

JULIANA POSSATTO TAKAHASHI

Caracterização molecular e perfil de suscetibilidade de *Cryptococcus* e outras leveduras melanizadas de ambiente contaminado com fungicidas azólicos

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientadora: Profa.Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem

SAO PAULO

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Takahashi, Juliana Possatto.

Caracterização molecular e perfil de suscetibilidade de *Cryptococcus* e outras leveduras melanizadas de ambiente contaminado com fungicidas azólicos / Juliana Possatto Takahashi. – 2016.

Tese (Doutorado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2016.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.
Orientação: Profa. Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem.

1. *Cryptococcus*. 2. Triazóis. 3. Levedura Negra. 4. Resistência Cruzada. 5. Agrotóxico. 6. Fungicida.

SES/CCD/CD-320/2015

“Ao meu pai que mesmo longe, sei que olha por mim.”

“Eu realmente acredito que sou afortunada. Sou afortunada porque pude dedicar a minha vida ao estudo do mundo. Assim, nunca me senti insignificante. Esta vida é um enigma sim, e muitas vezes é uma provação, mas se a pessoa é capaz de achar nela alguns fatos – e é sempre bom achá-los – pois o conhecimento é o bem mais precioso de todos.”

(A assinatura de todas as coisas – Elisabeth Gilbert)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de poder trilhar o caminho da pesquisa e me guiar por todos esses anos na busca pela minha realização profissional.

A minha família (mãe, avó, tia, irmãs e cunhados) por sempre me apoiar em todos os momentos da minha vida.

Ao meu marido Carlos, por me apoiar incondicionalmente em todas as decisões que tomei no decorrer da minha tese.

A minha orientadora Marcia S.C.Melhem por ter me acolhido, me ensinado e ter uma luz maravilhosa, me motivando sempre seguir em frente.

Ao núcleo de Micologia (Walderez, Marilena, Dulce, Sandra, Miriam, Lindete, Andrez) pela troca de experiência, pelos conselhos e pela amizade estabelecida ao longo desses anos.

A Leticia Marielle Feliciano pelo suporte dado nas coletas e no isolamento de algumas cepas, além de ter realizado a heterorresistência. Muito obrigada!

Aos alunos e amigos da Micologia (Lidiane, Thiago, Daise, Dayane, Sonia, Lucas, Gisele) que trocaram idéias, ajudaram e apoiaram nos momentos difíceis dessa jornada.

Aos funcionários do Instituto Adolfo Lutz – Rio Claro, por me ajudarem direta e indiretamente na execução desse trabalho e por sempre me receberem tão bem.

A Dra. Derlene Attili de Angelis pelo auxílio com a parte de molecular do trabalho.

A Dra. Nadia Rodrigues e a Ana Paula Ferreira Souza, ambas da Divisão de Química Analítica da UNICAMP, pelo apoio fundamental na parte de cromatografia gasosa e HPLC.

Ao Grupo Fleury (Dr. Jorge de Melo Sampaio, Danielle Ferreira Zamarrenho, Elsa Toshie Sakagami e Joana de Souza Barrel), pelo auxílio e suporte na parte de MALDI-TOF e sequenciamento.

À família Botacin pela gentileza e acolhimento no consentimento na coleta de solo e água na horta.

À Secretaria de Agricultura do Município de Rio Claro pelo consentimento na

coleta de solo e água da horta orgânica.

A Syngenta Proteção de Cultivos pela doação dos fungicidas ciproconazol e difenoconazol para realização do estudo.

A Juliana Mariotti Guerra pela ajuda na parte estatística do trabalho.

Ao núcleo de Patologia Quantitativa pela compreensão na finalização da tese.

À Fapesp pela bolsa concedida (processo: 2013/07221-2).

RESUMO

Cepas fúngicas ambientais estão sujeitas, continuamente, à grande diversidade de ações antrópicas, como a exposição a fungicidas, o que poderia induzir à resistência adquirida a fármacos antifúngicos com estrutura química e mecanismo de ação semelhante. A resistência adquirida a fármacos azólicos (fluconazol, itraconazol, voriconazol, etc.) tem importante implicação clínica. O objetivo deste estudo foi isolar e caracterizar leveduras melanizadas de origem ambiental, do gênero *Cryptococcus* e do grupo *Black Yeast Fungi* (BYF), e determinar seu perfil de sensibilidade a fármacos e fungicidas azólicos. As cepas foram isoladas (solo e água) de 2 hortas, representando ambientes contaminado e não contaminado com fungicidas azólicos. As cepas foram analisadas por características morfológicas, bioquímicas, análise por *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight* (MALDI-TOF) e sequenciamento da *Internal Transcription Sequency* (ITS), regiões D1-D2. A sensibilidade foi determinada pelo método de referência (CLSI). De ambas as hortas foram isoladas leveduras melanizadas, totalizando 16 cepas de *Cryptococcus* englobando 6 espécies (incluindo *C. neoformans*) e 9 cepas de BYF, incluindo *Exophiala*, *Cladosporium*, *Cladophialophora* e *Aureobasidium*. A concentração inibitória mínima (CIM) de fluconazol foi alta para *C. neoformans*; de outro modo, para a maioria das cepas de outras espécies a sensibilidade foi alta para todos os triazóis, com exceção de *C. terrestris*. Correlação positiva entre CIMs dos fungicidas e, de maior interesse entre CIM de ciproconazol e CIM voriconazol, foi verificada, indicando possível resistência exposicional ambiental adquirida. Dentre cepas de BYF, *Cladophialophora arxii* (obtida de horta com fungicida) foi pouco sensível, com CIMs altas de fungicidas azólicos e, também, de todos os fármacos. Os maiores valores de CIM (>8mg/L) de fluconazol foram encontrados frente a 4 cepas, sendo 3 delas (*C. neoformans*, *C. terrestris*, *C. flavescens*) expostas a fungicidas. Conclui-se que diversas espécies com potencial de resistência ocorrem em amostras ambientais sob uso de fungicida e, futuros estudos com maior número de cepas poderá confirmar resistência adquirida ao fármaco, após uso de fungicidas. Além disso, verificou-se que a exposição ambiental a ciproconazol em cepas de *Cryptococcus* predispos a menor sensibilidade *in vitro* ao voriconazol, fato que pode ter relevância clínica.

Palavras-chave: agrotóxicos, *Cryptococcus*, fungicida, levedura negra, triazóis, resistência cruzada.

ABSTRACT

Environmental fungal strains are subject continuously to the wide range of human activities, such as exposure to fungicide, which could lead to acquired resistance to antifungal drugs with similar chemical structure and mechanism of action. The acquired resistance to azole drugs (fluconazole, itraconazole, voriconazole, etc.) has important clinical implications. The aim of this study was to isolate and characterize melanized yeast environmental origin, genus *Cryptococcus* and Black Yeast Fungi group (BYF), and determine its susceptibility profile to drugs and azole fungicides. The strains were isolated (soil and water) 2 gardens, representing environment contaminated and uncontaminated with azole fungicides. The strains were analyzed by morphological, biochemical, Matrix Assisted Laser analysis Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) and sequencing of Internal Transcription Sequence (ITS), D1-D2 regions. The sensibility was determined by the reference method (CLSI). Both gardens were isolated melanized yeast, a total of 16 strains of *Cryptococcus* covering 6 species (including *C. neoformans*) and 9 strains of BYF, including *Exophiala*, *Cladosporium*, *Cladophialophora* and *Aureobasidium*. The minimum inhibitory concentration (MIC) of fluconazole was high for *C. neoformans*; otherwise, for most strains of other species the susceptibility was high for all triazoles, except for *C. terrestris*. Positive correlation between MICs of fungicides and, of most interest among MICs of cyproconazole and voriconazole was verified, indicating possible environmental expositional acquired resistance. Among strains of BYF, *Cladophialophora arxii* (fungicide exposed plantation) was poorly susceptible with high MICs of azole fungicides and also MIC of remain tested drugs. The higher MIC values (> 8mg/L) of fluconazole were found for 4 strains, being 3 of them (*C. neoformans*, *C. terrestris*, *C. flavescens*) exposed to fungicides. We concluded that several species with potential for drug-resistance occur in environmental samples under use of fungicide and future studies with larger numbers of strains can confirm the drug acquired resistance after use of fungicides. Furthermore, it was found that environmental exposure to the cyproconazol predisposed to *in vitro* low susceptibility to voriconazole, in *Cryptococcus* strains, which could have clinical relevance.

Key words: pesticides, *Cryptococcus*, fungicide, black yeast, triazoles, cross-resistance.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ASE	Extração Acelerada de Solvente
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	<i>Binding Cassete Transporter</i>
BYF	<i>Black Yeast Fungi</i> – Leveduras Negras
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
°C	Graus Celsius
DHN	1,8-Dihidroxi-naftaleno
DRBCm	Dicloran Rosa Bengala modificado
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GPS	Sistema de posicionamento global
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
LC-MS	<i>Liquid Chromatography – Mass spectrometry</i>
L-DOPA	L-3,4-Dihidroxi-difenilalanina
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ITS	<i>Internal Transcribed Spacers</i> - Espaços Internos Transcritos
MALDI-TOF	<i>Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight</i> – Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz - Tempo de voo
mL	Mililitro
MOPS	ácido 3-(N-morfolino propano sulfônico)
MSF	<i>Major Superfamily Facilitator</i>
p.a.	Pro análise
PCR	Reação em cadeia da Polimerase

pH	Potencial Hidrogeniônico
RAPD	<i>Random Amplified Polimorfism DNA</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Lenght Polymorfism</i>
rpm	Rotações por minuto
rRNA	<i>Ribossomal Ribonucleic Acid</i>
µg	Micrograma

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do ciclo de infecção ambiental e clínico do gênero <i>Cryptococcus</i> .	21
Figura 2. Esquema para preparação da placa metálica para identificação de bactérias e leveduras na técnica de MALDI-TOF.	29
Figura 3. Esquema geral de funcionamento do aparelho MALDI-TOF para análise de isolados ambientais e de amostras biológicas.	29
Figura 4. Ilustração sobre os mecanismos de ação de compostos azólicos, como: bloqueio na produção de ergosterol pelo <i>Erg11</i> e acúmulo de esteróis tóxicos produzidos pelo gene <i>Erg3</i> .	31
Figura 5. Ilustração das estruturas químicas de dois antifúngicos triazólicos.	32
Figura 6. Ilustração das estruturas químicas de três compostos da nova geração de antifúngicos triazólicos.	33
Figura 7. Ilustração da estrutura química de dois fungicidas agrícolas triazólicos usados no Brasil.	36
Figura 8. Ilustração das moléculas dos fungicidas de uso comercial do grupo dos triazóis.	38
Figura 9. Esquema de coleta ambiental realizada no município de Rio Claro, SP.	44
Figura 10. Plantação de cebolinha cultivada na horta A.	44
Figura 11. Água de lavagem das verduras (à esquerda) e água de irrigação da horta A.	45
Figura 12. Plantação de cebolinha cultivada na horta B.	45
Figura 13. Água de irrigação da horta B.	46
Figura 14. Solo coletado em saco plástico estéril (à esquerda) e processamento do solo (repouso) na metodologia de STAIB (à direita).	47
Figura 15. Crescimento de colônias de fungos do solo em ágar DRBCm (à esquerda) e ágar Mycosel (à direita).	48

Figura 16. Fluxograma da técnica de isolamento para água de irrigação e lavagem das hortas A e B.	50
Figura 17. Observação macroscópica de diversos tipos de crescimento de <i>Cryptococcus</i> spp. em ágar cromogênico.	52
Figura 18. Distribuição de espécies de leveduras negras, na horta A.	67
Figura 19. Distribuição de espécies de leveduras negras, na horta B.	68
Figura 20. Distribuição das espécies de leveduras negras, isoladas do solo.	69
Figura 21. Distribuição das espécies de leveduras negras, isoladas de água de irrigação.	69
Figura 22. Distribuição das espécies de leveduras negras, isoladas de água de lavagem.	69
Figura 23. Distribuição das espécies de <i>Cryptococcus</i> spp., na horta A.	75
Figura 24. Distribuição das espécies de <i>Cryptococcus</i> spp., em relação a horta B.	75
Figura 25. Distribuição das espécies de <i>Cryptococcus</i> spp. isolados do solo.	77
Figura 26. Distribuição das espécies de <i>Cryptococcus</i> spp. isolados da água de lavagem.	77
Figura 27. Distribuição das espécies de <i>Cryptococcus</i> spp. isolados da água de irrigação.	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Modo de ação dos fungicidas utilizados na agricultura.	21
Tabela 2. Demonstração da utilização dos compostos para o preparo do solo na época de plantio.	43
Tabela 3. Isolamento de leveduras negras, segundo tipo de amostra ambiental	66
Tabela 4. Isolados de leveduras negras, segundo tipo de horta coletada (município de Rio Claro, 2012-2014)	67
Tabela 5. Identificação, segundo método empregado, de 9 cepas de <i>Black Yeast Fungi</i> , isoladas de amostras água e solo (Hortas Município de Rio Claro, 2012-2014)	68
Tabela 6. Concentração Inibitória Mínima (mg/L) de antifúngicos de uso clínico e fungicidas azólicos frente a cepas de leveduras negras isoladas de amostras de água e solo (Hortas, Município de Rio Claro, 2012-2014)	70
Tabela 7. Isolados do gênero <i>Cryptococcus</i> , segundo tipo de amostra ambiental (hortas, município de Rio Claro, 2012-2014)	72
Tabela 8. Isolados de <i>Cryptococcus</i> , segundo o tipo de horta (Rio Claro, 2012-2014)	74
Tabela 9. Resultados de identificação, segundo método empregado, de 16 cepas de <i>Cryptococcus</i> spp. isoladas de amostras água e solo (Hortas, Município de Rio Claro, 2012-2014)	76
Tabela 10. Score do MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Ge) na identificação dos isolados de <i>Cryptococcus</i> spp	78
Tabela 11. Concentração inibitória mínima (mg/L) de fungicidas azólicos frente à cepa-padrão <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019, método M27-A3 (CLSI, 2012)	80
Tabela 12. Concentração Inibitória Mínima (mg/L) de fungicidas azólicos frente à cepa-padrão <i>Candida krusei</i> ATCC 6258, método de M27-A3 (CLSI, 2012)	80
Tabela 13. Concentração Inibitória Mínima (mg/L) de antifúngicos de uso	81

clínico e fungicidas azólicos frente a cepas de *Cryptococcus* spp. isoladas de amostras de água e solo (Hortas, Município de Rio Claro, 2012- 2014).

Tabela 14. Identificação das amostras enviadas para análise de 84 fungicidas por HPLC e cromatografia gasosa

Tabela 15. Análise das amostras ambientais para ciproconazol (mg kg^{-1}) 85 e difenoconazol (mg/kg^{-1}) em HPLC e cromatografia gasosa

INDICE

1.INTRODUÇÃO	17
1.1 O gênero <i>Cryptococcus</i>	19
1.1.1 Identificação de espécies por métodos moleculares	23
1.1.2 Sensibilidade a compostos antifúngicos	24
1.2 Leveduras negras – <i>Black Yeast Fungi</i>	25
1.3 A utilização do MALDI-TOF (<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Flight Mass Spectrometry</i>) na identificação microbiológica	27
1.4 Antifúngicos azólicos	30
1.4.1 Antifúngicos azólicos de uso clínico	30
1.4.2. Antifúngicos azólicos e meio ambiente	35
1.5 A utilização da cromatografia na prospecção de fungicidas em amostras ambientais.....	40
2.OBJETIVOS	42
2.1 Objetivo geral	42
2.2 Objetivos específicos	42
3. MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 Amostragem.....	43
3.2 Obtenção de culturas de <i>Cryptococcus</i> spp. e outras leveduras melanizadas.....	46
3.2.1 Coleta e processamento de amostras de solo.....	46
3.2.2 Coleta e processamento de amostras de água	48
3.3 Caracterização fenotípica de leveduras melanizadas	51
3.3.1 Caracterização fenotípica de <i>Cryptococcus</i> spp.....	51
3.3.2 Caracterização fenotípica de outras leveduras melanizadas	52
3.3.3 Análise dos isolados por MALDI-TOF (<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Flight Mass Spectrometry</i>).....	53
3.4 Análise de DNA	53
3.4.1 Extração do DNA genômico para seqüenciamento e RFLP (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)	53

3.4.2 Diferenciação molecular entre isolados de <i>C. neoformans</i> e <i>C.gattii</i>	55
3.4.3 <i>Mating-type</i>	56
3.4.4 Sequenciamento da região ITS, D1 e D2.....	56
3.5 Determinação de sensibilidade a compostos azólicos.....	58
3.5.1 Curva de morte	59
3.5.2 Determinação de heteroresistência ao fluconazol	60
3.6 Análise da presença de fungicidas em amostras de solo e água	61
3.7 Análise estatística	64
4. RESULTADOS	65
5. DISCUSSÃO	86
6. CONCLUSÕES	100
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
ANEXOS	128

1. INTRODUÇÃO

A melanina é um componente ubíquo encontrado em muitos micro-organismos e animais. A melanina está presente na parede de muitos fungos, denominados fungos melanizados, ou demáceos, definidos como sapróbios que habitam vegetais em decomposição e solo (Prenafeta-Boldu et al., 2006; Vicente et al., 2008). Apesar de, apenas, a minoria desses fungos ser patogênica, muitos são invasivos, em particular, espécies de *Cryptococcus* e as do grupo denominado *Black Yeast Fungi* - BYF. BYF que são leveduras negras descritas no final do século 19 capazes de se reproduzir em cultura por brotamentos unicelulares (células *yeast-like*) (Rippon, 1982; Matsumoto et al., 1987; de Hoog, 1993). A melanina fúngica, nestas últimas é derivada, primariamente, de dihidroxifenilalanina (L-DOPA) ou dihidroxinaftaleno (DHN), sendo os fungos negros contemplados apenas com DHN. A melanina das leveduras negras é diferente da estrutura produzida pelo gênero *C. neoformans* que sintetiza 3,4-dihidroxifenilalanina via tirosinase, com a polimerização do dopacromo nas últimas etapas da síntese (Langfelder et al., 2003).

A melanização e outras características particulares do gênero de *Cryptococcus* spp., como cápsula, crescimento a 37°C e produção de urease e lacases, são importantes para identificação laboratorial das espécies de *Cryptococcus*. Quando cultivados em meio contendo substratos, como: polifenóis e fenóis, cepas de *Cryptococcus* formam melanina. A enzima lacase atua nos substratos fenólicos produzindo quinonas que passam por um processo de autopolimerização e se transformam em melanina. Algumas substâncias presentes em sementes, como as de girassol (*Helianthus annuus*), alpiste (*Phalaris canariensis*) e niger (*Guizotia abyssinica*) (Pedroso et al., 2007; Menezes et al., 2011), permitem a comprovação da produção *in vitro* de melanina, na identificação de *Cryptococcus*.

A melanina tem funções variadas atribuídas à característica de alta estabilidade de sua estrutura química, o que torna sua molécula resistente à grande variedade de processos físicos e químicos

(Bloomfield e Alexander, 1967; Butler e Day, 1998; Hamilton e Gomez, 2002). Tal substância, depositada na parede celular fúngica, tem importante papel na virulência e na patogenicidade, porém, não é essencial no crescimento e desenvolvimento do fungo (Schnitzler et al., 1999; Polak, 1990; Dixon et al., 1991; Dixon et al., 1992;). Esse pigmento é, extremamente, resistente à variedade de agentes físico-químicos incluindo radicais livres, metais tóxicos, dessecação e radiação ionizante. Existem vários mecanismos propostos pelo qual a melanina pode atuar como fator de resistência (Franzen et al., 2008; Butler e Way, 1998; Hamilton e Gomez, 2002; Jacobson, 2000). Em sua composição, a melanina apresenta vários tipos de monômeros fenólicos constituídos de proteínas e carboidratos (Nosanchuk e Casadevall, 2006). O complexo de polímeros melhora a sobrevivência e a competitividade dos fungos em ambientes hostis (Dixon et al., 1991).

Acredita-se que a melanina contribua para capacidade do organismo de iludir o hospedeiro na resposta imune através do bloqueio dos efeitos de enzimas hidrolíticas sobre a parede celular e a eliminação de radicais livres, libertados pelas células fagocitárias do hospedeiro durante o *burst* oxidativo (Nosanchuk e Casadevall, 2006; Revankar e Sutton, 2010). A infecção por fungos melanizados, portanto, é mediada pela ação da melanina, dentre outros fatores.

As infecções por membros do gênero *Cryptococcus*, criptococose, são reconhecidamente, graves e letais, enquanto aquelas produzidas por BYFs, ditas feo-hifomicoses, são responsáveis por ampla gama de quadros clínicos, podendo variar desde micoses superficiais até profundas; a infecção depende, primariamente, de três fatores: a resistência do hospedeiro, a quantidade do inóculo e a virulência do agente etiológico (Alviano et al., 2004; Esterre e Queiroz-Teles, 2006).

O controle desses quadros infecciosos depende, ainda, da resistência antifúngica da cepa infectante. A resistência pode ser definida em: microbiológica e clínica, ou uma junção de ambas. A resistência microbiológica ocorre quando o crescimento de uma cepa é inibido, apenas, em altas

concentrações de determinado antifúngico, em relação às necessárias para inibir cepas selvagens. Por sua vez, a resistência clínica pode ser definida como a manutenção do crescimento no sítio infeccioso, mesmo sob concentrações terapêuticas de determinado antifúngico (Turnidge e Paterson, 2007; Pfaller, 2012).

1.1 O gênero *Cryptococcus*

A maior parte das espécies de *Cryptococcus* é considerada de vida livre e poucas delas apresentam importância em micologia clínica. As duas principais espécies, que causam doença no homem e em animais, são *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*. Acredita-se que os genomas dessas duas espécies divergiram há 34 milhões de anos atrás, produzindo espécies com acentuadas diferenças, tanto patológicas, quanto ecológicas (Sharpton et al., 2008; D'Souza et al., 2011). Os pulmões representam o sítio primário de infecção, mas meningoencefalite é o quadro mais comumente diagnosticado em seres humanos (Lin e Heitman, 2006). *C. neoformans* infecta, principalmente, pacientes imunodeprimidos e está presente em todas as regiões do globo, sendo associada à excretas de aves, principalmente, de pombos (*Columbia livia*). A espécie *C. gattii* pode acometer indivíduos imunocompetentes e, originalmente, era descrita apenas em regiões tropicais e subtropicais, até que, no início desta década foi relacionada como causa de surto em região de clima temperado, na Ilha de Vancouver Canadá (Stephen et al., 2002; Hoang et al., 2004; Kidd et al., 2004; Bicanic e Harrison, 2004; Levitz e Boekhout, 2006).

Na literatura, os relatos de casos associados a outras espécies menos frequentes são variados. São descritas, atualmente, mais de 70 espécies do gênero *Cryptococcus*, em seu estado anamorfo, mas, esse número tende a aumentar progressivamente, dada a contribuição das técnicas de sequenciamento de DNA para entendimento da biodiversidade

fúngica (Fonseca et al., 2010; Kwon-Chung et al., 2010). Bernal-Martinez et al. (2010) sugerem que a espécie *C. albidus* é a segunda mais comum e que rota de entrada é, possivelmente, inalatória. Há relatos de *C. albidus* como agente de peritonite (Ragupathi et al., 2014), encefalite (Liu et al., 2014), fungemia em pacientes leucêmicos ou com linfomas (Gluck et al., 1987; Wells et al., 1998; Cheng et al., 2001; Ramchandren et al., 2004), úlcera escleral (Garelick et al., 2004) e lesões cutâneas (Narayan et al., 2000). Encontram-se, ainda, observações de *C. luteolus* causando tenossinovite (Hunter-Ellul et al., 2014), *C. laurentii* causando fungemia em neonatos, pacientes com câncer (Averbuch et al., 2002; Johnson et al., 1998; Liu et al., 2014), infecções em orofaringe (Bauters et al., 2002), pneumonia com efusão pleural (Shankar et al., 2006) e infecção do SNC (Vlchikova-Lashkoska et al., 2004). De fato, as espécies *C. albidus* e *C. laurentii* são as mais representativas, causando cerca de 80% das infecções não *C. neoformans* e *C. gattii*, em seres humanos (Johnson et al., 1998; Khawcharoenporn et al., 2007). Outras espécies de menor incidência clínica são: *C. unigutulatus*, *C. curvatus*, *C. adeliensis*, *C. humicola*, *C. luteolus*.

O crescente número de pacientes imunossuprimidos, aliado à melhor detecção laboratorial dos agentes etiológicos permitiu aumento gradual da descrição de infecções por essas outras espécies de *Cryptococcus*. Além disso, o amplo uso de antifúngicos na prática clínica é um dos fatores atribuídos, até o momento, ao aparecimento de espécies raras, selecionadas por serem mais resistentes aos fármacos (Khawcharoenporn et al., 2007; Bernal-Martinez et al., 2010).

Membros de *Cryptococcus* apresentam ampla distribuição na natureza, podendo ser isolado de diversas fontes, como: ar, água, solo contaminado com excretas de aves, flores e folhas de diversos vegetais, madeira em decomposição e, ainda, de mucosas e superfícies corpóreas de animais (Casadevall e Perfect, 1998; Kwon-Chung e Bennett, 1992). A infecção por *Cryptococcus* dá-se por meio de inalação de propágulos infectantes a partir de fontes ambientais e o ciclo de transmissão está ilustrado na Figura 1.

