial populations, soil biological processes, and enzyme activities in soil. **Scientific World Journal**, 2014.

WILLIAMS, D.; LEWIS, M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. **Journal of Oral Microbiology**, v. 3, n. 2011, p. 1–11, 2011.

WOJCIK, A.; KURNATOWSKI, P.; BLASZKOWSKA, J. Potentially pathogenic yeasts from soil of children's recreational areas in the city of Łódź (Poland). **International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health***,* v. 26, n. 3 p. 477–487, 2013.

XIAO, Z.; WANG, Q.; ZHU, F.; NA, Y. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility and mortality risk factors of candidemia among critically ill patients: A retrospective study from 2011 to 2017 in a teaching hospital in China. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 8, n. 1, p. 1–7, 2019.

YANG, Y. L.; LIN, C. C.; CHANG, T. P.; LAUDERDALE, T. L.; CHEN, H. T.; LEE, C. F.; HSIEH, C. H.; CHEN, P. C.; LO, H. J. Comparison of Human and Soil *Candida tropicalis* isolates with reduced susceptibility to fluconazole. **PLoS ONE**, v.7, n. 4, p.e34609, 2012.
YOUSAF, S.; KHAN, S.; ASLAM, M. T. Effect of pesticides on the soil microbial activity. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 45, n. 4, p. 1063–1067, 2013.

YURKOV, A. M. Yeasts of the soil - Obscure but precious. **Yeast**, v. 35, n. 5, p. 369–378, 2018.

YURKOV, A. M.; THORSTEN, W.; FEDERICI, J.; SCHÄFER, A. M.; EBINGHAUS, M.; LOTZE-ENGELHARD, S.; MITTELBACH, M.; PRIOR, R.; RICHTER, C.; RÖHL, O.; BEGEROW, D. Yeast diversity and species recovery rates from beech forest soils. **Mycological Progress**, v. 15, n. 8, p. 845–859, 2016.

YURKOV, A. M.; KEMLER, M.; BEGEROW, D. Assessment of yeast diversity in soils under different management regimes. **Fungal Ecology**, v. 5, n. 1, p. 24–35, 2012.

ZHANG, W., XU, J.; DONG, F.; LIU, X.; ZHANG, Y.; WU, X.; ZHENG,Y. Effect of tetraconazole application on the soil microbial community. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 13, p. 8323–8332, 2014.

ZHOU, Y.; XU, J.; ZHU, Y.; DUAN, Y.; ZHOU, M. Mechanism of action of the benzimidazole fungicide on *Fusarium graminearum*: Interfering with polymerization of monomeric tubulin but not polymerized microtubule. **Phytopathology**, v. 106, n. 8, 2016.

ZUZA-ALVES, D. L.; SILVA-ROCHA, W. P.; CHAVES, G. M. An update on *Candida tropicalis* based on basic and clinical approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. OCT, p. 1–25, 2017.