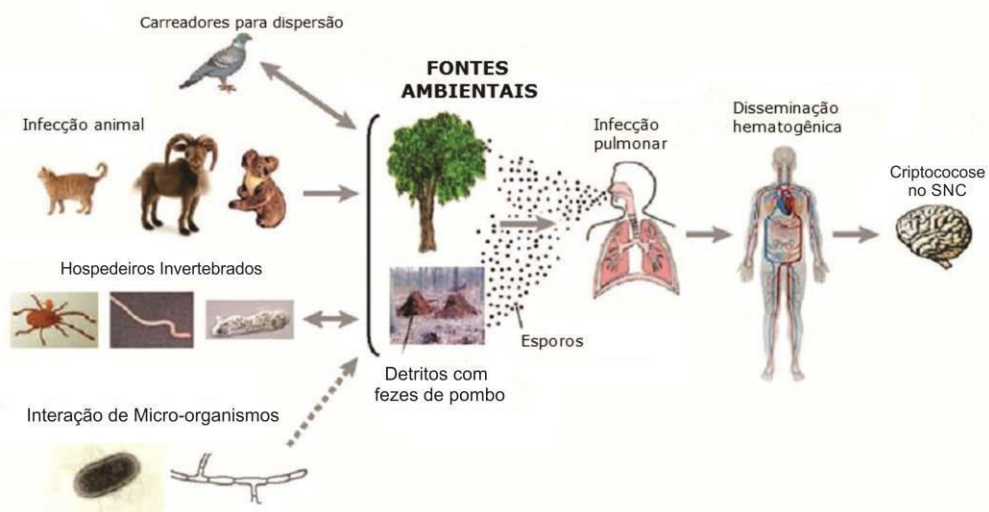


Figura 1. Esquema do ciclo de infecção ambiental e clínico do gênero *Cryptococcus*.

(Fonte: Adaptado de Lin e Heitman, 2012)

A descrição da ecologia de *Cryptococcus* iniciou-se na década 50, com o isolamento de *C. neoformans* em amostras de solo por Emmons (1951). Cinco anos depois, foi isolado *Cryptococcus* de fezes e ninhos de pombos, pelo mesmo pesquisador (Emmons, 1955). Muitos trabalhos foram realizados com material de solo, excretas de aves e outros animais, com ênfase para *C. neoformans*. No Brasil o primeiro relato de isolamento ambiental de *C. neoformans* foi realizado por Silva (1960), a partir de solo no estado da Bahia, seguindo-se importantes estudos que descreveram a presença das 2 principais espécies (*C. neoformans* e *C. gattii*) em amostras ambientais como excretas de pombo, solo, poeira, ar atmosférico, material vegetal em várias partes do país (Melo et al., 1987; Machado et al., 1993; Passoni et al., 1998; Lazera et al., 2000; Montenegro e Paula, 2000; Filiu et al 2002; Raso et al., 2004; Soares et al., 2005; Souza et al., 2005; Abegg et al., 2006; Baroni et al., 2006; Drummond et al., 2007; Lugarini et al., 2008; Ribeiro e Ngamskulrungrroj, 2008; Pedroso et al., 2009; Faria et al., 2010; Andrada-Silva et al., 2013; Teodoro et al., 2013; Yamamura et al.,

2013).

A maior frequência de *C. gattii* em amostras ambientais é observada em amostras de folhas, partes ocas de tronco e madeira em decomposição de diversas árvores nativas de diversas espécies encontradas em regiões de clima tropical e subtropical (Sorrel, 2001; Randhawa et al., 2003). Relatos de ocorrência em vários países da Europa, como Espanha (Morera et al., 2014), da Ásia, como Coreia (Chee e Lee, 2005), Japão (Yamamoto et al., 1995) e China (Li et al., 1993; Ansheng et al., 1993), do Oriente Médio, como Jordânia (Hamasha et al., 2004) e Irã (Khosravi et al., 1997), da África, como Tunísia (Mseddi et al., 2011) e das Américas, como Estados Unidos (Littman e Schneirson, 1959), Panamá (Rivas et al., 1999), Colômbia (Granados e Castaneda, 2005), Porto Rico (Loperena-Alvarez et al., 2010), México (Castanón-Olivares e López-Martínez, 1993; López-Martínez e Castanón-Olivares, 1995).

Um dos mais importantes estudos foi realizado por Kidd et al. (2007) no oeste do Canadá (Vancouver) e noroeste dos Estados Unidos, onde foram coletadas amostras de resíduos vegetais de árvores, folhas, solo e água para demonstração da presença *C. gattii*, associado ao surto já mencionado. Em particular, alguns estudos foram fundamentais para demonstrar *C. gattii*, além de *C. neoformans* em amostras de cascas e folhas de árvores, no Brasil (Lazera et al., 1993; Lazera et al., 1998; Fortes et al., 2001; Horta et al., 2005; Kobayashi et al., 2005; Baltazar e Ribeiro, 2008; Costa et al., 2010; Castro e Silva, 2015), México (Licea et al., 1999), Colômbia (Callejas et al., 1998; Escadon et al., 2005), Argentina (Davel et al., 2003; Refojo et al., 2009), Índia (Chakrabarti et al., 1997; Gugnani et al., 2005; Girish Kumar et al., 2010), Egito (Mahmoud, 1999), Estados Unidos (Pfeiffer e Ellis, 1991;1992), Portugal (Ferreira et al., 2014), Espanha (Colom et al., 2012) e Austrália (Krockenberger et al., 2002; Vilcins et al., 2002).

Distintos fatores abióticos, como: umidade, pH do solo, luz solar e vento, parecem ter grande importância na distribuição ecológica das espécies (Ruiz et al., 1981; Wang e Casadevall, 1994; Casadevall e

Perfect, 1998; Caicedo et al., 1999; Montenegro e Paula, 2000; Kuroki et al., 2004; Granados e Castaneda, 2005). Kidd et al. (2007) sugeriram que *C. gattii*, bem como outras espécies de fungos colonizam, primariamente, os primeiros 15 centímetros do solo, devido à adequação da temperatura, umidade e componentes nutricionais; nessa camada de solo, a capacidade de melanização protege os membros do gênero *Cryptococcus* ao efeito deletério dos raios solares contendo luz ultravioleta.

1.1.1 Identificação de espécies por métodos moleculares

As diferenças genéticas, entre as espécies *C. neoformans* e *C. gattii* e em suas diferentes cepas, sejam clínicas ou ambientais, podem ser detectadas por métodos de tipagem molecular, como RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorfism*), RAPD (*Random Amplified Polimorfism DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorfism*) e reação em cadeia da polimerase (PCR-*Fingerpriting*). As técnicas baseadas em PCR são boas alternativas para identificação acurada desses agentes, mostrando-se sensíveis, específicas e rápidas e, ainda, sofrendo menos influência de fatores externos do que os métodos tradicionais baseados em aspectos fenotípicos (Meyer et al., 1993). As técnicas moleculares de tipagem permitiram agrupar os isolados de *C. neoformans* e de *C. gattii* em oito tipos moleculares: VN I (sorotipo A), VN II (sorotipo A), VN III (sorotipo AD) e VN IV (sorotipo D) e VG I, VG II, VG III e VG IV (sorotipos B e C).

A distribuição desses tipos moleculares como agentes de criptococose é variada, sendo que VN I e VG II predominam no mundo todo, enquanto em paciente com AIDS, a maioria dos isolados é VN I e VN IV (Meyer et al., 1999; 2003). A virulência da cepa pode depender da característica molecular, sendo descrito um subtipo hiper virulento (VGIIa) responsável pelo surto no oeste do Canadá e Estados Unidos (Kidd et al., 2004). Não há até o momento relação entre tipo molecular e resistência a antifúngicos, sendo desconhecida a influência da característica molecular na ocorrência de fenótipo resistente (Heitman et al., 2010).

1.1.2 Sensibilidade a compostos antifúngicos

A criptococose tem seu gerenciamento farmacológico dependente do estado imunitário do paciente, mas consiste, em regra, em uma terapia primária com anfotericina B, com ou sem 5-fluorocitosina, seguida de terapia de consolidação e manutenção, ou longa terapia supressiva, com fármaco azólico, principalmente, com fluconazol (Saag et al., 2000). Nos casos de criptococose, são observadas altas taxas de resistência clínica, caracterizadas por persistência fúngica e frequência de recaídas; isso desencadeou grande preocupação entre clínicos sobre surgimento de resistência entre cepas de *Cryptococcus* expostas ao tratamento com terapia antifúngica (Berg et al., 1998; Brandt et al., 2001). Testes de sensibilidade a antifúngicos indicam valores de CIM a fármacos azólicos maiores em isolados de *C. gattii*, quando comparados a *C. neoformans* (Espinel-Ingroff et al., 2012; Silva et al., 2012). Fatos que expliquem essa ocorrência ainda são inconclusivos (Heitman et al., 2010).

Na ausência de pontos de corte *breakpoints* clínicos para interpretar os valores de CIM são utilizados pontos de corte epidemiológicos (*epidemiologic cutoffs values*, ECVs) (Espinel-Ingroff et al., 2015). Os ECVs permitem a construção da curva normal de valores de CIM e classificam as cepas em duas categorias: selvagem “*wild type*” ou não selvagem “*non wild type*”, esta com provável mecanismo de resistência. O ECV é baseado em uma análise de dados de múltiplos laboratórios, servindo de indicação das alterações emergentes nos padrões de sensibilidade do micro-organismo frente a determinado fármaco (Espinel- Ingroff et al., 2015). Espinel-Ingroff e colaboradores (2012) realizaram um estudo para estabelecer os pontos de corte epidemiológicos (ECV) para os fármacos azólicos nos genótipos de *C. neoformans* e *C. gattii*, pois até o momento não existem pontos de corte para o gênero. Os ECVs para os fármacos azólicos dependem do tipo molecular das cepas e incluem os seguintes intervalos: fluconazol (8 mg/L a 32 mg/L), itraconazol (0,25 mg/L a 1 mg/L), posaconazol (0,25 mg/L a 0,5 mg/L) e para

voriconazol (0,12 mg/L a 0,25 mg/L).

1.2 Leveduras negras – *Black Yeast Fungi*

Esse grupo de leveduras pertence a um número limitado de espécies, filogeneticamente enquadradas em Ascomycete e ordem *Chaetothyriales*, que mostram adaptações variadas a condições ambientais extremas (de Hoog e McGinnis, 1987; Ruibal et al., 2009). Na ordem *Chaetothyriales* todos os representantes são produtores de melanina. Esses fungos são comuns no meio ambiente e, geralmente, são encontrados como contaminantes de laboratório, sendo apenas 10% deles de relevância clínica (Pritchard e Muir, 1987; Ben-Ami et al., 2009). Muitos agentes são encontrados em ambientes domésticos como sapróbios colonizando superfícies inertes ou habitando locais poluídos com metais pesados ou hidrocarbonetos (de Hoog, 1993). A maior parte das espécies de leveduras negras é causadora de micoses superficiais por inoculação traumática, mas a rota de infecção nos casos sistêmicos e disseminados, ainda, permanece um mistério (Revankar e Sutton, 2010; Seyedmousavi et al., 2014).

As espécies clínicas mais relevantes da ordem *Chaetothyriales* estão localizadas na família *Herpotrichiellaceae*, em gêneros como *Cladophialophora*, *Coniosporium*, *Fonsecaea*, *Phialophora*, *Rhinocladiella*, *Cyphellophora* e *Exophiala* (Revankar e Sutton, 2010; Seyedmousavi et al., 2013). O gênero *Exophiala* é um dos mais representativos dentro das leveduras negras e tem sido relacionado à ampla variedade de infecções humanas invasivas em distintos países (de Hoog, 1999). As infecções originadas por leveduras negras do gênero *Exophiala* podem classificar-se em três categorias: feohifomicose, cromoblastomicose e micetoma eumicótico, sendo esta última está relacionada à espécie *E. jeanselmei* (Fader e McGinnis, 1988). Estas infecções ocorrem, especialmente, em pacientes transplantados ou imunocomprometidos por uso de corticoides, ou naqueles com AIDS ou outras doenças imunossupressoras, como diabetes; porém, esse agente causal é descrito, também, em indivíduos imunocompetentes com feo-hifomicoses (Sudduth et al., 1992; McCown e Sahn, 1997; Sartoris et al., 1999).

No tratamento das infecções por BYFs, os azóis são os agentes de primeira escolha devido à sua excelente atividade *in vitro*, segurança no uso em longo prazo, além da experiência clínica. O itraconazol é a droga mais estudada com descrições de sucesso medicamentoso, com taxa de cura de até 60% (Sharkey et al. 1990). O Comitê Europeu da Sociedade Européia de Microbiologia Clínica e de Doenças Infecciosas e a Confederação Européia de Micologia Médica para Diagnóstico e Manejo de feo-hifomicoses sugerem que o itraconazol oral seja o fármaco de escolha nas mais variadas formas clínicas (Chowdhary et al., 2014). No entanto, voriconazol é o antifúngico de preferência devido à boa tolerabilidade, segurança, e recomendação para infecções no sistema nervoso central, devido à sua farmacocinética em líquido cefalorraquidiano e tecidos cerebrais, diferentemente, do itraconazol (Chowdhary et al., 2014). O tratamento para infecções por espécies de *Exophiala* é, ainda, controverso sendo indicado uso de itraconazol ou combinação de fármacos (de Hoog, 1999). Os dados escassos sobre testes de sensibilidade *in vitro* existentes na literatura demonstram que a eficácia do fármaco depende da espécie causal e, portanto, resultados de tais ensaios feitos com cepas identificadas corretamente são fundamentais para compreensão do espectro terapêutico mais adequado ao tratamento.

Mais de 130 espécies dentro de 70 gêneros foram descritas em infecções humanas e animais (Kumar e Hallikeri, 2008); no entanto, nas últimas décadas, a lista de espécies de BYFs relacionadas a infecções em seres humanos aumentou muito e a tendência é crescer, ainda mais, devido ao maior número de pacientes suscetíveis, como transplantados e outros imunosuprimidos e à melhoria no diagnóstico das feo-hifomicoses (Kim et al., 1998; Matsushita et al., 2003; Takahara et al., 2005). Além disso, novos métodos mais discriminatórios permitem determinar com exatidão as espécies causais. A identificação dos fungos demáceos é, tradicionalmente, baseada na observação de estruturas morfológicas particulares, como: anelídeos, fiálides, colaretes nas adenofialides, diferenciação de conidióforos e septação de macroconídios. Os testes moleculares são uma alternativa na identificação desses fungos, com o uso da amplificação do DNA, seguido da sequência de análises das regiões variáveis com genes conservados como 18S rRNA, 5.8S rRNA ou “*internal*

transcribed spacers” ITS1 e ITS2 (Rakeman et al., 2005; Schoch et al., 2012).

Membros da ordem *Chaetothyriales* podem ser divididos em três grupos ecológicos: a) sapróbios que não causam doença em vertebrados, ou são colonizantes assintomáticos; b) agentes de cromoblastomicose, que podem ser isolados do meio ambiente, mas parecem ser bem adaptados para infecção humana; c) patógenos sistêmicos, altamente, virulentos que exigem um animal hospedeiro para ser isolado do meio ambiente ou foram, até o momento, identificados, exclusivamente, em infecções no hospedeiro humano (de Hoog et al., 2000).

1.3 A utilização do MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Flight Mass Spectrometry*) na identificação microbiológica

Na última década, os laboratórios de microbiologia clínica passaram por mudanças revolucionárias no modo pelo qual os micro-organismos são identificados. As técnicas tradicionais e demoradas foram substituídas, ainda que a análise morfológica continue a ser importante, por métodos moleculares e de espectrometria de massa (MS). A técnica de MS foi utilizada, historicamente, como ferramenta de alta complexidade adaptada para análise de proteínas em amostras de laboratórios químicos e de hematologia. Hoje a técnica denominada de MALDI-TOF MS está adaptada para o uso nos laboratórios de rotina em microbiologia, sendo um método rápido, robusto e preciso para identificações microbianas (Clark et al., 2013).

A rapidez na análise dos fungos pelo MALDI-TOF MS tem o potencial de revolucionar a micologia médica. A identificação dos fungos no laboratório clínico é, tradicionalmente, associada ao uso de meios diferenciais ou seletivos, juntamente com a identificação bioquímica, manual ou automatizada. Com a implementação de um sistema rápido e com a função de uma plataforma universal para identificação de espécies fúngicas, reduções significativas no tempo do diagnóstico e no custo laboratorial podem ser realizadas, com amplos benefícios ao paciente (Clark et al., 2013).

Na análise por MALDI-TOF MS é utilizado um mecanismo de ionização suave, com uma solução saturada de um composto orgânico de baixo peso, denominado de matriz, que é adicionada a amostra e então colocada numa placa de metal a ser inserida no equipamento. No caso de uma identificação bacteriana ou fúngica, a colônia do micro-organismo é analisada após a secagem do material, juntamente, com a matriz, formando um depósito sólido co-cristalinizado de cultura e matriz (Figura 2). A matriz é essencial para o sucesso na ionização, pois atua como uma escada para ocorrer à ionização por atuar como um fornecedor de prótons para o material biológico (Clark et al., 2013).

A amostra com a matriz cristalizada, presente na superfície da placa de metal inserida no equipamento é, então, irradiada por um feixe de laser ultravioleta. A irradiação ocorre durante um curto período de tempo a fim de evitar danos ou degradação por excesso de aquecimento da amostra, embebida na matriz (Clark et al., 2013). O feixe de laser é focado em um pequeno ponto da amostra e um atenuador de feixe é empregado na lente do laser para ajustar a irradiância. O ajuste do laser pode ser realizado individualmente, dependendo do tipo de amostra, porém geralmente é padronizado pelo fabricante para aplicações de rotina. A interação entre os fótons de laser e as moléculas matriciais causadas pela absorção da energia do feixe provoca a sublimação da matriz em uma fase gasosa, onde ocorre à formação de uma pluma e, imediatamente, é feita a ionização da amostra (Figura 3) (Clark et al., 2013).

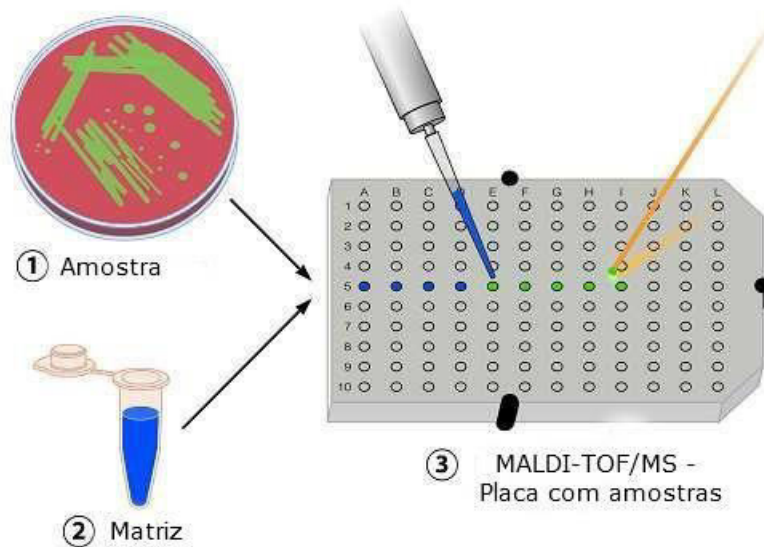


Figura 2. Esquema para preparação da placa metálica para identificação de bactérias e leveduras na técnica de MALDI-TOF.

(Fonte: adaptado de Clark et al., 2013)

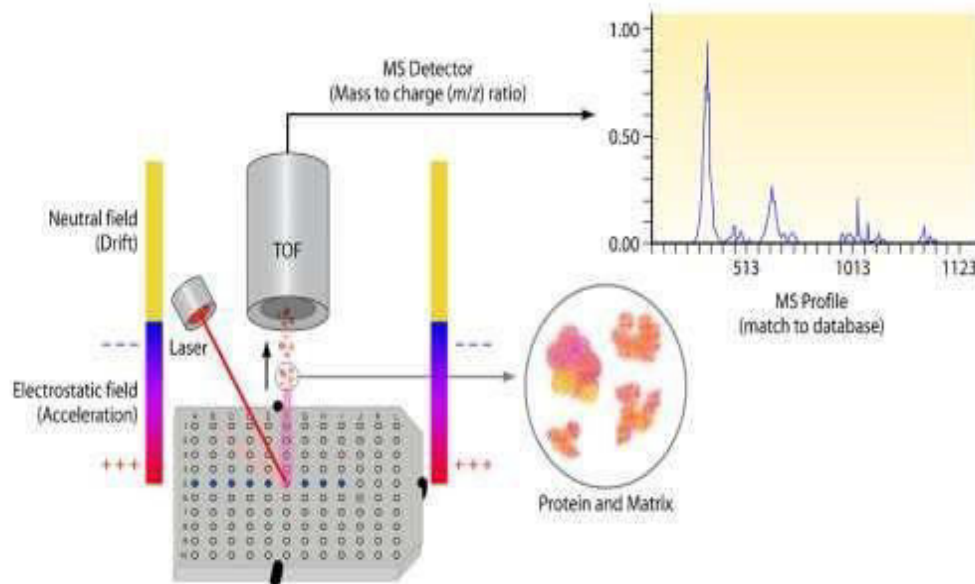


Figura 3. Esquema geral de funcionamento do aparelho MALDI-TOF para análise de isolados ambientais e de amostras biológicas.

(Fonte: adaptado de Clark et al., 2013).

1.4 Antifúngicos azólicos

Os compostos azólicos, além de serem substâncias químicas usadas na medicina, são também utilizadas na agricultura (Trosken et al., 2006). Os antifúngicos usados na prática clínica e na agricultura são muito similares. Dentro do grupo dos azóis, temos os imidazólicos que contêm dois átomos de nitrogênio e triazólicos que contêm três átomos de nitrogênio na sua estrutura (Maertens, 2004).

Os azóis agem na biosíntese do ergosterol, lipídio codificado pelo gene ERG11 em cepas de *Candida albicans*, *C. neoformans* e outras leveduras e pelos genes *cyp51A* e *cyp51B* em *Aspergillus fumigatus* e outros fungos filamentosos. A ação dos azóis é, especificamente, na enzima lanosterol 14 α -demetilase, membro da família de enzimas do citocromo P450. Esta enzima é responsável por transformar lanosterol em ergosterol que é um constituinte essencial da membrana citoplasmática do fungo (Mansfield et al., 2010). A inibição da formação do ergosterol resulta em desorganização da parede celular fúngica, impossibilidade de reprodução celular e, finalmente, parada no crescimento celular por acúmulo de esteróis precursores do ergosterol, produzidos pelo gene ERG 3, que são tóxicos para a célula. O modo de ação dos azóis, portanto, é mais fungistático do que fungicida, conforme ilustrado na Figura 4.

1.4.1 Antifúngicos azólicos de uso clínico

O primeiro composto azólico foi sintetizado em 1944 por Woolley, mas até 1958 a comunidade científica não considerava os azóis como potenciais agentes antifúngicos. Em 1990 o fluconazol começou a ser avaliado por clínicos por ter maiores vantagens que os imidazólicos, pela alta solubilidade em água e facilidade de via intravenosa (Arndt et al., 1988; Brammer et al., 1990). Em 1992, o FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou uma nova droga, o itraconazol com um maior espectro antifúngico do que o fluconazol. Esse novo fármaco, porém, era hidrofóbica e, portanto, mais tóxica do que o fluconazol. Em 1997 o

FDA aprovou uma nova formulação de itraconazol com maior capacidade de absorção e diminuição da toxicidade (Espinell- Ingroff et al.,1984; Barone et al., 1998).

Esses fármacos azólicos não eram, ainda, antifúngicos “perfeitos”, sob alguns aspectos: interação com outros usados na quimioterapia para AIDS, pouca ação contra alguns patógenos emergentes como *Scedosporium*, *Fusarium* e fungos da família Mucorales e aumento nos relatos de resistência às mesmas (Denning et al., 1997). Assim, uma nova geração de triazóis (Figuras 5 e 6) foi desenvolvida e aprovada pelo FDA, sendo o voriconazol aprovado em 2002 e o posaconazol em 2006. O fármaco ravuconazol, é considerado mais ativo que fluconazol e itraconazol sendo considerado eficaz contra leveduras que apresentam MICs altos para os antifúngicos citados. Estes chamados "novos fármacos" têm largo espectro de atividade não apenas, contra *Cryptococcus*, mas, ainda, sobre diversas espécies de *Aspergillus*, *Candida*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Scedosporium*, *Acremonium*, *Trichosporon*, dermatófitos e fungos dimórficos. No entanto, alguns isolados fúngicos resistentes aos triazóis clássicos demonstram resistência cruzada à nova geração de triazóis (Sabo et al., 2000; Chiou et al.,2000; Cuenca-Estrella et al., 2004).

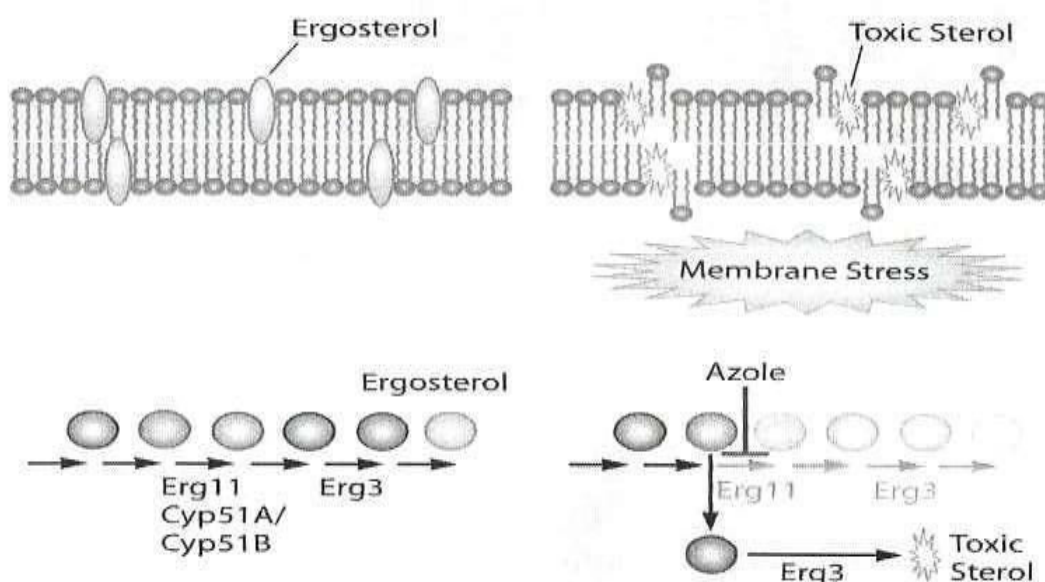
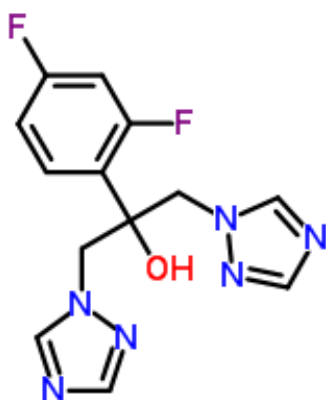
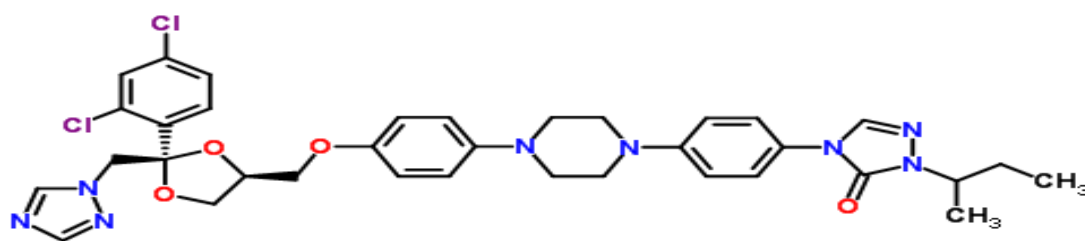


Figura 4. Ilustração sobre os mecanismos de ação de compostos azólicos, como: bloqueio na produção de ergosterol pelo *Erg11* e acúmulo de esteróis tóxicos produzidos pelo gene *Erg3*. (Fonte: Shapiro et al., 2011)



Fluconazol



Itraconazol

Figura 5. Ilustração das estruturas químicas de dois antifúngicos triazólicos.
(Fonte: <http://www.chemspider.com>)

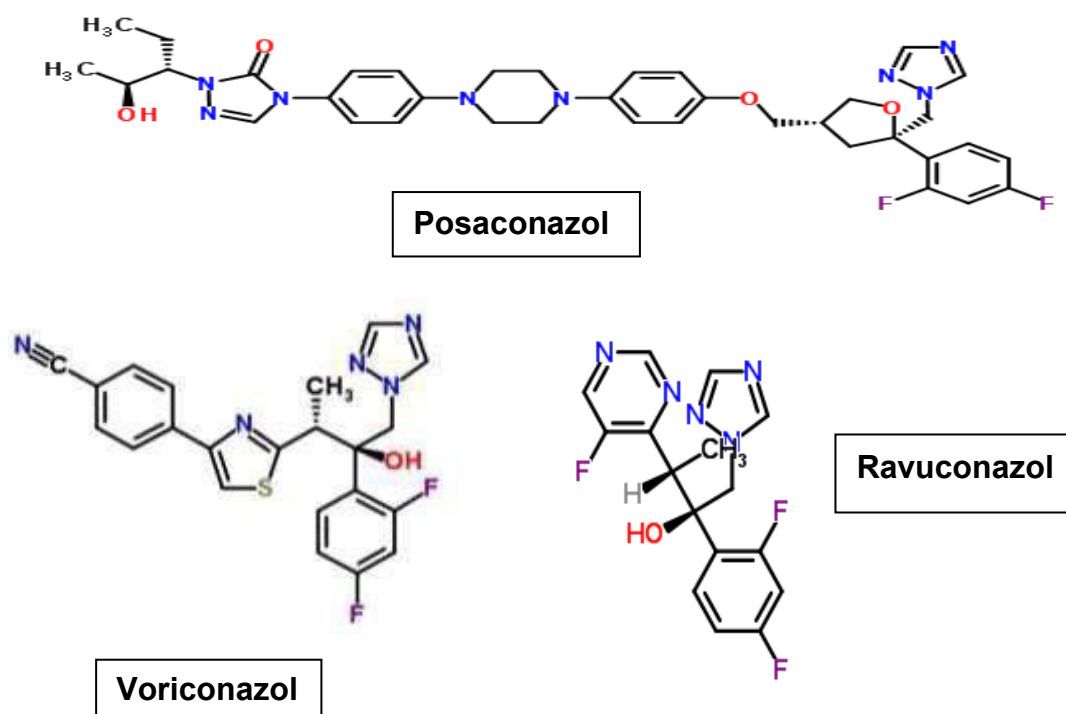


Figura 6. Ilustração das estruturas químicas de três compostos da nova geração de antifúngicos triazólicos.

(Fonte: <http://www.chemspider.com>)

Importante é ressaltar que nem todos os fungos são suscetíveis aos azóis e alguns deles são intrinsecamente, resistentes a esse grupo de fármacos, citando-se: *C. krusei*, *Rhodotorula* spp., *A. terreus* e *Scedosporium prolificans*, desde que, o ergosterol não é requerido para a formação da parede celular, assim como ocorre em *Pneumocystis* spp.

São conhecidos três tipos diferentes de mecanismos de resistência para os antifúngicos do grupo dos azóis: 1- aumento de bombas de efluxo, que transportam distintas classes de antimicrobianos e outros compostos, para fora da célula, codificadas pelas famílias de genes *ATP binding cassette- ABC* (genes CDR) e *major facilitator* (genes MDR); 2- alterações estruturais na enzima-alvo; 3- implementação de vias metabólicas alternativas ou produção da molécula da enzima-alvo (Espinell-Ingroff, 2008).

O primeiro mecanismo citado é a superexpressão das proteínas multidrogas

que diminuem a acumulação dos azóis dentro da célula. O transportador melhor caracterizado na espécie denomina-se *AntiFungal Resistance 1* de *C. neoformans* (CnAFR1). Além do CnAFR1 temos outro gene, que ocorre em outras leveduras, que pode ser superexpresso, o Mdr1 que codifica para proteína transportadora mais seletiva para fluconazol, não estando associado à resistência cruzada a outros azóis (Thornewell et al., 1997; Shapiro et al., 2011). Esta proteína é membro da superfamília *major facilitator superfamily* dos transportadores multidrogas (*multidrug efflux transporters*). O segundo mecanismo decorre de alterações estruturais na enzima-alvo dos azóis, pela mutação no gene *Erg11*, que impede a ligação do fármaco na proteína. As alterações no gene *Erg11* já foram documentadas em vários isolados clínicos (Vanden-Bossche et al., 1990; Lamb et al., 1995; Marichal et al., 1999).

No terceiro mecanismo de ação dos azóis, a resposta celular é crucial para o estresse induzido pelos fármacos. No caso de *Candida* e *C. neoformans* esse mecanismo é chamado de heterorresistência. Este fenômeno ocorre quando uma única célula dá origem à outra célula com o fenótipo de resistência, podendo ser altamente resistente aos azóis. As subpopulações podem se adaptar a maiores concentrações de azóis de forma gradual, após passagens em placas contendo meios de cultura adicionados de azóis. No entanto, a sensibilidade original é restaurada após a passagem em meios de cultura sem antifúngico (Sionov et al., 2010; Shapiro et al., 2011). Além disso, pode haver superexpressão dos genes produtores da enzima-alvo e, com isso, as células fúngicas conseguem produzir ergosterol necessário para formação e estruturação de parede, mesmo na presença de fármacos azólicos.

A multiresistência é aquela exibida frente a compostos de diferentes classes, e a resistência cruzada caracterizada por ocorrer frente a substâncias de mesma classe química (p.ex. triazóis); ambas são observadas em cepas ambientais e clínicas (Anderson, 2005; Colinas et al., 1994; Vaclavik et al., 2004; Liu et al., 2009).

A exposição aos componentes azólicos clínicos abre caminho para a seleção e multiplicação de fungos que apresentaram sensibilidade reduzida a

esses compostos, como pode ocorrer em pacientes tratados com antifúngicos azólicos. De modo similar, a utilização de compostos azólicos como fungicidas no meio ambiente pode selecionar isolados, com reduzida sensibilidade a um ou mais azóis, que podem ser transmitidas a seres humanos por inalação de bioaerossóis, traumatismo ou deglutição (Yang et al., 2012). Isto porque tais fungicidas têm estruturas cíclicas semelhantes aos fármacos azólicos, conforme ilustrado na Figura 7.

1.4.2. Antifúngicos azólicos e meio ambiente

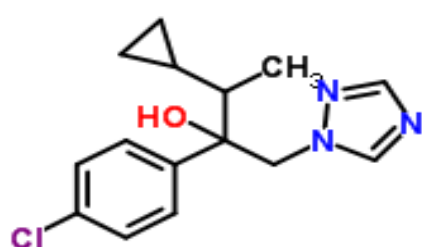
Verifica-se, atualmente, no Brasil a concentração do mercado de agrotóxicos em determinadas categorias de produtos em que os fungicidas respondem por 14% do mercado nacional (ANVISA e UFPR, 2012). A taxa de importação de princípios ativos para esses compostos cresceu 400% e de produtos formulados cresceu 700% nos últimos anos (ANVISA e UFPR, 2012). O consumo de agrotóxicos no Brasil, em 2010, teve acréscimo de 190%. O mercado nacional movimentou cerca de US\$ 7,3 bilhões e representou 19% do mercado global de agrotóxicos. Em 2011, houve aumento de 16,3% das vendas, alcançando US\$ 8,5 bilhões, sendo que as lavouras de soja, milho, algodão e cana-de-açúcar representaram 80% do total das vendas do setor (SINDAG, 2012). Atualmente existe apenas uma legislação para o uso de agrotóxicos no Brasil, o decreto 5981/2006 que regulamenta a lei federal 7802/1989 alterada pela lei 9974/2000 que fiscaliza, pesquisa, classifica, executa a inspeção e o controle da produção, embalagem e rotulagem dos agrotóxicos no país.

De acordo com a FAO (2008), o consumo de fungicidas atingiu uma área potencial de, aproximadamente, 800 mil hectares. Os números apontam o extenso uso de ingredientes ativos de fungicidas, em áreas de plantação de hortaliças no Brasil, podendo ser 8 a 16 vezes maior a

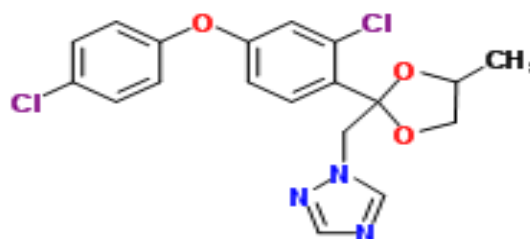
quantidade de agrotóxico por hectare nessa produção, do que o utilizado na cultura da soja. Isso indica que, cerca de 20% da comercialização de fungicidas no Brasil destinam-se ao uso em plantações de hortaliças (Almeida et al., 2009).

Os fungicidas podem ser divididos em protectantes e específicos. Os protectantes são os mais antigos e incluem produtos com base de cobre e enxofre formando um filme na superfície da planta que inibe a germinação de esporos fúngicos. Os específicos são assim chamados porque eles atuam em reação química específica, já citada, dentro da célula fúngica (Bartlett et al., 2002).

Os fungicidas triazólicos no Brasil representam um importante modo de ação para o controle de doenças, porém a genética da resistência dos triazóis é poligênica, para vários fitopatógenos, e níveis elevados de resistência são observados após adaptação gradual desses agentes (Godoy e Meyer, 2014).



Ciproconazol



Difenoconazol

Figura 7. Ilustração da estrutura química de dois fungicidas agrícolas triazólicos usados no Brasil.
(Fonte: <http://www.chemspider.com>.)

Tabela 1. Modo de ação dos fungicidas utilizados na agricultura.

Grupo químico	Exemplos de alguns agentes utilizados no Brasil	Modo de ação
Triazóis/ Inibidores de demetilação (DMI)	Difenoconazol	Inibição da C-14 α demetilase da biossíntese do ergosterol
	Epoxiconazol	
	Tebuconazol	
	Ciproconazol	
	Miclobutanil	
	Bitertanol	
	Bromuconazol	
	Triticonazol	
	Penconazole	
	Propiconazol	
Meticonazol		
Tetraconazol		

Fonte: adaptado de Hirooka e Ishii (2013)

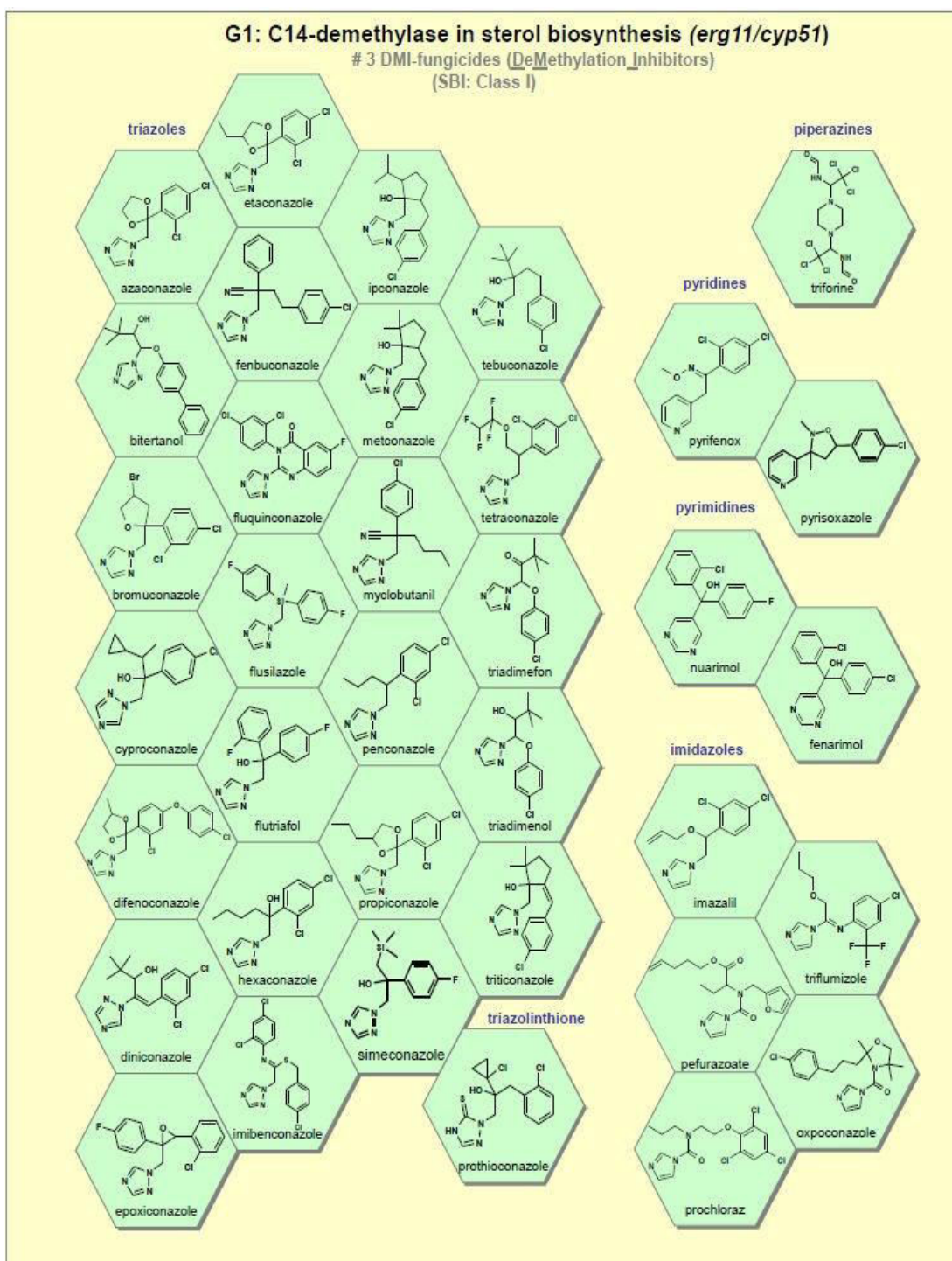


Figura 8. Ilustração das moléculas dos fungicidas de uso comercial do grupo dos triazóis.

(Fonte: <http://www.frac.info/publications/downloads>)

1.5 A utilização da cromatografia na prospecção de fungicidas em amostras ambientais

Nas análises químicas ambientais, vários métodos químicos têm sido descritos para avaliação de variados componentes em matrizes ambientais como solo e água. Um dos métodos citados é o que utiliza cromatografia que pode ser líquida de alto desempenho ou alta performance (HPLC), gasosa e eletroforese capilar (Tadeo et al., 2010; Pérez-Carrera et al., 2010).

A cromatografia líquida de alta eficiência tem sido aplicada na pesquisa de resíduos em diversas matrizes devido à capacidade de detectar compostos termicamente instáveis e não voláteis, que não são identificados por cromatografia gasosa. Devido ao grande poder de separação para análise de matrizes complexas, a técnica é sensível e seletiva e provê identificação segura em baixas concentrações para diferentes analitos, porém em amostras complexas com variação de 150 a 250 compostos de interesse, a separação por cromatografia gasosa ou líquida de única coluna não é suficiente para a separação de todos os compostos (Hogendoorn e Zoonen, 2000; Blumberg et al., 2008).

O procedimento tradicional de preparação para análise de substâncias pela cromatografia consiste em extração com solvente, ou etapa de digestão, seguida de extração e purificação no caso de substâncias orgânicas. O pré-tratamento adequado para amostras, incluindo a lixiviação de componentes fortemente ligados, é crucial e considerado a etapa mais laboriosa no processo analítico. Métodos tradicionais para preparação de amostras são trabalhosos e consomem tempo, envolvendo grande quantidade de solventes para componentes orgânicos ou ácidos para componentes inorgânicos. Para os componentes orgânicos geralmente é necessário um estágio a mais de *clean-up*. Como consequência, uma variedade de métodos para preparação de amostras foi desenvolvida nas últimas décadas com o objetivo de melhorar o desempenho da extração,

bem como reduzir tempo e custo. Durante os últimos anos, várias técnicas de extração rápidas foram desenvolvidas para superar as limitações dos métodos convencionais (Tadeo et al., 2010). Os principais métodos de extração dos componentes químicos das amostras ambientais são a extração de Soxhlet, micro-ondas assistida, técnica ultrasônica assistida ou extração acelerada de solvente (ASE) seguida por procedimento de extração de limpeza *clean-up* (Tadeo et al., 2010; Halko et al., 2006; Ding et al., 2011).

Em vista do exposto, conclui-se que o uso intensivo dos fungicidas agrícolas, apesar de proporcionar o controle de doenças, pode ter como consequência a seleção de isolados fúngicos menos sensíveis ou resistentes. Quando fungicidas de modo de ação específico começam a ser aplicados, atuam como agentes de seleção e tendem a eliminar populações mais sensíveis do micro-organismo (Godoy e Meyer, 2014). Sugere-se que a exposição frequente a fungicidas azólicos utilizados em agricultura, poderia proporcionar, também, seleção de cepas resistentes de fungos patógenos como *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans* (Verweij et al., 2009; Drummond et al., 2007).

O aumento da resistência clínica a fármacos triazóis é, frequentemente, descrito como a mudança de sensibilidade, em determinada cepa, ou seleção contínua dentro de população de cepas sensíveis (Godoy e Meyer, 2014). Foi proposto que a resistência a triazóis clínicos está relacionada com o meio ambiente e pode ser causada por pressão seletiva de fungicidas da mesma classe (Verweij et al., 2009). Ainda que novas evidências tenham ocorrido, para dar suporte a essa hipótese, a relação entre o uso ambiental de fungicidas e o desenvolvimento da resistência a triazóis em cepas fúngicas não está comprovada e, dentro desse contexto, este estudo foi delineado.

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Investigar se há pressão seletiva em isolados ambientais quanto à sensibilidade a fármacos azólicos por exposição a fungicida da mesma classe

2.2 Objetivos específicos

- Isolar e identificar leveduras melanizadas de ambientes de hortas exposta e não exposta a fungicidas azólicos;
- Investigar a sensibilidade dos isolados aos fármacos azólicos: fluconazol, itraconazol e voriconazol e a fungicidas agrícolas difenoconazol e ciproconazol;
- Investigar o nível de heterorresistência ao fluconazol e efeito inibitório e fungicida de anfotericina B em *C. neoformans*;
- Analisar ocorrência de resistência cruzada entre os fármacos azólicos e os fungicidas agrícolas;
- Avaliar presença de fungicidas azólicos no solo das hortas;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem

Foram coletadas amostras ambientais em duas horticulturas localizadas no Município de Rio Claro, São Paulo. A horta A sendo da iniciativa privada que utiliza fungicidas e a Horta B, uma horta orgânica pública associada a escola municipal agrícola da região. A coleta foi autorizada pela Vigilância Sanitária do Município e contou com o apoio logístico dos funcionários do Instituto Adolfo Lutz de Rio Claro.

A localização geográfica das hortas foi estabelecida por GPS eTrex®20 portátil (Garmin, EUA). A horta A localiza-se a S23°33'.349" e W046°40'.128" e a horta B localiza-se a S22°17'.748" e W047°32'.495".

Todas as coletas na horta A foram realizadas em canteiro de cebolinhas (Figura 9), sendo a água de lavagem utilizada do tanque de verduras e a água de irrigação situada próximo ao ponto de ligação central dos irrigadores (Figura 10 e 11).

As coletas na horta B tiveram variabilidade do plantio no canteiro (Figura 12), sendo a água de irrigação coletada antes da bomba de irrigação (Figura 13).

A Tabela 2 mostra os compostos inorgânicos e orgânicos utilizados na preparação do solo para o plantio.

Tabela 2. Compostos utilizados para o preparo do solo na época de plantio nas hortas A e B.

Horta A	Fertilizante mineral misto, esterco de galinha e fungicida
Horta B	Esterco de galinha

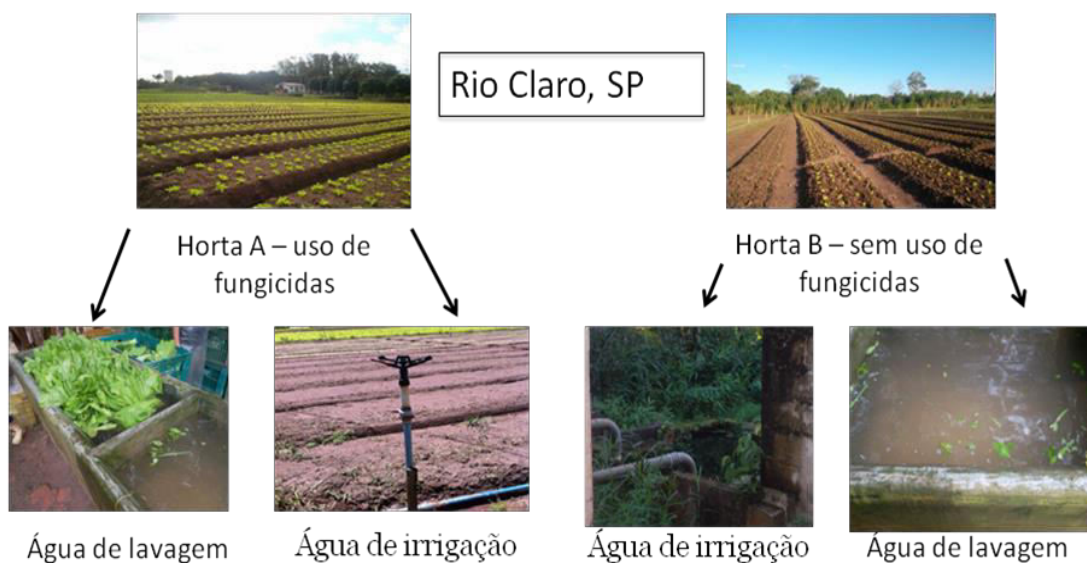


Figura 9. Esquema de coleta ambiental realizada no município de Rio Claro, SP. (Fonte: Arquivo pessoal).



Figura 10. Plantação de cebolinha cultivada na horta A. (Fonte: arquivo pessoal).



Figura 11. Água de lavagem das verduras (à esquerda) e água de irrigação da horta A.

(Fonte: arquivo pessoal).



Figura 12. Plantação de cebolinha cultivada na horta B.

(Fonte: arquivo pessoal).

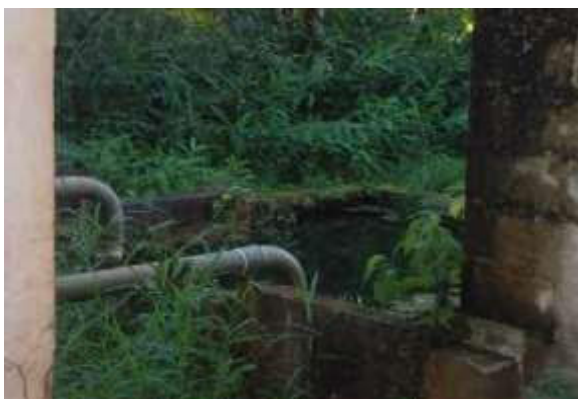


Figura 13. Água de irrigação da horta B.
(Fonte: arquivo pessoal)

As amostras coletadas em cada horta foram: solo, água de irrigação e água de lavagem. O período de coleta foi de janeiro de 2012 a setembro de 2014 com periodicidade variada, mas de modo a totalizar 12 meses de amostragem.

3.2 Obtenção de culturas de *Cryptococcus* spp. e outras leveduras melanizadas

3.2.1 Coleta e processamento de amostras de solo

A coleta de solo foi realizada a 15 cm de profundidade em 3 pontos diferentes do mesmo canteiro de plantação. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis (Nasco Whirl-Park®) no volume, aproximado, de 100 gramas. As amostras de solo foram processadas pelo método de STAIB modificado (Castro e Silva, 2015). Cinco gramas de cada amostra foram colocados em 20 mL de solução salina estéril (0,85%) e agitados por dois minutos, em vórtex. Do sobrenadante, foram retirados 4 mL utilizando pipeta Pasteur estéril e transferidos para tubo cônico de 50 mL, e foi adicionado 1 mL de solução de penicilina cristalina 1.200.000 UI (4,5 mg/mL) e estreptomicina (10 mg/mL) (Figura 14).

Dessa suspensão foram semeados 100 μ L em 5 placas de Petri contendo

meio ágar *Dicloran Rose Bengal* modificado (DRBCm) (BD Difco®, EUA) e em outras 5 placas contendo meio ágar Mycosel® (Difco, EUA) (Figura 14). O ágar *Dicloran Rose Bengal* modificado é composto por 15g do ágar DRBC comercial, com infusão de 50g de sementes de *Guizzotia absynnica* (sementes de niger), 2g de creatinina p.a e adicionadas a 1000 mL de água destilada.

As placas foram, então, incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por até 7 dias, sendo acompanhado, diariamente, o aparecimento de colônias (Figura 15). A identificação das colônias foi realizada conforme a morfologia: i) brilhante, mucóide, pigmentação carotenóide ou melanizada: suspeita de *Cryptococcus* spp.; ii) melanizada, brilhante: suspeita de outros gêneros de leveduras melanizadas.

A manutenção dos isolados durante o estudo foi realizada em ágar Sabouraud (BD Difco™, EUA) e a preservação foi na forma de suspensão concentrada em leite mólico a 10% (*Skim milk*) sob congelamento a -70° . Essa suspensão reduz danos no congelamento e descongelamento e estabiliza o microrganismo contra os efeitos adversos da estocagem.



Figura 14. Solo coletado em saco plástico estéril (à esquerda) e processamento do solo (repouso) na metodologia de STAIB (à direita).

(Fonte: arquivo pessoal).



Figura 15. Crescimento de colônias de fungos do solo em ágar DRBCm (à esquerda) e ágar Mycosel (à direita).
(Fonte: arquivo pessoal).

3.2.2 Coleta e processamento de amostras de água

As amostras de água de irrigação e lavagem foram coletadas em sacos plásticos estéreis (Nasco Whirl-Park®) no volume de 300 mL cada.

Cada amostra de água foi dividida em 3 alíquotas que foram filtradas, em separado, em membranas de nitrocelulose (0,45µm) (Millipore, BR). A primeira membrana foi friccionada em 4 placas de meio DRBCm, a segunda membrana em 4 placas de meio Mycosel® e a última membrana foi friccionada em 2 placas, sendo uma de DRBCm e outra de Mycosel®. Todas as membranas foram desprezadas após esses procedimentos. As placas foram, então, incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2$ por até 7 dias (Figura 16).

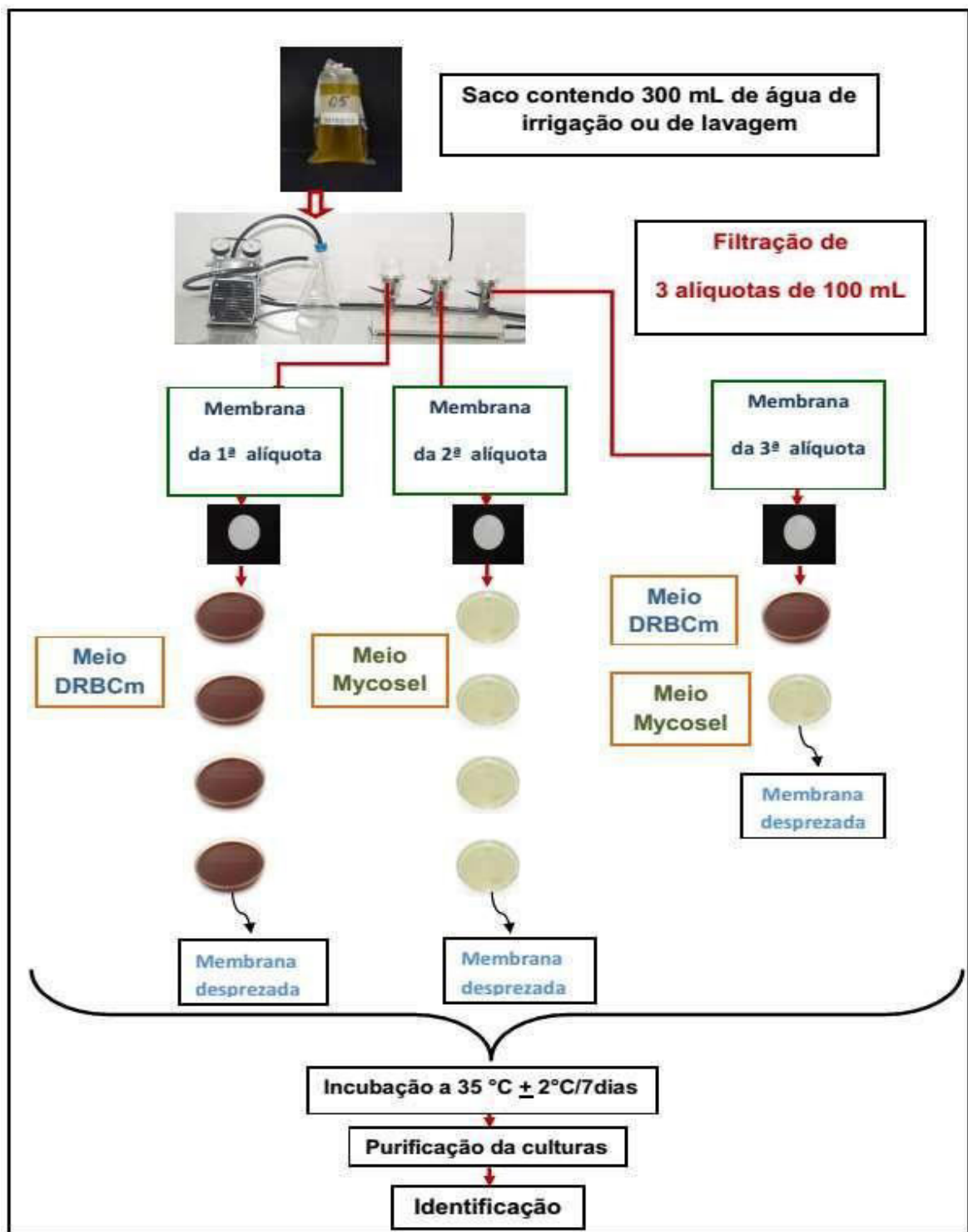


Figura 16. Fluxograma da técnica de isolamento para água de irrigação e lavagem das hortas A e B. (Fonte: Letícia M.Feliciano, aluna de mestrado do Programa de Pós Graduação em Ciências, Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo)

3.3 Caracterização fenotípica das leveduras melanizadas

3.3.1 Caracterização fenotípica de *Cryptococcus* spp.

As colônias com características de *Cryptococcus* spp. que cresceram nas placas com as amostras ambientais foram semeadas em ágar cromogênico CHROMagar *Candida*® (bioMérieux, Fr) (Figura 17). Após incubação à 35°C±2°C por até 72 horas, foram examinadas em microscópio para pesquisa da presença de cápsula, com tinta da China.

As colônias com células foram semeadas em ágar contendo compostos fenólicos (*Guizzotia abyssinica*) para pesquisa do gênero *Cryptococcus* (Staib, 1962). A produção de urease e assimilação de açúcares (auxanograma) no sistema API 20C (bioMérieux, Fr) foram avaliadas para triagem de espécies. A cultura identificada como *C. neoformans* foi avaliada no meio L-canavanina, glicina e azul de bromotimol (CGB) (Mendes-Giannini e Melhem, 2000) para diferenciação fenotípica entre *C. neoformans* e *C. gattii*.



Figura 17. Observação macroscópica de diversos tipos de crescimento de *Cryptococcus* spp. em ágar cromogênico.
(Fonte: arquivo pessoal)

3.3.2 Caracterização fenotípica de outras leveduras melanizadas

As colônias melanizadas com suspeita de outros gêneros que não *Cryptococcus* foram purificadas por plaqueamento em ágar cromogênico CHROMagar *Candida*® (bioMérieux, Fr). Após crescimento das colônias, estas foram transferidas para tubos contendo ágar Sabouraud (BD Difco, EUA) com cloranfenicol (0,2 g/L) e então incubadas a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por período de até 7 dias. A manutenção dos isolados durante o estudo foi realizada em ágar Sabouraud (BD Difco™, EUA) e a preservação foi feita em duplicata em leite mólico a 10% (*Skim milk*) sob congelamento a -70° .

Após o crescimento das colônias, as características morfológicas em relação à produção de conídios foram usadas para triagem de gênero (de Hoog, 1999).

3.3.3 Análise dos isolados por MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Flight Mass Spectrometry*)

A análise das proteínas para identificação dos isolados por MALDI-TOF MS foi realizada no Laboratório do Grupo Fleury de São Paulo. Para identificação foram usadas culturas de no máximo, 24h. Foi realizado um protocolo de extração direta do material com ácido fórmico a 70% para a leitura no espectrômetro.

Após a análise das proteínas, foi realizada a leitura e interpretação dos resultados, segundo critérios do fabricante do aparelho (Bruker Daltonics, Ge), a saber: alta probabilidade de identificação de espécie (pontuação de 2,300 a 3,000), provável identificação de espécie e identificação segura de gênero (pontuação 2,000 a 2,999), provável identificação de gênero (pontuação de 1,700 a 1,999) e identificação não confiável (pontuação de 0,000 -1,699).

3.4 Análise de DNA

3.4.1 Extração do DNA genômico para seqüenciamento e RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Obtenção de protoplasto (Perfect et al., 1989; Polachek et al., 1989)

Colônias com 48h de crescimento foram removidas para um microtubo tipo Eppendorf contendo 1 mL de EDTA (50mM). Cada um dos microtubos foi centrifugado a 10.000 rpm por 15'. O sobrenadante foi desprezado e, ao sedimento, foi adicionado 1 mL de EDTA (50 mM). Este processo de lavagem foi repetido até que o sobrenadante fique límpido e, então, desprezado. Para a digestão da cápsula e parede, as células foram ressuspensas em 200µL de tampão CES(20mM de tampão citrato, pH 5,6; 50mM de EDTA; pH 8.0; 0,9M de sorbitol), contendo 2 mg de lisoenzima (*Trichoderma harzianum*, Sigma, EUA).

A suspensão foi incubada a 37°C (2h à 3h) sob agitação constante. A seguir, cada microtubo contendo protoplastos, comprovados por observação microscópica, foi centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos sob 4°C. Foram feitas, a seguir, três lavagens do sedimento com 1mL de tampão CES e, então, o sedimento foi ressuspensão em 200µL de tampão CES.

Lise Celular (Sambrook et al., 1989)

Aos protoplastos obtidos, conforme descrito, foram adicionados 200µL a 300µL de tampão de lise a suspensão foi incubada sob 50°C por 2h, agitando-se em vórtex a cada 30 minutos. O material foi, então, centrifugado por 5 minutos e o sobrenadante foi retirado para outro microtubo. Ao sobrenadante foram adicionados de 200µL a 400µL de clorofórmio (24:1 clorofórmio/isopropanol) para promover precipitação das proteínas. Após centrifugação por 15 minutos, houve formação de três fases e a fase aquosa (parte superior) sendo retirada para outro microtubo. Para promover a precipitação do DNA, foi adicionado 300µL de isopropanol e o material foi, então, centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento foram adicionados 200µL a 500µL de etanol (70%). Após centrifugação, por 10 minutos a 10000 rpm, o sobrenadante foi desprezado. Após secagem do sedimento constituído de DNA, este foi ressuspensão em 20µL de solução aquosa de água de RNase e, então, mantido sob -20°C até sua utilização.

3.4.2 Diferenciação molecular entre isolados de *C. neoformans* e *C.gattii*

A caracterização molecular dos fenótipos de *C. neoformans* foi realizada por metodologia de RFLP, após extração do DNA genômico, conforme descrito anteriormente.

O DNA assim extraído foi processado pela técnica de PCR-RFLP segundo Meyer et al. (2003). Para a amplificação da sequência alvo do DNA, foi utilizada a solução pronta para uso (Go Taq® Green Master Mix, Promega). Esta solução contém *Taq* DNA polimerase, dNTPs, MgCl₂ e tampões em concentrações ótimas para amplificação do DNA por PCR. A solução contém dois corantes que permitem monitorar o curso da eletroforese e possui densidade suficiente para que o produto da PCR seja aplicado diretamente no gel.

Para a técnica de PCR-RFLP foi amplificado o fragmento *URA5* utilizando par de *primers* URA5: 5'- ATGTCCTCCCAAGCCCTCGACTCCG-3'; Sj01: 5'-TTAAGACCTCTCTGAACACCGTACTC-3'. Nas seguintes condições: desnaturação inicial de 94°C por 5', 35 ciclos a 94°C por 45" a 63°C por 1'; 72°C por 2' e extensão final de 10' a 72°C. Os produtos do PCR foram digeridos, duplamente, com: *Sal* 96I (10U/uL) e *Hha*I (20 U/uL) por 3h. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese, em sistema horizontal contendo solução de TBE (Tris-borato-EDTA), durante 50 minutos a 100V e 400mA. Os géis foram visualizados em trans- iluminador ultravioleta com comprimento de onda de 302 nm (Syngene). Os perfis de bandas das cepas de *C. neoformans* foram assinalados, visualmente, por comparação com os perfis obtidos com 8 cepas de referência (VNI-VNIV gentilmente cedidas por Prof. Wieland Meyer, Universidade de Sidney, Austrália).

3.4.3 Mating-type

O mating-type foi determinado por PCR usando os primers *MAT* alfa 5'-CTTCACTGCCATCTTCACCA-3' e 5'-GACACAAAGGGTCATGCCA-3' e *MAT* a 5'-CGCCTTCACTGCTACCTTCT-3' e 5'-AACGCAAGAGTAAGTCGG GC-3', sendo o protocolo utilizado descrito por Chatuverdi et al., 2000. O *mix* para PCR foi utilizado com o seguinte protocolo:

MgCl ₂ 15mM	5,0 uL
dnTP 10 mM	1,0 uL
Taq Polimerase	1,8 U
Primer 10mM	2,5 uL
Amostra	5,0 uL

Para a reação de PCR foi utilizado o seguinte protocolo:

1 X 95°C	3 minutos
30 X 94°C	1 minuto
1 X 57,5°C	1 minuto
1 X 72°C	1 minuto

3.4.4 Sequenciamento da região ITS, D1 e D2

Depois de realizada a extração do DNA genômico, foi feita a quantificação de DNA (30ng/uL), realizada no aparelho Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA). Em seguida foi realizada reação

de PCR, com sistema comercial (Invitrogen, Califórnia, EUA) seguindo o seguinte protocolo:

Tampão 10X	5,0 uL
MgCl ₂ 50mM	1,5 uL
dnTP 10 mM	1,0 uL
Primer 10pmol/uL	1,0 uL
Taq Platinum	0,2 uL
Amostra (Concentração de 50ug/mL)	2,0 uL

Na reação de PCR empregaram-se as sequências iniciadoras (*primers*) NL-1; NL-4; ITS-1 e ITS-4, no seguinte protocolo:

1 X 94°C	10 minutos
36 X 94°C	40 segundos
36 X 52°C	40 segundos
36 X 72°C	40 segundos
1 X 72°C	1 minuto
4°C	Infinito

Após essa etapa foi feito um gel de agarose a 1,5% com 4 mm de espessura com 0,5 uL de *loading juice* com 5 uL de amostra e 4 uL de escala 1Kb Plus (Invitrogen, EUA) para observação de bandas de DNA. Os amplicons foram limpos com GFX PCR DNA (GE Healthcare, EUA), conforme instruções do fabricante.

A quantificação de DNA (8ng/uL) para o PCR de sequenciamento foi executada no aparelho Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA).

O PCR para seqüenciamento foi realizado com sistema comercial (Invitrogen, Califórnia, EUA) seguindo o seguinte protocolo:

Big Dye	2,0 uL
Tampão	1 uL
Primers 1,6 μ mol/uL	2,0 uL
Amostra	5 uL

Na reação de PCR empregou-se as sequencias iniciadoras (*primers*) NL-1; NL-4; ITS-1 e ITS-4, no seguinte protocolo:

1 X 96°C	5 minutos
30 X 96°C	10 segundos
30 X 50°C	5 segundos
30 X 60°C	4 minutos
1 X 60°C	7 minutos
4°C	Infinito

As amostras foram purificadas e o seqüenciamento foi realizado em seqüenciador ABI 3730XL. As sequências foram editadas usando o programa SEQUENCHER 4.1.4. Os dados foram analisados em dois bancos de dados o BLASTn (GenBank) e o MycoBank pertencente ao CBS-KNAW (*Fungal Biodiversity Centre*).

3.5 Determinação a sensibilidade a compostos azólicos

A sensibilidade a antifúngicos de todas as amostras foi avaliada pelo método proposto pelo Clinical Laboratory Standards Institute-CLSI (CLSI, 2008), com automação da leitura, a partir de culturas de 48h. A sugestão de Zaragoza et al. (2011) sobre incubação a 30°C para isolados que não

criaram bem (densidade ótica >3) sob temperatura de reação a 35°C, foi empregado, caso necessário.

Os antifúngicos foram empregados na forma p.a, e para determinação da sensibilidade foram utilizados: fluconazol (Pfizer Laboratories, EUA), voriconazol (Sigma, EUA), itraconazol (Eurofarma, Br). O antifúngico anfotericina B (Sigma, EUA) foi utilizado apenas na cepa *C. neoformans* (JPT01) para o teste de sensibilidade e curva de morte.

Do mesmo modo, dois fungicidas azólicos usados em agricultura, ciproconazol, difenoconazol, foram usados para determinação de leveduras resistentes a fungicidas. Ambos os fungicidas na forma p.a foram recebidos como doação da empresa Syngenta Proteção de Cultivos LTDA (Syngenta, EUA). Os resultados de concentração inibitória mínima (CIM) obtidos para cada composto azólico, de uso clínico e de uso agrícola, foram analisados segundo parâmetros de: média geométrica, valor modal, CIM50 e CIM90, definidos, respectivamente, como a concentração da droga necessária para inibir 50% e 90% das amostras analisadas.

Os resultados foram compilados e analisados de acordo com valores de corte epidemiológicos, quando existentes (Espinel-Ingroff et al., 2012; Pfaller et al., 2012).

3.5.1 Curvas de morte

Os testes para determinação o tempo necessário para ação fungicida de anfotericina foram realizados de acordo com técnica descrita por Klepser et al. (1998). A técnica de curva de morte foi realizada apenas no isolado de *C. neoformans* devido a sua patogenicidade em seres humanos e animais. O teste foi realizado em duplicata.

Os isolados, antes dos testes, foram repicados em ágar Sabouraud e incubados a 30°C por 48 h. Logo após, os isolados foram submetidos a crescimento em meio RPMI-1640, tamponado com MOPS em pH 7,2, acrescido de glicose (2%), por 18 h à 35°C sob agitação constante. O

inóculo inicial foi ajustado para 0,5 da escala de MacFarland (aproximadamente, 1×10^6 a 5×10^6 ufc/mL) e então 1 mL deste inóculo foi diluído em 9 mL de meio RPMI contendo anfotericina B (1mg/L concentração final).

Em períodos pré-determinados de tempo foram retiradas aliquotas para verificar efeito fungicida do fármaco. A partir da semeadura da primeira alíquota, designada como a de tempo zero (T0), foi iniciada a contagem de tempo para as demais. Às 6h, 12h, 24h, 48h e 72h de incubação, foram removidas alíquotas de 500 uL de cada cultura para quantificação de ufc/mL, sendo diluída em 4,5 mL de solução salina estéril e 30 uL plaqueados em ágar batata com incubação de 30°C por até 72 h. Após este período, as colônias foram enumeradas e anotadas em gráfico de curvas de morte. Da mesma forma foi preparado e processado um tubo com controle positivo (*C. neoformans* ATCC 90112) sem a adição do fármaco.

A atividade fungicida (*end point*) da anfotericina B para o isolado foi determinada pela contagem de ufc/mL equivalente a 0,01% da contagem obtida no tempo zero do isolado. Para analisar a atividade fungicida pelo método de curva de morte. Foi desenvolvido um gráfico referente a contagem de colônias dos isolados versus o tempo de incubação do fármaco, permitindo observar a diminuição das unidades formadoras de colônias ainda viáveis ao longo do tempo, juntamente com a linha de controle de crescimento positivo.

3.5.2 Determinação de heteroresistência ao fluconazol

Os testes de heteroresistência foram realizados apenas no isolado de *C. neoformans*, devido a sua patogenicidade em seres humanos e animais. Os testes foram desenvolvidos segundo Sionov et al. (2009) e Varma e Kwon-Chung (2010). Os procedimentos foram realizados em 2 etapas, sendo que as mesmas foram realizadas em duplicata.

A primeira fase foi destinada à determinação do nível de heteroresistência a fluconazol (NHF) da cepa. O preparo do inóculo foi realizado na concentração de 10^6 cel/mL (na escala de MacFarland 0,5), preparada em câmara de Neubauer e confirmada por teste de ufc/mL em placa. O inóculo foi diluído para 10^5 cel/mL até 10^3 cel/mL em diluição seriada. Em seguida, foi realizado o “spot test” em placas de Petri, em duplicata, nas concentrações de 10^6 cel/mL, 10^5 cel/mL, 10^4 cel/mL e 10^3 cel/mL, sobre agar YPD contendo fluconazol em concentração acima do CIM encontrado para a mesma. Placas distintas foram semeadas contendo concentrações de fluconazol de até 128 mg/L. As placas foram então incubadas a 30°C por 72 h. A leitura foi realizada na concentração máxima de fluconazol que a cepa conseguiu mostrar crescimento.

A segunda fase foi de adaptação para obtenção de subpopulações altamente heteroresistentes. Para tal, foi preparado um inóculo na concentração de 10^5 cel/mL, com colônias retiradas da placa de NHF. Esse inóculo foi semeado (150 μ L) em placa de agar YPD sem fluconazol (placa controle) e em uma placa com uma concentração acima do NHF encontrado, sendo ambas incubadas a 30°C por 72h. Quando o crescimento foi obtido, um inóculo foi preparado e semeado em outra placa contendo concentração maior de fluconazol e assim sucessivamente, até placa contendo 256 mg/L. Avaliou-se, que a concentração das subpopulações altamente heteroresistentes conseguiram se adaptar.

3.6 Análise da presença de fungicidas em amostras de solo e água

As análises dos fungicidas foram realizadas em parceria com a Dra. Nádia Regina Rodrigues da Divisão de Química Analítica – Análise de resíduos da UNICAMP/CPQBA. O laboratório é atualmente certificado pelo INMETRO NIT-035 de acordo com as normas de Boas Práticas em Laboratório (BPL- 0036). Para a realização dos testes foi utilizado um cromatógrafo líquido equipado com detector de absorvância de

radiação UV SPD 10 Avp (Shimadzu, JP) e cromatógrafo gasoso equipado com espectrômetro de massas (Agilent, EUA).

Os resíduos de ciproconazol e difenoconazol foram pesquisados nas amostras de solo e água após a extração dos compostos com solução aquosa de metanol e limpeza dos extratos em filtros de papel. Os extratos obtidos foram analisados por cromatografia de fase reversa em cromatógrafo líquido equipado com detector de absorvância de radiação UV e para confirmação dos resultados os extratos foram analisados em cromatógrafo gasoso equipado com espectrômetro de massas.

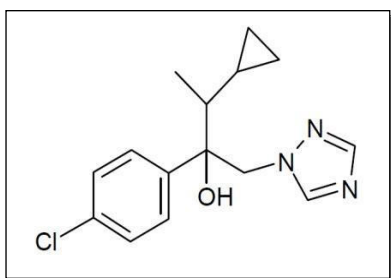
As seguintes substâncias foram avaliadas:

Nome químico: (2RS,3RS;2SR,3SR) -2- (4-clorofenil) -3-ciclopropil-1-(1H- 1,2,4-triazol-1-il) butan-2-ol CAS number: [94361-03-5]

Ciproconazol

Pressão de vapor: 2×10^{-5} Pa

Fórmula estrutural:



Peso Molecular: 291,8 g mol⁻¹

Número do Lote: CZ510275

Prazo de Validade: 05/09/2015

Pureza 99,3%

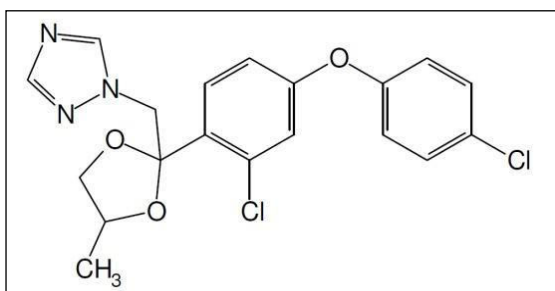
Origem: Du Pont

Nome químico: 1-[2-[2-cloro-4-(4-cloro-fenoxi)-fenil]-4-metil[1,3]dioxolan-2-ilmetil]-1H-1,2,4-triazol CAS number: [119446-68-3]

Difenoconazol

Pressão de vapor: $3,32 \times 10^{-8}$ Pa

Fórmula estrutural:



Peso Molecular: 406,3 g mol⁻¹

Número do Lote: SZBC193XV

Prazo de Validade: 11/07/2017

Pureza 97,2%

Origem: Sigma Aldrich

As amostras de água foram homogeneizadas em funil de separação seguida de filtração em papel de filtro comum. Após essa etapa, foi tomada uma alíquota de cada amostra e filtrada com filtro de 0,45µm para ser analisada por cromatografia de fase reversa em cromatógrafo líquido, equipado com detector de absorvância UV. Posteriormente, para confirmação foram analisados por cromatografia gasosa com espectrômetro de massas. As amostras de solo foram analisadas em duplicata da amostra testemunha, duplicatas das fortificações de nível baixo e alto. Os analitos foram extraídos das amostras adicionando-se 8 mL de solução metanol: água (8:2), levados para agitação a 300rpm por 20 min. Após a agitação, as amostras foram centrifugadas a 5000rpm por 5 min. e posteriormente, o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro e recolhido em uma proveta. O procedimento de extração foi realizado conforme no item descrito, anteriormente.

O segundo extrato foi colocado na mesma proveta em que foi recolhido o primeiro e o volume homogeneizado. Após esse procedimento foi retirado uma alíquota em filtro de 0,45µm. Após essa filtração foi realizada a análise por cromatografia de fase reversa em um cromatógrafo líquido, equipado com um detector de absorvância UV e posteriormente, para confirmação foi realizada a análise por cromatografia gasosa com espectrômetro de massas.

3.7 Análise estatística

Foi aplicado o teste de concordância Kappa para analisar os resultados entre identificação fenotípica, por MALDI-TOF e identificação molecular. Os valores de concentração inibitória mínima foram comparados segundo: fármaco antifúngico, fungicida de uso agrícola, de acordo com gênero e espécie da levedura e local de origem, segundo teste Fischer e de Mann-Whitney. A comparação de valores da concentração inibitória mínima de leveduras expostas a fungicidas e de leveduras não-expostas a fungicidas foi realizada pelo teste de Spearman.

4. RESULTADOS

No período de 2012 e 2014 foram realizadas 12 coletas nas hortas A e B, perfazendo total de 72 amostras ambientais. A previsão de coleta de água de lavagem não pode ser atendida na horta orgânica, visto que, em 10 dias de coleta a água para tal fim havia sido desprezada. Desse modo, foram coletadas 12 amostras de solo da horta com fungicida e 12 da horta orgânica, 12 amostras de água de irrigação da horta com fungicida, 12 da horta orgânica e, ainda, 12 amostras de água de lavagem da horta com fungicida e 2 da horta orgânica.

Para efeito de cálculo de frequência, foram analisadas todas as colônias com características de leveduras melanizadas desenvolvidas em uma única placa. As placas inoculadas com cada amostra (5 para solo, 10 para água de lavagem e 10 para água de irrigação) inoculada com amostra ambiental. As identificações foram realizadas em todas as colônias, tanto pela morfologia, quanto bioquímica e MALDI-TOF. Para este estudo foi compilado resultado referente a uma cepa representativa da espécie, isolada de cada amostra ambiental coletada.

Leveduras negras

Para as leveduras negras foram obtidos 9 isolados sendo 4 (45%) provenientes do solo, 3 (35%) de água de irrigação e 2 de água de lavagem (20%), em várias espécies (Tabela 3). As cepas isoladas da horta com fungicida foram 8 (88,8%) e da horta orgânica 1 (11,1%) (Tabela 4). Para a identificação das leveduras negras a primeira triagem foi feita no CHROMagar *Candida*® (bioMérieux, Fr) e em seguida realizada a análise microscópica. No sequenciamento foram obtidos os seguintes gêneros, conforme Tabela 5: *Aureobasidium* (4/9; 44,44%), *Exophiala* (3/9; 33,33%), *Cladosporium* (1/9; 11,11%) e *Cladophialophora* (1/9; 11,11%). As espécies encontradas foram: *Aureobasidium pullulans* (n=3 isolados), *Exophiala*

spinifera (n=2), *Cladosporium cladosporioides*, *Aureobasidium leucospermi*, *Cladophialophora arxii* e *Exophiala phaeomuriformis* (n=1, cada).

Quanto aos testes de sensibilidade, 4 cepas não foram avaliadas, devido a problemas no crescimento e esporulação. As cepas sem crescimento foram as seguintes: *Cladosporium cladosporioides* (JPTAI1), *Aureobasidium pullulans* complexo (JPTAI3), *Exophiala spinifera* (JPTAL4), *Aureobasidium leucospermi* (JPTAL5).

Não foi possível a realização de análise estatística na comparação das metodologias empregadas na identificação, devido ao número baixo de isolados identificados por provas fenotípicas e pelo MALDI-TOF.

Tabela 3. Isolados de leveduras negras, segundo tipo de amostra ambiental. (Hortas, Município de Rio Claro, 2012-2014)

Identificação	Espécie	Água	
		Solo irrigação	lavagem
JPTAI1	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	x	
JPTAI2	<i>Aureobasidium pullulans</i>	x	
JPTAI3	<i>Aureobasidium pullulans</i>	x	
JPTAL4	<i>Exophiala spinifera</i>		x
JPTAL5	<i>Aureobasidium leucospermi</i>		x
JPTS6	<i>Aureobasidium pullulans</i>	x	
JPTS7	<i>Cladophialophora arxii</i>	x	
JPTS8	<i>Exophiala spinifera</i>	x	
JPTS9	<i>Exophiala phaeomuriformis</i>	x	

Tabela 4. Isolados de leveduras negras, segundo tipo de horta coletada (município de Rio Claro, 2012-2014)

	Isolado	Horta orgânica	Horta com fungicida
JPTAI1	<i>Cladosporium cladosporioides</i>		x
JPTAI2	<i>Aureobasidium pullulans</i>		x
JPTAI3	<i>Aureobasidium pullulans</i>	x	
JPTAL4	<i>Exophiala spinifera</i>		x
JPTAL5	<i>Aureobasidium leucospermi</i>		x
JPTS6	<i>Aureobasidium pullulans</i>		x
JPTS7	<i>Cladophialophora arxii</i>		x
JPTS8	<i>Exophiala spinifera</i>		x
JPTS9	<i>Exophiala phaeomuriformis</i>		x

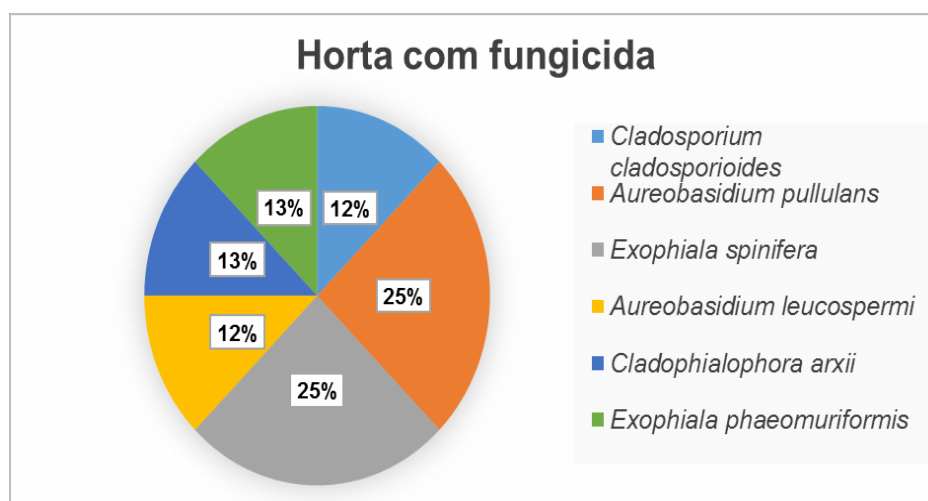


Figura 18. Distribuição de espécies de leveduras negras, na horta A.



Figura 19. Distribuição de espécies de leveduras negras, na horta B.

Tabela 5. Identificação, segundo método empregado, de 9 cepas de *Black Yeast Fungi*, isoladas de amostras água e solo (Hortas Município de Rio Claro, 2012-2014).

Isolado	Identificação morfológica	MALDI-TOF	Sequenciamento
JPTA11	Sugestivo de <i>Exophiala</i> spp.	NI	<i>Cladosporium cladosporioides</i> complexo
JPTA12	Sugestivo de <i>Exophiala</i> spp.	NI	<i>Aureobasidium pullulans</i> complexo
JPTA13	Sugestivo de <i>Exophiala</i> spp.	NI	<i>Aureobasidium pullulans</i> complexo
JPTAL4	Sugestivo de <i>Exophiala</i> spp.	NI	<i>Exophiala spinifera</i>
JPTAL5	Sugestivo de <i>Exophiala</i> spp.	NI	<i>Aureobasidium leucospermi</i>
JPTS6	Sugestivo de <i>Exophiala</i> spp.	NI	<i>Aureobasidium pullulans</i>
JPTS7	Sugestivo de <i>Exophiala</i> spp.	NI	<i>Cladophialophora arxii</i>
JPTS8	Sugestivo de <i>Exophiala</i> spp.	NI	<i>Exophiala spinifera</i>
JPTS9	Sugestivo de <i>Exophiala</i> spp.	NI	<i>Exophiala phaeomuriformis</i>

NI: não identificado

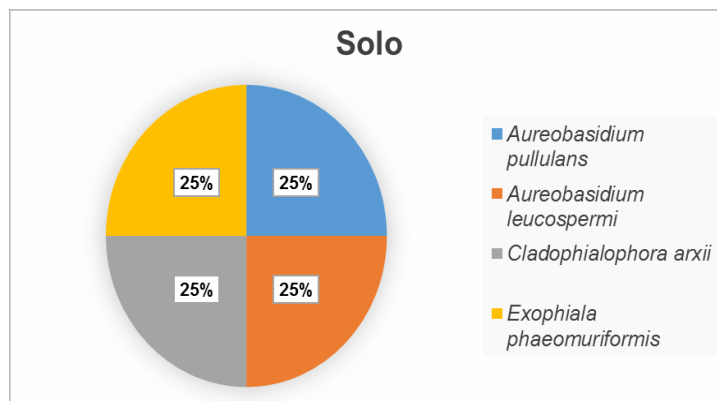


Figura 20. Distribuição das espécies de leveduras negras, isoladas do solo.

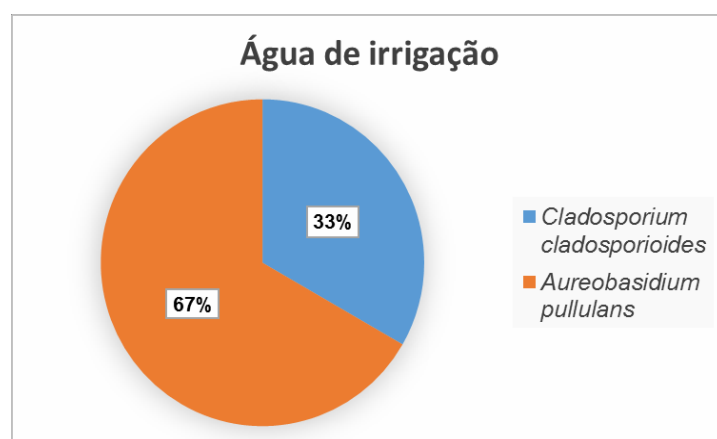


Figura 21. Distribuição das espécies de leveduras negras, isoladas de água de irrigação.

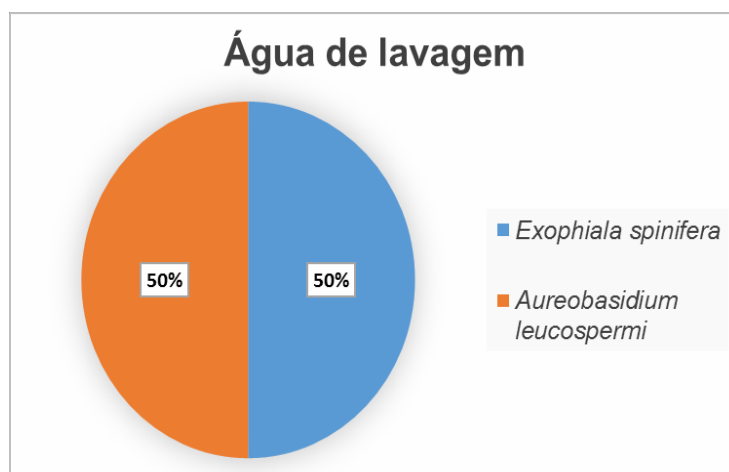


Figura 22. Distribuição das espécies de leveduras negras, isoladas de água de lavagem.

Tabela 6. Concentração Inibitória Mínima (mg/L) de antifúngicos de uso clínico e fungicidas azólicos frente a cepas de leveduras negras isoladas de amostras de água e solo (Hortas, Município de Rio Claro, 2012-2014).

Espécie (Isolado)	Fluconazol	Itraconazol	Voriconazol	Difenoconazol	Ciproconazol	Ravuconazol
<i>Cladosporium cladosporioides</i> complexo (JPTAI1)				NR		
<i>Aureobasidium pullulans</i> complexo (JPTAI2)	4	0,015	0,03	0,015	0,5	0,015
<i>Aureobasidium pullulans</i> complexo (JPTAI3)				NR		
<i>Exophiala spinifera</i> (JPTAL4)				NR		
<i>Aureobasidium leucospermi</i> (JPTAL5)				NR		
<i>Aureobasidium pullulans</i> complexo (JPTS6)	4	0,03	0,12	0,015	0,5	0,015
<i>Cladophialophora arxii</i> (JPTS7)	>64	0,25	4	8	8	0,015
<i>Exophiala spinifera</i> (JPTS8)	32	0,03	0,25	0,25	1	0,06
<i>Exophiala phaeomuriformis</i> (JPTS9)	2	0,03	0,015	0,03	0,015	0,015

*NR – Não realizado

Gênero *Cryptococcus*

Para o gênero *Cryptococcus* foram isoladas 16 cepas, sendo: 8 (50%) provenientes de solo, 4 (25%) de água de irrigação e outras 4 (25%) de água de lavagem. Todos os isolamentos de amostras de água de lavagem foram da horta com fungicida, em relação com maior número de amostras coletadas. Das 12 coletas realizadas, 3 (25%) possibilitaram isolamento de leveduras melanizadas. Verificou-se crescimento de duas espécies distintas a partir de mesmo material amostrado.

C. albidus foi a espécie para a qual foram observados maior número de resultados concordantes (3/4; 75%) em todos os métodos de identificação empregados.

Na tabela 8, encontra-se a distribuição dos isolados do gênero *Cryptococcus* relacionados ao tipo de horta, sendo que 10 (62,50%) são pertencentes à horta com fungicida e 6 (37,50%) a horta orgânica.

Foram identificadas inicialmente e de modo presuntivo as seguintes espécies: *C. neoformans*, *C. laurentii*, *C. albidus*, *C. flavescens* e *C. magnus*. A cepa de *C. neoformans* foi isolada de amostra de solo. A espécie *C. laurentii* (7/16; 43,8%) foi a mais frequente. A tabela 7 mostra a frequência de espécies de *Cryptococcus* identificadas, segundo o tipo de amostra ambiental.

Tabela 7. Isolados do gênero *Cryptococcus*, segundo tipo de amostra ambiental (hortas, município de Rio Claro, 2012-2014).

Isolado	Identificação*	Solo	Água de irrigação	Água de lavagem
JPT 08	<i>C. terrestris</i>	x		
JPT 10	<i>C. albidus</i>	x		
JPT16	<i>C. albidus</i>	x		
JPT32*	<i>C. laurentii</i>	x		
JPT153*	<i>C. laurentii</i>	x		
JPT112*	<i>C. flavescens</i>	x		
JPT 01	<i>C. neoformans</i>	x		
JPT17	<i>C. albidus</i>	x		
JPT04	<i>C. laurentii</i>		x	
JPT23	<i>C. laurentii</i>			x
JPT114*	<i>C. flavescens</i>			x
JPT115*	<i>C. magnus</i>			x
JPT116*	<i>Cryptococcus sp.</i>		x	
JPT117*	<i>C. magnus</i>			x
JPT118*	<i>Cryptococcus sp.</i>		x	
JPT119*	<i>C. magnus</i>		x	

A identificação das cepas do gênero *Cryptococcus* foi realizada após purificação e triagem realizada em ágar cromogênico (CHROMagar *Candida*®) indicativas do gênero *Cryptococcus*. Todas as culturas apresentaram-se com coloração arroxeadas e aspecto mucóides. As colônias suspeitas foram observadas em microscópio óptico pela técnica de tinta da

China, observando-se presença de cápsula em todas as cepas.

Todas as culturas foram analisadas por MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Ge), em duplicata, após extração direta com ácido fórmico a 70%. Segundo o método de MALDI-TOF não foi possível a identificação de 3 isolados (18,75%) do gênero *Cryptococcus* (Tabela 9) e, portanto, as amostras foram identificadas, presuntivamente, pelo sistema API 20C®.

Na avaliação da análise estatística, o resultado do teste Kappa foi de 0,484 com $p < 0,001$, mostrando que as 3 metodologias, fenotípica, MALDI-TOF e sequenciamento, têm concordância moderada entre si, segundo interpretação do teste.

A cepa de *C. neoformans* foi identificada em todos os métodos. O método de PCR-RFLP permitiu a classificação do tipo molecular em VNI. O tipo conjugante (*mating type*) foi identificado como alfa. Para essa cepa foi realizado três testes adicionais: CIM de anfotericina B, resultando em 0,5 mg/L, curva de morte que indicou ação fungicida do polieno às 6 h de exposição e heteroresistência ao fluconazol em nível de 64 mg/L, adaptando-se até 128 mg/L.

Tabela 8. Isolados de *Cryptococcus*, segundo o tipo de horta (Rio Claro, 2012-2014)

Isolado	Horta orgânica	Horta com fungicida
<i>C.neoformans</i> (JPT01)		x
<i>C.laurentii</i> (JPT04)	x	
<i>C.terrestris</i> (JPT08)		x
<i>C.albidus</i> (JPT10)	x	
<i>C.albidus</i> (JPT16)		x
<i>C.albidus</i> (JPT17)	x	
<i>C.laurentii</i> (JPT23)		x
<i>C.laurentii</i> (JPT32)		x
<i>C.laurentii</i> (JPT153)		x
<i>C.flavescens</i> (JPT112)	x	
<i>C.flavescens</i> (JPT114)		x
<i>C.magnus</i> (JPT115)	x	
<i>Cryptococcus sp.</i> (JPT116)		x
<i>C.magnus</i> (JPT117)		x
<i>Cryptococcus sp.</i> (JPT118)	x	
<i>C.magnus</i> (JPT119)		x

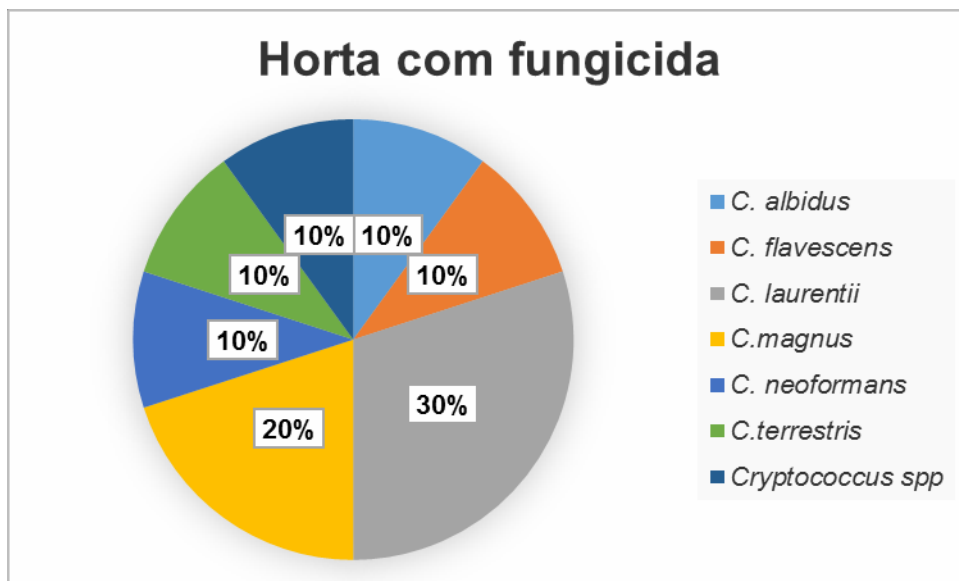


Figura 23. Distribuição das espécies de *Cryptococcus spp.*, na horta A.

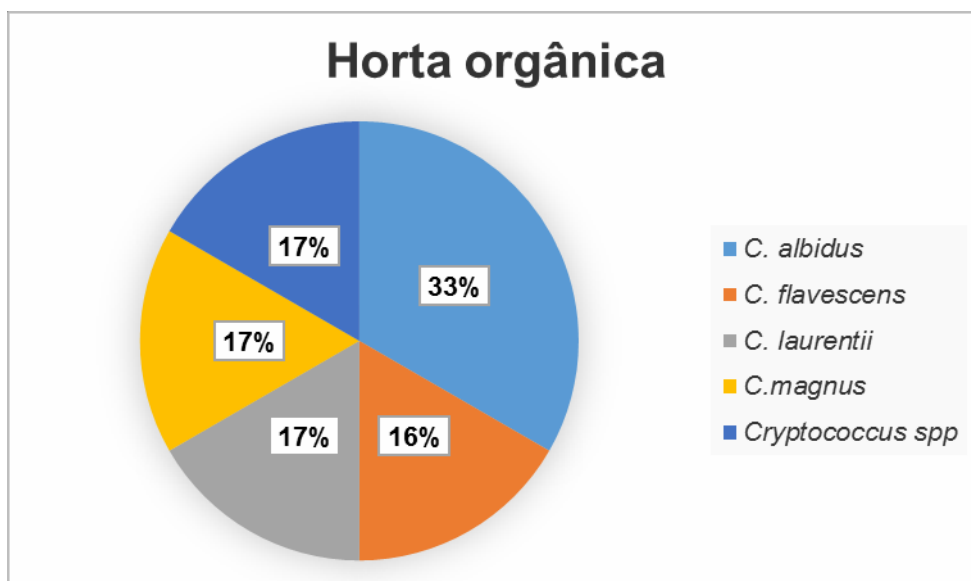


Figura 24. Distribuição das espécies de *Cryptococcus spp.*, em relação a horta B.

Tabela 9. Resultados de identificação, segundo método empregado, de 16 cepas de *Cryptococcus* spp. isoladas de amostras água e solo (Hortas, Município de Rio Claro, 2012-2014).

Isolado	API 20C aux®	MALDI-TOF	Sequenciamento
JPT01	<i>C. neoformans</i>	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	<i>C. neoformans</i> (VNI, mating type alfa)
JPT 04	<i>C. laurentii</i>	<i>C. laurentii</i>	<i>C. laurentii</i>
JPT 08	<i>C. laurentii</i>	<i>C. flavescens</i>	<i>C. terrestris</i>
JPT 10	<i>C. albidus</i>	<i>C. albidus</i>	<i>C. albidus</i>
JPT16	<i>C. albidus</i>	<i>C. albidus</i>	<i>C. albidus</i>
JPT17	<i>C. albidus</i>	<i>C. albidus</i>	<i>C. albidus</i>
JPT23	<i>C. laurentii</i>	<i>C. laurentii</i>	<i>C. laurentii</i>
JPT32	<i>C. laurentii</i>	<i>C. laurentii</i>	<i>C. laurentii</i>
JPT153	<i>C. laurentii</i>	<i>C. laurentii</i>	<i>C. laurentii</i>
JPT112	NI	<i>C. flavescens</i>	<i>C. flavescens</i>
JPT114	NI	<i>C. flavescens</i>	<i>C. flavescens</i>
JPT115	NI	<i>C. magnus</i>	<i>C. magnus</i>
JPT116	<i>C. albidus</i>	NI	<i>Cryptococcus</i> spp.
JPT117	NI	<i>C. magnus</i>	NI
JPT118	<i>C. laurentii</i>	NI	<i>Cryptococcus</i> spp.
JPT119	<i>C. laurentii</i>	NI	<i>C. magnus</i>

NI, não identificado; var., variedade

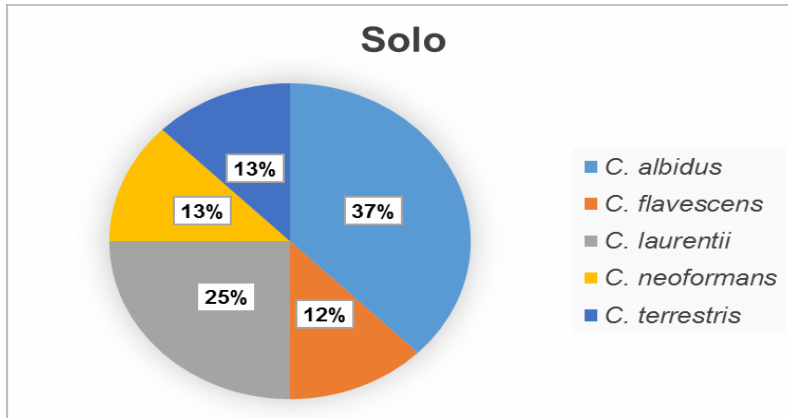


Figura 25. Distribuição das espécies de *Cryptococcus* spp. isolados do solo.

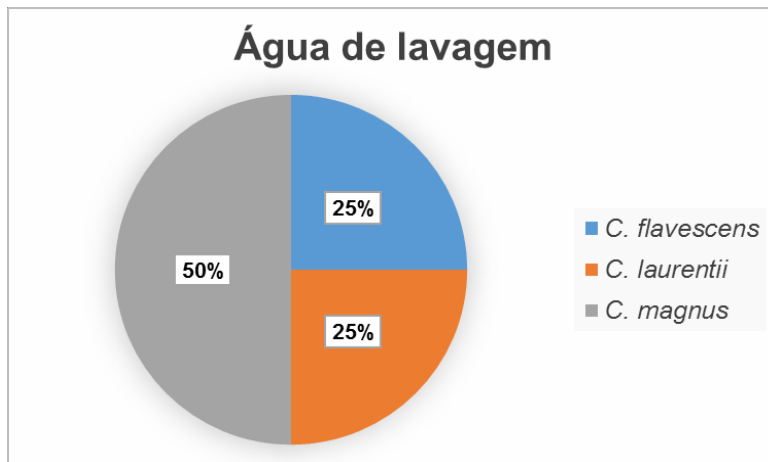


Figura 26. Distribuição das espécies de *Cryptococcus* spp. isolados da água de lavagem.

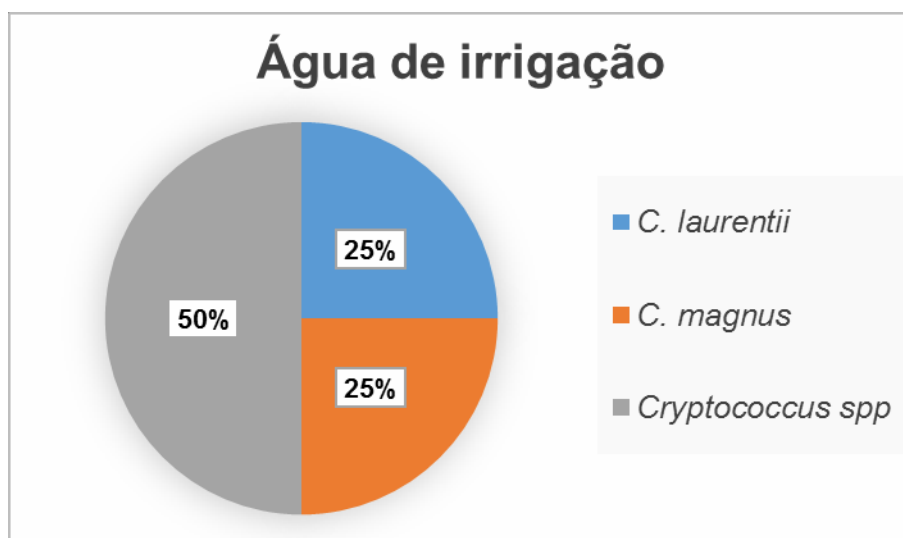


Figura 27. Distribuição das espécies de *Cryptococcus* spp. isolados da água de irrigação.

Tabela 10. Score do MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Ge) na identificação dos isolados de *Cryptococcus* spp.

Isolado	Identificação	Score
JPT01	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>	2.148
JPT04	<i>Cryptococcus laurentii</i>	2.180
JPT08	<i>Cryptococcus flavescens</i>	1.784
JPT10	<i>Cryptococcus albidus</i>	1.902
JPT16	<i>Cryptococcus albidus</i>	2.049
JPT17	<i>Cryptococcus albidus</i>	2.003
JPT23	<i>Cryptococcus laurentii</i>	2.025
JPT32	<i>Cryptococcus laurentii</i>	2.194
JPT153	<i>Cryptococcus laurentii</i>	1.917
JPT112	<i>Cryptococcus magnus</i>	2.164
JPT114	<i>Cryptococcus flavescens</i>	1.865
JPT115	<i>Cryptococcus magnus</i>	1.834
JPT117	<i>Cryptococcus magnus</i>	1.790

Os testes de sensibilidade foram realizados, somente, para 10 cepas de *Cryptococcus* spp., pois ocorreu falta de crescimento em meios de cultura, indicando inviabilidade de 6 cepas que não puderam ser recuperadas após seu congelamento (-20°C), em leite desnatado 10% com glutamato de sódio 5%. Estas cepas foram: *C. magnus* (JPT 115, 117 e 119), *Cryptococcus* spp. (JPT 116 e 118).

Os testes foram realizados em duplicata, tanto para os fungicidas azólicos (ciproconazol e difenoconazol), quanto para os antifúngicos clínicos (fluconazol, itraconazol, voriconazol), sendo que para os fungicidas agrícolas foi realizada uma avaliação sistemática de CIM frente às cepas ATCCs preconizadas pela metodologia do CLSI. Esse procedimento, realizado 8 vezes em dias seguidos, serviu para avaliar a estabilidade dos fungicidas e para determinar o valor de CIM de cada composto de modo a comprovar a reprodutibilidade do ensaio (tabelas 11 e 12).

Os dados da sensibilidade das 10 cepas de *Cryptococcus* e cepas-padrão frente aos fármacos e fungicidas azólicos, constam da Tabela 12.

Pontos de corte clínicos, para interpretação dos valores de CIM de qualquer fármaco frente a isolados do gênero *Cryptococcus* ainda não estão definidos, sendo utilizado apenas o ECV, para as espécies *C. neoformans* e *C. gattii*.

Foi realizada a análise estatística por diferentes testes para a avaliação de possível resistência cruzada entre fármacos ou entre fungicidas. O teste de Fischer ($p=1,0$) e Mann-Whitney não demonstraram significância estatística. O teste de Spearman apontou que as correlações entre os compostos ciproconazol e difenoconazol, assim como, ciproconazol e voriconazol foram, estatisticamente, significantes.

Tabela 11. Concentração inibitória mínima (mg/L) de fungicidas azólicos frente à cepa-padrão *Candida parapsilosis* ATCC 22019, método M27-A3 (CLSI, 2012).

CIM (mg/mL)	
Difenoconazol	Ciproconazol
0,12	0,03
0,06	0,06
0,12	0,03
0,06	0,06
4	1
0,25	0,03
0,25	0,015
0,5	0,12

Tabela 12. Concentração Inibitória Mínima (mg/L) de fungicidas azólicos frente à cepa-padrão *Candida krusei* ATCC 6258, método de M27-A3 (CLSI, 2012).

CIM (mg/mL)	
Difenoconazol	Ciproconazol
0,03	0,5
0,03	0,03
0,03	0,03
0,03	0,5
0,5	0,12
0,12	0,5
0,5	0,5
2	1

Tabela 13. Concentração Inibitória Mínima (mg/L) de antifúngicos de uso clínico e fungicidas azólicos frente a cepas de *Cryptococcus* spp. isoladas de amostras de água e solo (Hortas, Município de Rio Claro, 2012-2014).

Espécies	Fluconazol	Itraconazol	Voriconazol	Difenoconazol	Ciproconazol	Ravuconazol
<i>C. neoformans</i> (JPT01)	32	0,12	0,03	0,12	0,06	0,03
<i>C. terrestris</i> (JPT08)	16	0,5	0,5	2	1	0,12
<i>C. albidus</i> (JPT10)	0,5	0,015	0,03	0,03	0,015	0,015
<i>C. albidus</i> (JPT16)	8	0,25	0,12	8	0,25	0,12
<i>C. albidus</i> (JPT17)	4	0,25	0,25	8	1	0,06
<i>C. laurentii</i> (JPT04)	8	0,25	0,25	1	0,5	0,25
<i>C. laurentii</i> (JPT23)	4	0,5	0,015	1	0,06	0,25
<i>C. laurentii</i> (JPT32)	0,5	0,5	0,12	1	0,015	0,5
<i>C. laurentii</i> (JPT153)	2	0,5	0,25	2	1	0,25
<i>C. flavescens</i> (JPT114)	8	0,25	0,25	1	0,5	0,015
<i>C. flavescens</i> (JPT112)			SC			
<i>C. magnus</i> (JPT115)			SC			
<i>C. magnus</i> (JPT117)			SC			
<i>C. magnus</i> (JPT119)			SC			
<i>Cryptococcus</i> spp. (JPT116)	NR	NR	NR	NR	NR	NR
<i>Cryptococcus</i> spp. (JPT118)	NR	NR	NR	NR	NR	NR

SC, sem crescimento; NR, não realizado

Resultados da análise de fungicida nas amostras ambientais

Os dados de resíduos foram calculados por regressão linear de curva de calibração obtida com soluções dos padrões dos analitos *versus* a resposta em área de pico obtida no cromatógrafo. A curva foi construída com 5 níveis de concentração. Na obtenção da curva de calibração cada solução padrão foi injetada em duplicata para as amostras de solo e uma vez para as amostras de água. Para o intervalo de concentrações utilizado a resposta do equipamento é linear, obedecendo a equação $y = b + mx$.

As constantes b (intersecção) e m (coeficiente de regressão) podem se encontradas através da regressão linear no intervalo observado.

x é a concentração do composto em parâmetros constantes de HPLC

y é a resposta do cromatógrafo

Na determinação analítica os extratos foram intercalados com as soluções padrão durante a corrida. Foi aplicado o método estatístico teste de hipótese (teste – F) na análise de dados segundo PTMDR-11.

A quantidade em mg kg⁻¹ dos analitos nas amostras é então calculada da seguinte forma:

$$mg / kg encontrado = \frac{(x \text{ em } \mu g / mL) \cdot (vol. final \text{ em } mL) \cdot (f. dil.)}{(f. a.)}$$

$$\text{onde: } x = \frac{y - b}{m}$$

Fonte: Collins et al., 1997.

vol. final = volume no qual são dissolvidas as amostras antes da análise cromatográfica (mL)

f.a. = fator da amostra, refere-se à massa de matriz correspondente à alíquota de extrato tomado para a análise

f. dil.= fator de diluição do extrato final da amostra

$$f.a.=\frac{(volumeda\ aliquota\ de\ extrato,\ mL).(p.a.,\ g)}{(volumedo\ extrato,\ mL)}$$

Fonte: Collins et al., 1997.

p.a. = massa da amostra de matriz tomada para análise, em grama.

Em amostras fortificadas a porcentagem de recuperação é calculada da seguinte forma:

$$\%de\ recupera\c{a}\o = \frac{mg / kg\ encontrado .100}{mg / kg\ adicionado}$$

Fonte: Collins et al., 1997.

Na amostra testemunha foi observada a presença de interferentes nos tempos de retenção dos analitos, portanto o limite de quantificação para o ambos analitos é de 0,2 mg kg⁻¹.

Tabela 14. Identificação das amostras enviadas para análise de fungicidas por HPLC e cromatografia gasosa.

Identificação da amostra	Matriz	Massa recebida
Água de irrigação Horta Botacin 2	Água	0,400kg
Água de Irrigação Horta Botacin 3	Água	0,400kg
Água de Irrigação Horta Orgânica 2	Água	0,386kg
Água de Irrigação Horta Orgânica 3	Água	0,375kg
Água de Lavagem Horta Botacin 2	Água	0,400kg
Água de Lavagem Horta Botacin 3	Água	0,400kg
Água de Lavagem Horta Orgânica Nabo 2	Água	0,396kg
Água de Lavagem Horta Orgânica Nabo 3	Água	0,352kg
Solo Horta Botacin Cebolinha Sem Agrotóxico	Solo	2,637kg
Solo Horta Botacin Cebolinha 1	Solo	0,215kg
Solo Horta Botacin Cebolinha 2	Solo	0,163kg
Solo Horta Botacin Cebolinha 3	Solo	0,179kg
Solo Horta Orgânica Cebolinha 1	Solo	0,216kg
Solo Horta Orgânica Cebolinha 2	Solo	0,216kg
Solo Horta Orgânica Cebolinha 3	Solo	0,217kg
Solo Horta Orgânica Beterraba	Solo	1,699kg

Tabela 15. Análise das amostras ambientais para ciproconazol (mg kg^{-1}) e difenoconazol (mg kg^{-1}) em HPLC e cromatografia gasosa

Identificação	Ciproconazol (mg kg^{-1})	Difenoconazol (mg kg^{-1})
Água de irrigação Horta Botacin 2	ND	ND
Água de Irrigação Horta Botacin 3	ND	ND
Água de Irrigação Horta Orgânica 2	ND	ND
Água de Irrigação Horta Orgânica 3	ND	ND
Água de Lavagem Horta Botacin 2	ND	ND
Água de Lavagem Horta Botacin 3	ND	ND
Água de Lavagem Horta Orgânica Nabo 2	ND	ND
Água de Lavagem Horta Orgânica Nabo 3	ND	ND
Solo Horta Botacin Cebolinha Sem Agrotóxico	ND	ND
Solo Horta Botacin Cebolinha 1	ND	ND
Solo Horta Botacin Cebolinha 2	ND	ND
Solo Horta Botacin Cebolinha 3	ND	ND
Solo Horta Orgânica Cebolinha 1	ND	ND
Solo Horta Orgânica Cebolinha 2	ND	ND
Solo Horta Orgânica Cebolinha 3	ND	ND
Solo Horta Orgânica Beterraba	ND	ND

ND = Não detectado

5. DISCUSSÃO

Os fungicidas são parte essencial dos manejos agrícolas para melhor rendimento nas plantações. Fungicidas azólicos são amplamente usados no Brasil para proteção das plantações, inibindo contaminação das colheitas e prevenindo a disseminação de fitopatógenos na produção agrícola. O aumento do uso de fungicidas na agricultura causa a contaminação do solo com produtos químicos.

Quando os agrotóxicos são aplicados existe a possibilidade dos princípios ativos exercerem alguns efeitos em organismos não alvos presentes no solo, inclusive em micro-organismos (Wardle e Parkinson, 1990). A biomassa microbiana tem um importante papel no ecossistema do solo, como na ciclagem de nutrientes e decomposição (de Lorenzo et al., 2001). Nesse contexto, as leveduras são importantes membros de vários ecossistemas e contribuem de forma significativa para a biodiversidade (Fleet, 1998). A ação dos agrotóxicos em organismos não alvos, como leveduras melanizadas, tem sido preocupação há muitos anos devido à natureza, biologicamente, ativa dos compostos. Esses efeitos podem resultar em toxicidade direta do composto ou impacto indireto, provocado pela remoção e/ou aumento da proliferação de distintas espécies.

Até o momento, o maior enfoque em micologia sobre a resistência cruzada em relação aos azólicos é com gênero *Aspergillus*. Snelders e colaboradores (2009) isolaram *Aspergillus fumigatus* de ambiente hospitalar e de pacientes com aspergilose invasiva. Para comparação dos isolados fúngicos, foram realizados testes de sensibilidade, investigação dos mecanismos de resistência e testes moleculares de identificação. Os mesmos apresentaram resistência cruzada para: voriconazol, posaconazol, metconazol e tebuconazol. Os testes de mecanismos de resistência foram positivos e em alguns isolados ficaram, geneticamente, agrupados demonstrando que os pacientes podem ter sido colonizados com isolados do meio ambiente. Seguindo o mesmo padrão de estudo, Mortensen e colaboradores (2010) realizaram estudos em vários países da Europa, como Áustria, Dinamarca e Espanha, identificando gene de resistência e testando itraconazol, voriconazol e posaconazol, para *Aspergillus* spp. Nos três países foi observado o mecanismo intrínseco de

resistência nos isolados de *Aspergillus* coletados do ambiente. Em várias espécies de *Aspergillus* foi comprovado que as cepas isoladas de solo não contaminado por fungicidas não foram resistentes a estes compostos. Nas cepas ambientais expostas, porém, foram observados mecanismos de resistência idênticos aos encontrados em isolados clínicos e esses isolados formavam um grupo genético diferente daqueles não resistentes (Snelders et al., 2009).

Neste estudo, isolou-se e identificou-se por métodos fenotípicos e moleculares espécies de leveduras ambientais melanizadas (*Cryptococcus* spp. e BYFs) de áreas expostas e não expostas a fungicidas azólicos, com o objetivo de verificar a existência de espécies associadas, ou não, às infecções humanas e seu perfil de sensibilidade a compostos azólicos. O isolamento de BYFs a partir de água (n=5) e solo se deu de forma quase similar (n=4), com maior frequência de isolamento na horta com uso de fungicidas, do que na horta orgânica. Este fato pode ser devido a menor profusão de fungos filamentosos em amostras da horta pulverizada ou, ainda, pelas características diferenciadas do solo e de umidade, variáveis não controladas neste estudo. A umidade do solo é considerada fator de extrema importância para os fungos do meio ambiente que pode ter sido crucial para maior isolamento de BYF na horta com fungicida destinada ao cultivo comercial de hortaliças, tendo solo, aparentemente, mais úmido e com maior número de hortaliças semeadas. De outro modo, a horta orgânica tem solo mais seco, com escassez na rotatividade de cultivos e dois grandes períodos sem cultivo (meses de férias da escola agrícola), pois a mesma é utilizada somente para fins educacionais.

Para identificação de BYF, a presença de conídios, seu tamanho, inserção e posição nos conidióforos foram aspectos analisados e interpretados segundo bibliografia de referência (de Hoog et al., 2000).

Segundo a identificação presuntiva, com base na análise morfológica, todos os isolados foram de modo presuntivo, indicados como pertencentes ao gênero *Exophiala*.

Pelo método de MALDI-TOF não foi possível concluir a identificação de nenhum isolado de levedura negra. Desde que, o banco de dados do equipamento empregado nessa análise contempla somente alguns dos gêneros

sequenciados a falta de resultados satisfatórios na identificação dos isolados é indicativo de pouca sensibilidade do método. O número de espectros, referentes a distintas cepas, inseridos no banco de dados é, de fato, um fator decisivo para o desempenho do método. Ozhak-Baysan et al. (2015) realizaram um estudo com 110 isolados do gênero *Exophiala* para a identificação da espécie no aparelho de MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Ge). A taxa de identificação para as espécies de *Exophiala* foram as seguintes: *E. dermatitidis* (100%), *E. heteromorfa* (100%), *E. phaeomuriformis* (80,6%) e *E. crusticola* (50%). O MALDI-TOF, no entanto, é em relação a outros gêneros de fungos um método com bom desempenho e devem ser citados trabalhos relevantes como o publicado por Neuhof et al. (2007) que avaliaram o gênero *Trichoderma*, Marinach-Patrice et al. (2009) que utilizaram a plataforma para identificação do gênero *Fusarium* e Santos et al. (2010) e Iriart et al. (2012) que, em estudos independentes, observaram o bom desempenho do aparelho para fungos filamentosos e leveduras. Os resultados foram variados, mas de modo geral, podem ser considerados bons; porém, as altas taxas na identificação de algumas espécies, possivelmente, se devem ao uso de um banco de dados customizado, construído “*in house*” para uso próprio e alimentado com espectros do próprio usuário.

A identificação molecular permitiu a correta classificação das cepas. A discrepância na identificação morfológica presuntiva e no sequenciamento se deve ao fato de que a taxonomia das leveduras negras é, extremamente, complexa sendo de difícil análise, principalmente, pela dificuldade na visualização de estruturas morfológicas que permitem a identificação dos gêneros em questão.

A relevância do encontro de BYFs em solo e água de hortas e sua contribuição para a descrição da ecologia desse grupo de fungos, pode ser medida pela patogenicidade de alguns de seus membros. Entre os gêneros de BYFs encontrados neste estudo, a importância clínica é, significativamente, distinta, bem como, a sensibilidade aos diversos antifúngicos, como descritos a seguir.

O gênero mais frequentemente encontrado nas hortas estudadas, o *Aureobasidium* spp. é considerado saprófita, sendo encontrado em vários

ambientes como água poluída (Vadkertiova e Slavikova, 1995), poeira doméstica (Arvanitidou et al., 1999), entre outros. Também pode ser considerado como contaminante de laboratório quando encontrado em amostras biológicas, ainda que, consiga causar infecções em humanos. As infecções por esse gênero são oportunistas e a espécie mais comumente encontrada é *Aureobasidium pullulans*, apesar de outras espécies terem sido descritas, como *A. proteae* (de Hoog et al., 2000; Kutlesa et al., 2012). A maior parte das infecções, como queratite e lesões cutâneas, ocorre por inoculação traumática. A forma disseminada é rara e ocorre apenas em pacientes imunodeprimidos (Arranz et al., 2006; Panda et al., 2006; Mise et al., 2008; Pikazis et al., 2009; Chawla et al., 2010; Joshi et al., 2010; Mershon-Shier et al., 2011). A espécie *A. pullulans* tem grande afinidade por materiais sintéticos e implantes cirúrgicos, sendo observado seu isolamento a partir de amostras de cateter de diálise peritoneal e cateter venoso central (Clark et al., 1995; Caporale et al., 1996; Hawkes et al., 2005; Mise et al., 2008).

Najafzadeh et al. (2014), no maior estudo do gênero, avaliaram sensibilidade *in vitro* de 104 isolados, clínicos e ambientais, de *A. pullulans* var. *pullulans* e *A. pullulans* var. *melanigenum* para anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, isavuconazol, caspofungina e micafungina. Os intervalos de CIM para o gênero foram: anfotericina B $\leq 0,016$ mg/L a 16 mg/L, fluconazol 4 mg/L a ≥ 64 mg/mL, itraconazol $\leq 0,016$ mg/L a 16 mg/L, voriconazol $\leq 0,016$ mg/L a 16 mg/L. A atividade antifúngica contra *A. pullulans*, portanto, ainda que variável aponta

resistência a fluconazol e CIMs elevadas para voriconazol. Para outros antifúngicos, como itraconazol, a espécie apresenta maior sensibilidade (Najafzadeh et al., 2014). Todos esses dados são compatíveis com os aqui descritos para cepas ambientais isoladas de solo e água.

O gênero *Cladophialophora* pode ser, comumente, encontrado em detritos de plantas ou associados a elas, sendo, predominantemente, sapróbio (de Hoog et al., 2007). Membros deste gênero estão envolvidos em ampla variedade de infecções sendo descritos desde micose cutânea leve até encefalite fatal (Ho et al., 1999; de Hoog et al., 2000). A espécie *C. bantiana*, um importante fungo neurotrópico, foi alvo de mais de 100 relatos de infecção em indivíduos,

aparentemente, saudáveis na literatura consultada. Outra espécie de importância médica é *C. carrionii*, prevalente agente de cromoblastomicose em climas secos e desérticos (Mendoza et al. 1993; Jayakeerthi et al. 2004; Ameen 2009). A espécie *C. arxii* isolada de horta exposta a fungicidas, por sua vez, é considerada um raro agente de doença disseminada (Badali et al., 2008).

O gênero *Cladosporium* é um anemófilo ubíquo e frequente; é descrito, ocasionalmente, como agente causador de phaeohifomicoses. Algumas espécies podem causar infecções micóticas em humanos, como: *C. cladosporioides*, *C. elatum*, *C. oxysporum*, *C. herbarum* e *C. sphaerospermum*. Infecções por *C. cladosporioides*, espécie isolada em água de irrigação de horta pulverizada com fungicidas, são raras e predominam em casos de micoses subcutâneas, embora infecções sistêmicas tenham sido descritas (Bentz e Sautter, 1993; de Hoog, 2000; Kantarcioglu et al., 2002).

O gênero *Exophiala*, segundo agente em frequência nas hortas alvo desta pesquisa é considerado o gênero de BYF de maior interesse médico, sendo as espécies mais implicadas em infecções humanas: *E. dermatitidis*, *E. xenobiotica*, *E. spinifera* e *E. oligosperma*; as encontradas com menos frequência são: *E. phaeomuriformis*, *E. jeanselmei*, *E. mesophila* entre outras (de Hoog et al., 2003; Zeng et al., 2007; Badali et al., 2010).

Estudo com antifúngicos indicam que *E. dermatitidis*, *E. jeanselmei*, *E. moniliae* e *E. spinifera* são sensíveis à anfotericina B, itraconazol e voriconazol (Woollons et al., 1996; Rath et al., 1997; McGinnis e Pasarell, 1998; Nucci et al., 2001; Duarte et al., 2013). A espécie rara, *E. pisciphila*, foi sensível ao itraconazol e voriconazol, porém resistente à anfotericina B (McGinnis e Pasarell, 1998). *E. dermatitidis* mostra resistência a fluconazol e 5-fluorocitosina (Rath et al., 1997; Woollons et al., 1996; McGinnis e Pasarell, 1998; de Hoog et al., 2000). Badali et al. (2010) avaliaram 9 isolados de *E. jeanselmei* e 5 de *E. oligosperma* frente a fluconazol, itraconazol e voriconazol. Os autores observaram intervalos de CIM para *E. jeanselmei*, como segue: fluconazol 8 mg/L a 32 mg/L, itraconazol 0,031 mg/L a 0,25 mg/L e voriconazol 0,25 mg/L a 2 mg/L. Para *E. oligosperma*, esses valores foram: fluconazol 16 mg/L a 32 mg/L, itraconazol 0,031 mg/L a 0,25 mg/L e voriconazol 1 mg/L a 4 mg/L. Não foi investigada a correlação entre o CIM e a resposta clínica ao tratamento, mas considerou-se itraconazol um dos fármacos elegíveis para tratamento de

infecções por tais espécies. Nosso grupo, em estudo inédito no Brasil, estudou 43 isolados das espécies *E. dermatitidis* e 4 isolados de *E. spinifera* verificando baixos valores de CIM, tanto para itraconazol, quanto para voriconazol, indicando sensibilidade similar a encontrada para as cepas deste estudo (Duarte et al., 2013). Em vista do exposto, conclui-se que as cepas de *E. phaeomuriformis* isoladas das hortas apresentaram sensibilidade compatível à relatada na literatura.

Para membros do gênero *Cryptococcus* spp. taxas de isolamento igual, em solo e água, foram obtidas neste estudo demonstrando que o fungo pode estar presente em qualquer ambiente, comprovando sua alta capacidade de adaptação, conforme descrito por Kwon-Chung (1992). Na triagem inicial das amostras ambientais o isolamento do gênero *Cryptococcus* spp. foi complexo devido ao crescimento de vários outros fungos, em especial os filamentosos, provenientes de solo e água de irrigação, sendo o solo, uma amostra reconhecidamente composta de grande riqueza de microrganismos (Bell et al., 2005).

A estratégia da utilização de meio de DRBCm foi adequada, desde que, contém o corante rosa bengala bastante efetivo na limitação do crescimento de fungos anemófilos e da presença de substratos fenólicos que facilitam a visualização de fungos que produzem pigmentos escuros, como é o caso do *Cryptococcus* spp.

A coleta de amostras de solo na parte superior do terreno foi segundo orientação de literatura. Um estudo ambiental mostrou que *C. gattii* e outros fungos colonizam, principalmente, os primeiros 15 cm do solo, devido à umidade, temperatura e nutrientes requeridos; a luz solar com ultravioleta não seria suficiente para eliminar esse agente, pois, esse fungo tem proteção aos raios UV devido à produção de melanina (Kidd et al. 2007).

O isolamento do gênero na horta com fungicida foi maior que na horta orgânica, repetindo a mesma situação do isolamento das leveduras negras, sendo provavelmente devido à umidade do solo e nutrientes da horta com fungicida. Glushakova et al. (2015), estudaram a viabilidade de leveduras provenientes de vários grupos ecológicos em prolongados armazenamentos em

liofilização. A atividade da água é um fator limitante na propagação das leveduras na natureza. Muitas espécies de leveduras são incapazes de crescer em uma atividade de água menor que 0,61 a 0,70 que são características de soluções de glicose a 55%-65% ou de NaCl 15%-25% (Deak, 2006). As distintas espécies de leveduras apresentam perfis diferentes em sua resistência ao dessecamento e sua conservação prolongada em estado liofilizado e os fatores responsáveis por essa resistência ainda não foram suficientemente estudados (Golubev 1984; 1991).

Os isolados de *Cryptococcus*, após isolamento e purificação das colônias melanizadas foram identificadas, primariamente, pelo sistema comercial destinado a espécies de interesse clínico. Interessante que cepas do complexo *C. laurentii*, raramente descrita como patógena, foi identificada pelo sistema comercial. A identificação por MALDI-TOF das cepas de *Cryptococcus* spp. foi em parte adequada, desde que, muitas espécies foram adequadamente classificadas, em particular, *C. neoformans* de maior importância clínica. Importante trabalho com MALDI-TOF e gênero *Cryptococcus* foram realizados por Firacative et al. (2013) na avaliação no desempenho da identificação de *C. neoformans* e *C. gattii*, mostrando a bom desempenho do método para identificar espécie e tipo molecular, fato comprovado recentemente por outro grupo (Hagen et al., 2015).

De modo interessante, pode-se supor que foram isoladas cepas raras, ou mesmo de espécies ainda não descritas, cujas sequências não foram reconhecidas nos bancos do GenBank e MycoBank. Convém ressaltar que no MALDI-TOF estas cepas, também, não foram identificadas. Em ambos os métodos, como já dito, é fundamental a inserção de grande número de cepas de mesma espécie para consolidação de um banco de dados confiável. Danesi et al. (2014) na identificação de outras espécies que não *C. neoformans* e não *C. gattii* de isolados veterinários provenientes da Itália, concluíram pela alta reprodutibilidade do método e boa resolução na dependência da robustez do banco de dados.

Quando a identificação molecular foi aplicada a uma cepa de *C. flavescens* foi indicada como *C. terrestris*. A identificação molecular das espécies crípticas do complexo *C. laurentii* (*C. flavescens*, *C. terrestris* e *C.*

laurentii strictu sensu) foi mais difícil do que o esperado, no caso de *C. terrestris* (JPT 08), pois esta espécie, com base em análises filogenéticas, está intimamente relacionada como *C. flavescens* e *C. aureus*, porém mais distante de *C. laurentii* (Crestani et al., 2009). As diferentes sequências que caracterizam o *cluster* de *C. terrestris* são suficientes como critério para estabelecer uma espécie anamórfica. Porém, a presente delimitação de espécies não pode depender apenas da diferenciação de nucleotídeos. Conforme Crestani et al. (2009), o *cluster* de *C. terrestris* pode ser definido por meio de testes fisiológicos e bioquímicos que diferenciam as outras espécies filogeneticamente semelhantes *C. flavescens* e *C. aureus*. Porém, no diagnóstico laboratorial alguns testes indicados na literatura não são utilizados na rotina laboratorial para ser alcançada tal diferenciação.

A sensibilidade das cepas de *Cryptococcus*, inicialmente planejada para ser conduzida pelo método de referência norte americano, não foi completada pois a microdiluição não promoveu alguns resultados frente a certas espécies. As cepas de *C. flavescens* e *C. magnus* não cresceram, adequadamente, nas condições do teste de referência. Outro problema verificado para cumprir a proposta inicial foi a inviabilidade de cepa de *C. magnus* (JPT117) e *C. flavescens*, além de 2 isolados de *Cryptococcus* spp., que não puderam ser recuperadas pós-congelamento para completar os ensaios. O leite desnatado, usado como meio de suporte para congelamento, mostrou, parcialmente, ineficaz para o grupo de cepas estudadas. A longevidade em coleção de culturas de cepas ambientais merece maiores estudos, em particular, de espécies pouco frequentes em laboratórios. Os resultados dos valores de CIM dos fármacos frente às espécies de *Cryptococcus* permitiram obter resultados em intervalo grande de CIM (0,015 mg/L a 8 mg/L), com exceção de fluconazol para o qual a variação foi menor, mas com valores altos (CIM 32 mg/L). Na impossibilidade de classificação das cepas em categorias de resistência a comparação com outros estudos realizados no Brasil com cepas ambientais só pode ser feita em termos de valores de CIM de *Cryptococcus*, observa-se que a sensibilidade do isolado de *C. neoformans* encontrado em solo de horta exposta a fungicida foi semelhante aquela descrita em estudos anteriores com cepas ambientais para fármacos azólicos. No entanto, a cepa de *C. neoformans* avaliada teve CIM para fluconazol de 32 mg/L, itraconazol 0,12 mg/L, voriconazol 0,03 mg/L e

avuconazol 0,03 mg/L sendo um resultado semelhante ao encontrado nos outros trabalhos citados acima. Notável foi a classificação em não-selvagem da cepa de *C. neoformans*, tendo em vista os pontos de corte epidemiológico de fluconazol propostos para essa espécie (Espinell- Ingroff et al., 2012). Esse conceito significa que a cepa deve possuir mecanismos de resistência ao fluconazol, a ser estudada em investigações posteriores. Cepas também não selvagens para fluconazol foram descritas por Andrade-Silva et al. (2013) que determinaram a CIM de 81 cepas ambientais de *C. neoformans* demonstrando que para 95% das cepas o valor máximo era de 64 mg/L, mas 5% delas situava-se acima desse valor.

De outro modo, Pedroso et al. (2006) avaliaram 16 isolados de *C. neoformans* sendo observado CIM₅₀ de fluconazol (4 mg/L). Andrade-Silva et al. (2013) indicou a maioria das cepas em CIM de itraconazol em 0,5 mg/L e para voriconazol em 1 mg/L, bem como, Pedroso et al. (2006) confirmaram o valor de mediana de CIM de itraconazol em 0,5 mg/L. Também, apenas com cepas selvagens, no trabalho de Teodoro et al. (2013) foram isolados do ambiente 52 cepas selvagens de *C. neoformans* com CIM para fluconazol variando entre 2 a 8 mg/L, bem como, para itraconazol (CIM modal, 0,0625 mg/L); de outro modo, para voriconazol, valores altos, de até 4 mg/L foram descritos pelos autores.

Para outras espécies, os resultados de sensibilidade foram compatíveis com os anteriormente descritos. A inexistência de pontos de corte epidemiológicos para outras espécies que não *C. neoformans* e *C. gattii*, impedem análise interpretativa dos valores de CIM, permitindo apenas comparação de valores absolutos. Pedroso et al. (2006) relataram para *C. laurentii*, *C. albidus* e *C. uniguttulatus* altos valores de CIM de fluconazol (0,5 mg/L a >64 mg/L) e itraconazol (0,06 mg/L a 8 mg/L). Teodoro et al. (2013) realizando estudo com excrementos de pássaros na cidade de Araraquara, em São Paulo, isolaram 58 cepas de *C. ater*, *C. laurentii*, *C. luteolus*, *C. gattii*, e outras não identificadas, que foram inibidas em até 4 mg/L de fluconazol (*C. laurentii*, *C. ater*, *C. luteolus* e *C. gattii*). O mesmo estudo de Teodoro et al. (2013) indicaram para itraconazol CIM de 0,0625 mg/L frente a cepas ambientais de *C. ater*, *C. laurentii*, *C. luteolus*, entre outras, valores inferiores ao observados neste estudo. Para voriconazol, Teodoro et al. (2013) observaram CIM frente a cepas de *C. luteolus*, *C. laurentii* e *C. ater*, CIMs de até 1 mg/L,

valor maior ao observado neste estudo. Os autores indicam que, devido à resistência em alguns isolados, medidas essenciais para o controle ambiental de *Cryptococcus* seriam a identificação de áreas infestadas, o controle de pássaros e a desinfecção desses ambientes.

Interessante que, neste estudo, testes com uma cepa de *C. terrestris* (isolado JPT 08) indicaram CIM de fluconazol, itraconazol, voriconazol, difenoconazol e ciproconazol altos, indicando provável ocorrência de resistência cruzada. Nas demais cepas os valores de fluconazol, assim como os demais triazólicos foram menores, em contraste com achados de outros autores que encontraram isolados ambientais dessa espécie como pouco sensíveis. Ferreira-Paim et al. (2012) isolaram 38 cepas de *C. laurentii*, de debris de árvores e fezes de pássaros nas redondezas de um hospital universitário em Uberaba (MG), observando 71% dos isolados com baixa sensibilidade (16 mg/L a 32 mg/L) para fluconazol, assim como 2,7% dos isolados para voriconazol (CIM ≥ 4 mg/L) e 23,7% a itraconazol (CIM ≥ 1 mg/L). Os autores sugeriram que a exposição aos antifúngicos, presentes em aerossóis na região do hospital, diminuiriam a sensibilidade das cepas ambientais aos compostos azólicos.

A determinação *in vitro* da sensibilidade ao fluconazol de cepas de *Cryptococcus* tem sua importância para avaliar a emergência de resistência e, ainda, para estimar o poder de patogenicidade em seres humanos e animais. O teste que analisa o CIM desse fármaco tem suas limitações e, até o momento, não há consenso sobre a correlação *in vitro* - *in vivo* para prever se baixos valores de CIM indicam provável falha terapêutica. Diante dessa situação, pesquisadores direcionam estudos para novos métodos e, dentre estes, o teste que determina o nível de heterorresistência ao fluconazol em cepas de *Cryptococcus* foi proposto como uma ferramenta que permite estimar o poder patogênico e a capacidade de sobrevivência da cepa exposta a concentrações altas desse fármaco, muitas vezes acima do CIM. A cepa de *C. neoformans* deste estudo, para a qual o CIM de fluconazol foi 32 mg/L, apresentou subpopulação capaz de crescer frente a 128 mg/L. Em teoria, quando exposta *in vivo* ao fármaco, por exemplo, durante terapia de manutenção da criptococose, esses agentes poderiam ir se adaptando a maiores doses do fármaco e ser responsável por recidiva ou falha terapêutica. De maior importância é o fato comprovado em estudo norte americano de que cepas com altos níveis de heterorresistência são, mais

resistentes a xenobióticos e são, também, mais virulentas para modelos murinos de experimentação (Sionov et al., 2009). Os resultados dos testes de heterorresistência mostram outros aspectos do perfil de sensibilidade ao fluconazol e podem ser, no futuro, mais fidedignos do que os dados de CIM para utilização na clínica médica como preditor de evolução clínica.

Em relação ao fármaco ravuconazol, Yamazumi et al. (2000) realizaram um estudo com 541 cepas clínicas de *C. neoformans* e verificaram MIC <8 mg/L frente à grande maioria dos isolados (96,5%), 8,1% com MIC de 16 a 32 mg/L e 1,3% com MIC ≥64 mg/L, corroborando com o resultado obtido neste estudo. Os valores são altos e podem ser representar falha clínica com tratamento com este fármaco de terceira geração.

Os resultados do teste de curva de morte indicam a ação fungicida ao longo de um período de tempo de exposição a um fármaco e podem ser mais adequados para avaliar fármacos fungicidas. Este teste, realizado com a cepa ambiental de *C. neoformans* indicou forte ação fungicida da anfotericina B, reforçando a avaliação de boa ação inibitória no teste de CIM. A morte ocorreu logo às primeiras 6 h de exposição ao fármaco e está condizente com o observado para cepas ambientais, bem como, clínicas de *C. neoformans* e *C. gattii* indicando a alta eficácia desse composto (Pappalardo et al., 2009; Silva e al., 2012).

Quanto à sensibilidade de cepas de *Cryptococcus* frente a fungicidas, apenas um trabalho brasileiro foi encontrado (Drummond et al., 2007) no qual os autores realizaram um estudo na região sudeste do Brasil para avaliar o comportamento de amostras, clínicas e ambientais, de *C. neoformans* em relação a fungicidas de uso agrônômico e ao fluconazol. Verificaram a atividade de epoxiconazol, difenoconazol e ciproconazol em 23 isolados ambientais de *C. neoformans*. A CIM₅₀ para o epoxiconazol foi de 6 mg/L, para difenoconazol foi de 1 mg/L, para ciproconazol foi de 2 mg/L e para fluconazol foi de 64 mg/L. Os autores constataram, ainda, que todas as cepas, tanto clínicas quanto ambientais, foram menos sensíveis aos fungicidas do que a fluconazol. Não foi comprovada a resistência cruzada entre esses compostos, porém a diversidade observada nos perfis de sensibilidade entre cepas ambientais e clínicas pode ser constatada.

A contaminação do solo por fungicidas azólicos pode ter efeitos, qualitativos e quantitativos, na ocorrência de resistência fúngica por exposição (adquirida) e levar à proliferação e manutenção de fenótipos resistentes nesse ambiente. Em contraste com as bactérias, em que a resistência é carregada por plasmídeos capazes de serem transferidos, facilmente, de uma célula para outra, em fungos esse mecanismo não é descrito; portanto, o desenvolvimento da resistência fúngica é gradual e clonal (Anderson, 2005; Colinas et al., 1994; Vaclavik et al., 2004; Liu et al., 2009).

Interessante ressaltar que isolados fúngicos obtidos de amostras ambientais parecem ter *in vitro* perfis diferentes em comparação a isolados clínicos (García-Martos et al., 2002). Na base de dados internacional do FRAC – *Fungicide Resistance Action Committee*, estão cadastrados 25 tipos de fungicidas triazólicos, e pelo sistema de consulta de agrotóxicos fitossanitários - AGROFIT (www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/paginainicial/servicos-e-sistemas/sistemas/agrofit), o Brasil possui 18 tipos de fungicidas triazólicos comercializados para diversos tipos de cultura, dentre eles o ciproconazol e o difenoconazol, escolhidos por este motivo para compor este estudo.

A dispersão ambiental de compostos azólicos a partir de unidades nosocomiais, como sugerido por Ferreira-Paim et al. (2012) é plausível; porém, a aspersão de compostos azólicos em agricultura, sem dúvida é mais relevante. É provável que as comunidades microbianas tenham menor resistência natural ao impacto dos agrotóxicos, do que as plantas e organismos maiores; porém, estudos para dimensionar essa questão devem ser realizados em busca de cepas resistentes a antimicrobianos (Bending et al., 2007; Alisson e Martiny, 2008).

A avaliação da presença de fungicida nas amostras de solo e água foi planejada neste estudo, considerando-se que a eficácia dos pesticidas, para aumento da produção agrícola e controle de pragas é potencializada, pelo fato de que seus resíduos podem permanecer o meio ambiente por longos períodos de tempo, causando impactos negativos em diferentes ecossistemas. A investigação de poluentes, tais como compostos orgânicos e metais em

sedimentos é de grande importância ambiental, pois a matriz pode ter a propensão ao acúmulo deste tipo de compostos (Flores et al., 2004).

Após obtenção dos resultados por cromatografia líquida, os mesmos extratos foram analisados por cromatografia gasosa com espectrômetro de massas para confirmação dos resultados, porém foi observado que não há presença dos analitos nas amostras. O método utilizado tem forte fundamento na literatura, afastando a possibilidade de falso-negativo. Variados estudos na literatura avaliaram por cromatografia gasosa a análise de multi-resíduos incluindo fungicidas no solo como Sánchez- Brunete et al. (2002), Lesueur et al. (2008), Schreck et al. (2008) e Guo et al. (2010). Chitescu et al. (2012) avaliaram a metodologia de U-HPLC com espectrômetro de massa LC-MS e extração ultrasônica assistida para uma gama de componentes, com destaque para os fungicidas triazólicos (epoxiconazol, ciproconazol, propiconazol, difenoconazol, entre outros) e antifúngicos clínicos triazólicos (fluconazol, itraconazol e voriconazol). O estudo foi realizado em solo de plantações na Holanda e se mostrou uma técnica efetiva de boa qualidade na detecção de multi-resíduos (Chitescu et al., 2012).

Os resultados negativos para presença de fungicidas nas amostras de solo e água pode ser associado à baixa concentração desses compostos nas amostras que, hipoteticamente, estariam abaixo do limite de detecção do método. Sánchez-Brunete et al. (2002) realizaram teste de multiresíduos para determinar 14 tipos de fungicidas no solo pela metodologia de cromatografia gasosa com captura de elétrons e extração por sonicação assistida em colunas pequenas. A avaliação da extração por sonicação foi excelente com diminuição do uso do solvente e a recuperação dos fungicidas no solo foi boa, com um limite de detecção de 2 a 10 ug/kg. A lixiviação provocada pelas chuvas poderia ter sido um dos fatores causais da diminuição da concentração dos fungicidas na horta estudada. A probabilidade de baixa absorção pelo solo, também, parece fraca, desde que, altas concentrações de compostos azólicos descritas em lodo de esgoto sugerem uma forte tendência de absorção e persistência em sólidos; a meia vida dos compostos azólicos é de, aproximadamente, um ano (Chitescu et al., 2012).

A análise de cepas clínicas e ambientais obtidas antes do advento dos triazóis

(<1979) mostra ocorrência de altos valores de CIM para fluconazol (>32 mg/L), sugerindo que fontes ambientais podem ter contribuído para esse fenômeno (Sionov et al., 2009). A ação de compostos químicos usados como agrotóxicos pode fazer parte desse cenário. Este estudo contribuiu para avaliação do impacto do uso de fungicidas agrícolas na ocorrência e disseminação de resistência a triazóis de uso clínico em agentes de criptococose e feohifomicoses.

A emergência de cepas de *Cryptococcus*, clínicas e ambientais pouco sensíveis a vários fármacos azólicos pode ter impacto na terapia com fluconazol em criptococose, evitando o uso de antifúngicos orais e levando à pouca opção de tratamento intravenoso com anfotericina B. As consequências previstas são o aumento da resistência e morbidade crescente, doenças de longo tratamento, maior risco de complicações e maior taxa de mortalidade.

As implicações potenciais da aplicação ambiental de fungicidas azólicos para a saúde humana devem, ainda, ser mensuradas por estudos diversos. Deverão ser alvo de trabalho: uma revisão das evidências atuais da origem ambiental da resistência em cepas de diversos gêneros, o dimensionamento da extensão e relevância do problema para a saúde humana e a identificação de prioridades para futuras pesquisas sobre essa problemática. Com isso, deverá ocorrer um aumento da consciência e prover, às autoridades competentes e formadoras de opinião, opções de ações de controle do problema emergente de resistência a azóis em micoses invasivas.

6. CONCLUSÕES

- Diversas espécies de leveduras melanizadas foram obtidas de amostras de hortas, expostas e não expostas a fungicidas azólicos, a saber: *C. neoformans*, *C. laurentii*, *C. albidus*, *C. flavescens*, *C. terrestris*, *Exophiala spinifera*, *Exophiala phaeomuriformis*, complexo *Aureobasidium pullulans*, *Aureobasidium leucospermi*, *Cladosporium cladosporioides* e *Cladophialophora arxii*, incluindo espécies com alto potencial patogênico;
- A identificação molecular não foi suficiente para identificação de todas as espécies de *Cryptococcus*, podendo se tratar de nova(s) espécie(s), indicando a grande biodiversidade e importância de pesquisas ambientais;
- O método de MALDI-TOF foi útil para identificação da maioria dos isolados ambientais de *Cryptococcus*, mas foi inadequado para todas as cepas de *Black Yeast Fungi*, enfatizando a necessidade de aprimoramento do banco de dados, com inserção de mais isolados de mesma espécie, além de incremento no número de espécies.
- O sistema comercial API20C ® , ainda que idealizado para leveduras de amostras clínicas, foi adequado para identificação do gênero *Cryptococcus*, com acerto da metade das espécies indicando ser adequado como método de triagem desse gênero em amostras ambientais;
- A maioria das cepas melanizadas, tanto de *Cryptococcus*, quanto de *Black Yeast Fungi* foi obtida de ambiente com exposição de fungicidas triazólicos sugerindo a possibilidade de indução de resistência adquirida a fármacos de mesma classe química;

- A presença de fungicidas azólicos no solo das hortas não foi comprovada, sugerindo lixiviação desses compostos pela chuva ou níveis residuais abaixo do limite de detecção do método de cromatografia gasosa e HPLC, implicando na necessidade de alternativas ou aprimoramento metodológicos.
- A presença de *C. neoformans* VNI do tipo conjugante alfa, em solo de manejo agrícola, implica na existência de fonte potencial de infecção humana e animal para o agente mais frequente da criptococose humana e animal;
- A ação fungicida da anfotericina B frente à cepa de *C. neoformans* foi alta, indicando a eficiência desse fármaco antigo e polivalente;
- O fenômeno de heterorresistência a fluconazol, investigado apenas na cepa de *C. neoformans*, foi intenso indicando a alta capacidade de adaptação à níveis do fármaco quatro vezes acima da concentração inibitória mínima, enfatizando a possibilidade de resistência adquirida exposicional dessa cepa;
- *C. neoformans* foi isolado de horta com fungicida e a sua sensibilidade a fluconazol foi baixa, indicando tratar-se de cepa não selvagem, de acordo com os pontos de corte epidemiológicos para essa espécie; além disso, foi comprovada correlação positiva de diminuição de resistência a fungicida e voriconazol caracterizando situação de risco para desenvolvimento de resistência adquirida cruzada a compostos azólicos em cepas ambientais que pode ter grande impacto no manejo terapêutico da criptococose.

- De modo geral, para isolados de *Cryptococcus* a sensibilidade foi alta, tanto para fungicidas, quanto para fármacos azólicos. No entanto, baixa sensibilidade a fármacos azólicos de uso rotineiro na clínica médica, além de compostos fungicidas, foi observada em duas espécies (*C. albidus* e *C. terrestris*) sugerindo a possibilidade de resistência cruzada em cepas ambientais dessas espécies.
- De grande importância foi a correlação de sensibilidade de isolados de *Cryptococcus* a ciproconazol e voriconazol, significando que quanto maior a resistência ao fungicida, maior resistência ao fármaco, podendo levar à suposição de que o uso de agrotóxicos azólicos pode ter implicação no manejo terapêutico da criptococose com azóis.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abegg, MA, Cella FL, Faganello J, Valente P, Schrank A, Vainstein MH. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. *Mycopathologia* 2006; 161:83–91.

Almeida VS, Carneiro FF, Vilela NJ. Agrotóxicos em hortaliças: segurança alimentar, riscos socioambientais e políticas públicas para a promoção da saúde. *Tempus Actas em Saúde Coletiva* 2009; 4:84-99.

Alviano DS, Franzen AJ, Travassos LR, Holandino C, Rozental S, Ejzemberg R, et al. Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* induces production of human antifungal antibodies and enhances the antimicrobial efficacy of phagocytes. *Infection and immunity* 2004; 72(1):229-237.

Ameen M. Chromoblastomycosis: Clinical presentation and management. *Clin Exp Dermatol* 2009; 34:849 – 854.

Anderson JB. Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. *Nat Rev Microbiol* 2005;3(7):547–56.

Andrade-Silva L, Ferreira-Paim K, Mora DJ, Da Silva PR, Andrade AA, Araujo NE, et al. Susceptibility profile of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Medical Mycology* 2013; 51(6): 635-640.

Ansheng L, Nishimura K, Taguchi H, Tanaka R, Shaoxi W, Miyaji M. The isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings and serotyping of naturally and clinically sourced isolates in China. *Mycopathologia* 1993; 124(1), 1-5.

Arndt CAS, Walsh TJ, McCully CL et al. Fluconazole penetration into cerebrospinal fluid: implications for treating fungal infections of the central nervous system. *J Infect Dis* 1988; 157: 178–80.

Arranz Sanchez DM, de la Calle MC, Martín-Díaz MA, Flores CR, Gonzalez-Beato MJ, Pinto PH, Díaz Díaz RM. Subcutaneous mycosis produced by *Aureobasidium pullulans* in a renal transplant recipient. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2006; 20:229 – 230.

Arvanitidou M, Kanellou K, Constantinides TC, Katsouyannopoulos V: The occurrence of fungi in hospital and community potable waters. *Lett Appl Microbiol* 1999, 29:81–84.

Averbuch D, Boekhout T, Falk R, Engelhard D, Shapiro M, Block C, Polacheck I. Fungemia in a cancer patient caused by fluconazole-resistant *Cryptococcus*

laurentii. Med Mycol 2002; 40(5), 479-484.

Badali H, Gueidan C, Najafzadeh MJ, Bonifaz A, van den Ende AG, De Hoog GS. Biodiversity of the genus *Cladophialophora*. Studies in Mycology, 2008; 61:175-191.

Badali H, Najafzadeh MJ, Van Esbroeck M, Van den Enden E, Tarazooie B, Meis J FGM, et al. The clinical spectrum of *Exophiala jeanselmei*, with a case report and in vitro antifungal susceptibility of the species. Medical Mycology 2010; 48(2), 318-327.

Baltazar LDM, Ribeiro MA. First isolation of *Cryptococcus gattii* from the environment in the state of Espírito Santo. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2008; 41(5): 449-453.

Barone JA, Moskovitz BL, Guarnieri J et al. Enhanced bioavailability of itraconazole in hydroxypropyl- β -cyclo-dextrin solution versus capsules in healthy volunteers. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 1862–5.

Baroni FA, Paula CR, Silva EG, Viani FC, Rivera ING, Oliveira MTB, et al. *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro city, Rio de Janeiro, Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo 2006; 48:71– 5.

Bartlett DW. The strobilurin fungicides. Pest Manag Sci 2002; 58:649-662.

Bauters TGM, Swinne D, Boekhout T, Noens L, Nelis H.J. Repeated isolation of *Cryptococcus laurentii* from the oropharynx of an immunocompromized patient. Mycopathologia 2002; 153:133-135.

Bell T, Newman JA, Silverman BW, Turner SI, Liley AK. The contribution of species richness and composition to bacterial services. Nature 2005; 436:1157-1160.

Ben-Ami R, Lewis RE, Raad II, Kontoyiannis DP. Phaeohyphomycosis in a tertiary care cancer center. Clin Infect Dis 2009; 48:1033-1041.

Bending GD, Rodriguez-Cruz MS, Lincoln SD. Fungicide impacts on microbial communities in soils with contrasting management histories. Chemosphere 2007; 69(1): 82-88.

Bentz MS, Sautter RL. Disseminated infection with *Aspergillus fumigatus* and *Cladosporium cladosporioides* in an immunocompromised host. Abstr. Gen. Meet 1993; ASM 93, 33.

Berg J, Clancy CJ, Nguyen MH. The hidden danger of primary fluconazole prophylaxis for patients with AIDS. Clinical infectious diseases 1998; 26(1): 186-187.

Bernal-Martinez L, Gomez-Lopez A, Castelli MV, Mesa-Arango AC, Zaragoza O, Rodriguez-Tudela JL, et al. Susceptibility profile of clinical isolates of non-

Cryptococcus neoformans/non-*Cryptococcus gattii* *Cryptococcus* species and literature review. *Medical Mycology* 2010; 48(1): 90-96.

Bicanic T, Harrison TS. Cryptococcal meningitis. *British Medical Bulletin* 2004; 72(1): 99-118.

Bloomfield BJ, Alexander M. Melanins and resistance of fungi to lysis. *J Bacteriol* 1967; 93:1276–1280.

Blumberg LM, David F, Klee MS, Sandra P. Comparison of one-dimensional and comprehensive two-dimensional separations by gas chromatography. *Journal of Chromatography A* 2008; 1188(1):2-16.

Brammer KW, Farrow PR, Paulkner JK. Pharmacokinetics and tissue penetration of fluconazole in humans. *Rev Infect Dis* 1990; 12 (Suppl. 3): 318–26.

Brandt ME, Pfaller MA, Hajjeh RA, Hamill RJ, Pappas PG, Reingold AL, et al. Trends in antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates in the United States: 1992 to 1994 and 1996 to 1998. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2001; 45(11): 3065-3069.

Brasil (Presidência da República), Subchefia para Assuntos Jurídicos. Lei nº 7802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. [Internet]. Brasília, DF; 1989. [acesso em 2014 out. 1]. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L7802.htm.

Brasil (Presidência da República), Subchefia para Assuntos Jurídicos. Lei nº 9974, de 6 de junho de 2000. Altera a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. [Internet]. Brasília, DF; 2000. [acesso em 2014 out. 1]. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L7802.htm.

Brasil. Decreto 5981, de 6 de dezembro de 2006. Dá nova redação e inclui dispositivos ao Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins. [Internet]. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil.

26 dez. 06 [acesso em 2014 out. 1]. Disponível em:
http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5981.htm.

Butler MJ, Day AW. Fungal melanins: a review. *Can J Microbiol* 1998; 44:1115–1136.

Caicedo LD, Alvarez MI, Delgado M, Cárdenas A. *Cryptococcus neoformans* in bird excreta in the city zoo of Cali, Colombia. *Mycopathologia* 1999; 147(3): 121-124.

Callejas A, Ordonez N, Rodriguez MC, Castaneda E. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C, from the environment in Colombia. *Med Mycol* 1998; 36:341–344.

Caporale NE, Calegari L, Perez D, Gezuele E. Peritoneal catheter colonization and peritonitis with *Aureobasidium pullulans*. *Perit Dial Int* 1996; 16: 97-98.

Casadevall A, Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*. Washington: ASM Press, Library of Congress, 1998.

Castanón-Olivares LR, Lopez-Martinez R. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon (*Columba livia*) droppings in Mexico City. *Mycoses* 1993; 37(9-10), 325-327.

Castro e Silva DM, Santos D, Pukinskas SR, Oshida JT, Oliveira L, Carvallho AF, Melhem MS. A new culture medium for recovering the agents of Cryptococcosis from environmental sources. 2015; *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 355-358

Chakrabarti A, Jatana M, Kumar P, Chatha L, Kaushal A, Padhye AA. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus camaldulensis* in India. *J Clin Microbiol* 1997; 35:3340–3342.

Chaturvedi S, Rodeghier B, Fan J, McClelland CM, Wickes BL, Chaturvedi V. Direct PCR of *Cryptococcus neoformans* MAT α and MAT α Pheromones To Determine Mating Type, Ploidy, and Variety: a Tool for Epidemiological and Molecular Pathogenesis Studies. *Journal of clinical microbiology* 2000; 38(5): 2007-2009.

Chawla B, Sharma N, Titiyal JS, Nayak N, Satpathy G. *Aureobasidium pullulans* keratitis following automated lamellar therapeutic keratoplasty. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2010; 9: 1–3.

Chee HY, Lee KB. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A) from pigeon droppings in Seoul, Korea. *J Microbiol* 2005; 43(5):469–472.

Chiou CC, Groll AH, Walsh TJ. New drugs and novel targets for treatment of invasive fungal infections in patients with cancer. *The Oncologist* 2000; 5: 120–35.

Chitescu CL, Oosterink E, de Jong J, Stolker AAML. Ultrasonic or accelerated solvent extraction followed by U-HPLC-high mass accuracy MS for screening of pharmaceuticals and fungicides in soil and plant samples. *Talanta* 2012; 88: 653-662.

Chowdhary A, Meis JF, Guarro J, de Hoog GS, Kathuria S, Arendrup MC, Arikian-Akdagli S, Akova M, Boekhout T, Caira M, et al. ESCMID and ECMM joint guidelines for the diagnosis and management of systemic phaeohyphomycosis: Diseases caused by black fungi. *Clin Microbiol Infect Dis* 2014; 20: 47-75.

Clark EC, Silver SM, Hollick GE, Rinaldi MG. Continuous ambulatory peritoneal dialysis complicated by *Aureobasidium pullulans* peritonitis. *Am J Nephrol* 1995; 15: 353-355.

Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clinical microbiology reviews* 2013; 26(3), 547-603.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute/ National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast. Approved Standards Standard- third edition. Document M27-A3. Clinical and Laboratory Standard Institute. 771 E. Lancaster Avenue, Wayne, Pennsylvania 19085, 2008.

Colinas C, Ingham E, Molina R. Population responses of target and non- target forest soil organisms to selected biocides. *Soil Biology and Biochemistry* 1994; 26(1), 41-47.

Collins CH, Braga GL, Bonato PS. Introdução a métodos cromatográficos. 7ed. Campinas: Unicamp, 1997, p.168-170.

Colom MF, Hagen F, Gonzalez A, Mellado A, Morera N, Linares C, Garcia DF, Penataro JS, Boekhout T, Sánchez M. *Ceratonia siliqua* (carob) trees as natural habitat and source of infection by *Cryptococcus gattii* in the Mediterranean environment. *Medical Mycology* 2012; 50(1), 67-73.

Costa AK, Sidrim JJ, Cordeiro RA, Brilhante RS, Monteiro AJ, Rocha MF. Urban pigeons (*Columba livia*) as a potential source of pathogenic yeasts: a focus on antifungal susceptibility of *Cryptococcus* strains in Northeast Brazil *Mycopathologia* 2010; 169(3):207–13.

Crestani J, Landell MF, Faganello J, Vainstein MH, Vishniac HS, Valente P. *Cryptococcus terrestris* sp. nov., a tremellaceous, anamorphic yeast phylogenetically related to *Cryptococcus flavescens*. 2009; *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(3), 631-636.

Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Mellado E, Garcia-Effron G, Rodriguez-

Tudela JL. In vitro activities of ravuconazole and four other antifungal agents against fluconazole-resistant or susceptible clinical yeast isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004; 48(8): 3107-3111.

Danesi P, Drigo I, Latta R, Firacative C, Capelli G, Cafarchia C, et al. MALDI-TOF MS for the identification of veterinary non-*C. neoformans* –*C. gattii* *Cryptococcus* spp. isolates from Italy. *Medical mycology* 2014; myu031.

Davel G, Abrantes R, Brudny M, Cordoba S, Rodero L, Canteros CE, et al. First environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2003; 35:110–112.

Deak T. Environmental factors influencing yeasts, in *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. The Yeast Handbook, Rosa CA, Peter G, (eds), Springer; 2006. p. 155-174.

de Hoog GS, McGinnis MR. Ascomycetous black yeasts. In: de Hoog GS, Smith MT, Weijman ACM (ed), *The expanding realm of yeast-like fungi*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands; 1987.p.187-199.

de Hoog GS. Evolution of black yeasts: possible adaptation to the human host. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1993; 63: 105–109.

de Hoog GS. Ecology and evolution of Black yeasts and their relatives. *Stud Mycol* 1999; 43:1-208.

de Hoog GS, Queiroz-Telles F, Haase G, Fernandez-Zeppenfeldt G, Attili Angelis D, Gerrits Van Den Ende AH, et al. 2000. Black fungi: clinical and pathogenic approaches. *Med Mycol* 2000; 38(Suppl 1):S243–S250.

de Hoog GS, Guarro J, Gene, J, Figueras MJ. 2000. *Atlas of clinical fungi*, 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Amsterdam, 1126 pp.

de Hoog GS, Nishikaku AS, Fernández Zeppenfeldt G, Padín-González C, Burger E, Badali H, Gerrits van den Ende AHG. Molecular analysis and pathogenicity of the *Cladophialophora carrionii* complex, with the description of a novel species. *Studies in Mycology* 2007; 58: 219–234

de Hoog GS, Vicente V, Caligiorno RB, Kantarcioglu S, Tintelnot K, Gerrits van den Ende AHG, Haase G. Species diversity and polymorphism in the *Exophiala spinifera* clade containing opportunistic black yeast-like fungi. *J Clin Microbiol* 2003; 41:4767-4778.

Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley L et al. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1364–8.

Ding Y, Zhang W, Gu C, Xagorarakis I, Li H. Determination of pharmaceuticals in biosolids using accelerated solvent extraction and liquid chromatography/tandem-

mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2011; 1218(1):10-16.

Dixon DM, Szaniszlo PJ, Polak A. Dihydroxynaphthalene (DHN) melanin and its relationship with virulence in the early stages of phaeohyphomycosis. In: Cole GT, Hoch HC (ed), *Fungal spore and disease initiation in plants*. Plenum Press, New York; 1991.p.297–318.

Dixon DM, Migliozi J, Cooper CR, Jr, Solis O, Breslin B, Szaniszlo PJ. Melanized and non-melanized multicellular form mutants of *Wangiella dermatitidis* in mice: mortality and histopathology studies. *Mycoses* 1992; 35:17–21.42.

D'Souza CA, Kronstad JW, Taylor G, Warren R, Yuen M, Hu G, et al. (2011). Genome variation in *Cryptococcus gattii*, an emerging pathogen of immunocompetent hosts. *MBio* 2011; 2(1): e00342-10.

Duarte APM, Pagnocca FC, Baron NC, Melhem MSC, Palmeira GA, de Angelis DD. F, Attili-Angelis D. In vitro susceptibility of environmental isolates of *Exophiala dermatitidis* to five antifungal drugs. *Mycopathologia* 2013; 175(5-6): 455-461.

Drummond EE, Reimão JQ, Dias ALT, Siqueira AM. Comportamento de amostras ambientais e clínicas de *Cryptococcus neoformans* frente a fungicidas de uso agrônomico e ao fluconazol. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40(2):209-211.

Emmons C. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. *J Bacteriol* 1951; 62: 685–690.

Emmons C. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). *Am J Hyg* 1955; 62: 227–232.

Escandon P, Quintero E, Granados D, Huerfano S, Ruiz A, Castaneda E. Isolation of *Cryptococcus gattii* serotype B from detritus of eucalyptus trees in Colombia. *Biomedica* 2005; 25:390–397.

Espinell-Ingroff A, Shadomy S, Gebhart RJ. In vitro studies with R 51211 (itraconazole). *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 26: 5–9.

Espinell-Ingroff A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. *Rev Iberoam Micol* 2008; 25(3):101-106.

Espinell-Ingroff A, Aller AI, Canton E, Castañón-Olivares LR, Chowdhary A, Cordoba S, et al. *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole and voriconazole. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2012; AAC 01115-12.

Esterre P, Queiroz-Telles F. Management of chromoblastomycosis: novel perspectives. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2006; 19:148-152.

Fader RC, McGinnis MR. Infections caused by dematiaceous fungi: chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis. *Infect Dis Clin N Amer* 1988; 2: 925-938.

Faria ROD, Nascente PDS, Meinerz ARM, Cleff MB, Antunes TDA, Silveira ÉDS, et al. Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in pigeon excrement in the city of Pelotas, State of Rio Grande do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2010; 43(2): 198-200.

Ferreira AS, Sampaio A, Maduro AP, Silva I, Teles F, Martins MDL, et al. Genotypic diversity of environmental *Cryptococcus neoformans* isolates from Northern Portugal. *Mycoses* 2014; 57(2), 98-104.

Ferreira-Paim K, Andrade-Silva L, Mora DJ, Pedrosa AL, Rodrigues V, Silva-Vergara ML. Genotyping of *Cryptococcus neoformans* isolated from captive birds in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Mycoses* 2011;54(5):e294–e300.

Ferreira-Paim K, Andrade-Silva L, Mora DJ, Lages-Silva E, Pedrosa AL, et al. Antifungal susceptibility, enzymatic activity, PCR-fingerprinting and ITS sequencing of environmental *Cryptococcus laurentii* isolates from Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Mycopathologia* 2012; 174(1): 41-52.

Filiu WFO, Wanke B, Aguenta SM, Vilela VO, Macedo RCL, Lazera MS. Avian habitats as sources of *Cryptococcus neoformans* in the city of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35:591–5

Firacative C, Trilles L, Meyer W. Maldi-tof MS enables the rapid identification of the major molecular types within the *Cryptococcus neoformans/C.gattii* species complex. *PLoS ONE* 2013; 7(5):e37566.

Fleet GH. Microbiology of alcoholic beverages. In: Wood BJ. (ed.), *Microbiology of Fermented Foods*, 2nd ed. London: Blackie Academic & Professional; 1998, p. 217-262. Volume 1.

Flores AV, Ribeiro JN, Neves AA, Queiroz ELR. Organoclorados: um problema de saúde pública. *Ambiente e Sociedade* 2004; 7:111-124

Fonseca FL, Nohara LL, Cordero RJ, Frases S, Casadevall A, Almeida IC, et al. Immunomodulatory effects of serotype B glucuronoxylomannan from *Cryptococcus gattii* correlate with polysaccharide diameter. *Infection and immunity* 2010; 78(9): 3861-3870.

Food and Agriculture Organization – FAOSTAT. Database Results. [internet]. Brasil: FAO; 2008. [acesso em 2013 mar 05]. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>.

Fortes ST, Lazera MS, Nishikawa MM, Macedo RC, Wanke B. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a native jungle tree in the Brazilian

Amazon rainforest. *Mycoses* 2001; 44:137–140.

Franzen AJ, Cunha MM, Miranda K, Hentschel J, Platnner H, Silva MB, Salgado CG, Souza W, Rozental S. Ultrastructural characterization of melanosomes of the human pathogenic fungus *Fonsecaea pedrosoi*. *J Struct Biol* 2008;162:75–84.

Funk, S. Cyproconazole. Disponível em: <http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMR/Evaluation10/Cyproconazole.pdf> Acesso em: 03 fev. 2015.

Garcia-Martos P, Noval JF, Garcia-Tapia A, Marín P, Puerto JL, Sepúlveda A. Susceptibility to antifungal agents of *Cryptococcus* species of clinical interest. *MedClin (Barc)* 2002; 119: 211-213.

Garelick JM, Khodabakhsh AJ, Lopez Y, Bamji M, Lister M. Scleral ulceration caused by *Cryptococcus albidus* in a patient with acquired immune deficiency syndrome. *Cornea* 2004; 23:730–731.

Girish Kumar CP, Prabu D, Mitani H, Mikami Y, Menon T, et al. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from living trees in Guindy National Park, Chennai, South India. *Mycoses* 2010; 53(3): 262-264.

Gluck JL, Myers JP, Pass LM. Cryptococccemia due to *Cryptococcus albidus*. *South Med J* 1987; 80:511-513.

Granados DP, Castaneda E. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* varieties recovered from natural sources in Bogota, Colombia, and study of ecological conditions in the area. *Microb Ecol* 2005; 49:282– 290.

Gugnani HC, Mitchell TG, Litvintseva AP, Lengeler KB, Heitman J, Kumar A, et al. Isolation of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* from the flowers and bark of eucalyptus trees in India. *Med Mycol* 2005; 43:565–569.

Guo C, Li JZ, Guo BY, Wang HL. Determination and safety evaluation of difenoconazole residues in apples and soils. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 2010; 85(4), 427-431.

Godoy CV, Meyer MC. Resistência a fungicidas na cultura de soja. Embrapa Soja-Artigo em periódico indexado (ALICE).2014.

Golubev WI, Manukyan AR, Lazarev PI. Functions of the capsule in yeast organisms, *Zh. Obshch. Biol* 1984; 45(4): 507–515.

Hagen F, Khayhan K, Theelen B, Kolecka A, Polacheck I, Sionov E, et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genetics and Biology* 2015; 78:16-48.

Halko R, Sanz CP, Ferrera ZS, Rodriguez JJS. Determination of benzimidazole fungicides in soil samples using microwave-assisted micellar extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of AOAC International*

2006; 89(5):1403-1409.

Hamasha AMS, Yildiran ST, Gonlum A, Saracli MA, Doganci L. *Cryptococcus neoformans* varieties from material under the canopies of eucalyptus trees and pigeon dropping samples from four major cities in Jordan Mycopathologia, 2004; 158: 195–199.

Hamilton AJ, Gomez BL. Melanins in fungal pathogens. J Med Microbiol 2002; 51:189–191.

Hawkes M, Rennie R, Sand C, Vaudry W. *Aureobasidium pullulans* infection: Fungemia in an infant and a review of human cases. Diagn Microbiol Infect Dis 2005; 51:209-213.

Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Casadevall A. *Cryptococcus*: from human pathogen to model yeast. ASM press, 2010.

Hirooka T, Ishii H. Chemical control of plant diseases. J. Gen. Plant Pathol, 2013; 79, 390–401.

Hoang LM, Maguire JA, Doyle P, Fyfe M, Roscoe DL. *Cryptococcus neoformans* infections at Vancouver Hospital and Health Sciences Centre (1997–2002): epidemiology, microbiology and histopathology. J Med Microbiol 2004; 53: 935–940.

Hogendoorn E, Zoonen PV. Recent and future developments of liquid chromatography in pesticide trace analysis. Journal of Chromatography A 2000; 892(1): 435-453.

Ho MH-M, Castaneda RF, Dugan FM, Jong SC. *Cladosporium* and *Cladophialophora* in culture: Descriptions and an expanded key. Mycotaxon 1999; 72:115 – 157.

Horta JA, Faganello J, e Silva R, Lívia K, Oliveira LT, Santurio JM, et al. Susceptibility to heat and antifungal agents of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype D) isolated from *Eucalyptus* spp in Rio Grande do Sul, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology 2005; 36(1): 01-06.

Hunter-Ellul L, Schepp ED, Lea A, Wilkerson MG. A rare case of *Cryptococcus luteolus*-related tenosynovitis. Infection 2014; 1-4.

Iriart X, Lavergne RA, Fillaux J, Valentin A, Magnaval JF, Berry A, et al. Routine identification of medical fungi by the new Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight system with a new time-effective strategy. Journal of clinical microbiology 2012; 50(6):2107-2110.

Jacobson ES. Pathogenic roles for fungal melanins. Clin Microbiol Rev 2000; 13:708–717.

Jayakeerthi SR, Dias M, Nagarathna S, Anandh B, Mahadevan A, Chandramuki A. Brain abscess due to *Cladophialophora bantiana*. Indian J Med Microbiol 2004; 22:193 – 195.

Johnson LB, Bradley SF, Kauffman CA. Fungaemia due to *Cryptococcus laurentii* and a review of non-neoformans cryptococcaemia. Mycoses 1998; 41(7-8):277-280.

Joshi A, Singh R, Shah MS, Umesh S, Khattry N. Subcutaneous mycosis and fungemia by *Aureobasidium pullulans*: A rare pathogenic fungus in a post allogeneic BM transplant patient. Bone Marrow Transplant 2010; 45: 203 – 204.

Kantarcioğlu AS, Yücel A, Hoog GD. Case report. Isolation of *Cladosporium cladosporioides* from cerebrospinal fluid. Mycoses 2002; 45(11-12): 500-503.

Khawcharoenporn T, Apisarnthanarak A, Mundy LM. Non-neoformans cryptococcal infections: a systematic review. Infection 2007; 35(2), 51-58.

Khosravi AR. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon (*Columbia livia*) droppings in northern Iran. Mycopathologia 1997; 139(2):93-95.

Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, Huynh M, Bartlett KH, et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101: 17258–17263.

Kidd SE, Chow Y, Mak S, Bach PJ, Chen H, Hingston AO, et al. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. Applied and environmental microbiology 2007; 73(5): 1433-1443.

Kim HU, Kang SH, Matsumoto T. Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Exophiala jeanselmei* in a patient with advanced tuberculosis. Br. J. Dermatol 1998; 138:351–353.

Klepser MA, Ernst EJ, Lewis RE, Ernst ME, Pfaller MA. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. Antimicrob Agents Chemoter 1998; 42:1207-1212.

Kobayashi CCBA, Fernandes ODFL, Brito SCAD, Silva AC, Sousa EDD, Silva MDRR. Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás State, Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 2005; 47(4): 203-207.

Krockenberger MB, Canfield PJ, Malik R. *Cryptococcus neoformans* in the koala (*Phascolarctos cinereus*): colonization by *C. neoformans* var. *gattii* and investigation of environmental sources. Med Mycol 2002; 40:263–272.

Kumar KK, Hallikeri K. Phaeohyphomycosis. Indian J. Pathol. Microbiol. 2008; 51:556 –558.

Kuroki M, Pichaichumpon C, Yasuoka A, Chiranairadul P, Chosa T, Sirinirund P, et al. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* from an endemic region of HIV-associated cryptococcosis in Thailand . *Yeast* 2004; 21(10): 809-812.

Kutlesa M, Mlinaric-Missoni E, Hatvani L, Voncina D, Simon S, Lepur D, Barsic B. Chronic fungal meningitis caused by *Aureobasidium proteae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 73:271 – 272.

Kwon-Chung KJ, Bennett JE. *Medical mycology*. Lea & Febiger, Philadelphia; 1992.

Kwon-Chung KJ, Boekout T, Wickes BL, Fell JW. Systematics of the genus *Cryptococcus* and a its type species *C.neoformans*. In: Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Casadevall A. *Cryptococcus: from human pathogen to model yeast*. ASM press, 2010.p.5-15.

Lamb DC, Corran A, Baldwin BC, Kwon-Chung J, Kelly SL. Resistant P45051A1 activity in azole antifungal tolerant *Cryptococcus neoformans* from AIDS patients. *FEBS Lett* 1995; 368: 326–330.

Langfelder KM, Streibel B, Jahn G, Haase AA, Brakhage. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol* 2003; 38: 143–158.

Lazera MS, Wanke B, Nishikawa MM. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Medical Mycology* 1993; 31(6):449-454.

Lazera MS, Cavalcanti MAS, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* - evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. *Medical Mycology* 1998; 36(2):119- 122.

Lazera MS, Cavalcanti MS, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Medical Mycology* 2000; 38(5):379-383.

Lesueur C, Gartner M, Mentler A, Fuerhacker M. Comparison of four extraction methods for the analysis of 24 pesticides in soil samples with gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–ion trap– mass spectrometry. *Talanta* 2008; 75(1): 284-293.

Levitz SM, Boekout T. *Cryptococcus*: The once-sleeping giant is fully awake. *FEMS Yeast Research* 2006; 6(4):461-462.

Licea BA, Garza DG, Urbietta VF, Olivares RAC. Aislamiento y caracterización de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* a partir de muestras de *Eucalyptus camaldulensis* en la ciudad de México. *Rev Iberoamer Micol* 1999; 16: 40-42.

- Li A, Guo N, Wu S. A strain of urease negative *Cryptococcus neoformans* isolated from the environment in China. *Chin Med Sci J* 1993; 8: 52–54.
- Li J, Dong F, Cheng Y, Liu X, Xu J, Li Y, Chen X, Kong Z, Zheng Y. Simultaneous enantioselective determination of triazole fungicide difenoconazole and its chiral metabolite in vegetables and soil by normal-phase high-performance liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2012; 404: 2017-2031.
- Lin X, Heitman J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annual Review of Microbiology* 2006; 8:69-105.
- Littman ML, Schneierson SS. *Cryptococcus neoformans* in pigeon excreta in New York City. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1959; 69:49-59, 1959.
- Liu F, Ying GG, Tao R, Zhao JL, Yang JF, Zhao LF. Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities. *Environ Pollut* 2009; 157:1636–1642
- Liu Y, Ma S, Wang X, Xu W, Tang J. (2014). *Cryptococcus albidus* encephalitis in newly diagnosed HIV-patient and literature review. *Med Mycol Case Reports* 2014; 3:8-10.
- Loperena-Alvarez Y, Ren P, Li X, Bopp DJ, Ruiz A, Chaturvedi V, et al. Genotypic characterization of environmental isolates of *Cryptococcus gattii* from Puerto Rico. *Mycopathologia* 2010; 170(4):279–85.
- Lugarini C, Goebel C, Condas LAZ, Muro MD, de Farias MR, Ferreira FM, et al. *Cryptococcus neoformans* Isolated from Passerine and Psittacine bird excreta in the state of Paraná, Brazil. *Mycopathologia* 2008; 166(2): 61-69.
- Machado CC, Amaral AA, Severo LC. (1993). *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* isolated from soil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 1993; 35(1): 77-79.
- Maertens JA. History of the development of azole derivatives. *Clin. Microbiol. Infect* 2004; 10: 1–10.
- Mahmoud YA. First environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and var. *gattii* from the Gharbia Governorate, Egypt. *Mycopathologia* 1999; 148:83–86.
- Mansfield BE, Oltean HN, Oliver BG, Hoot SJ, Leyde SE, Hedstrom L, & et al. Azole drugs are imported by facilitated diffusion in *Candida albicans* and other pathogenic fungi. *PLoS pathogens* 2010; 6(9): e1001126.
- Marichal P, Koymans L, Willemsens S, Bellens D, Verhasselt P, Luyten W, et al. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 α -demethylase (Erp11p,

Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. Microbiology 1999; 145(10): 2701-2713.

Marinach-Patrice C, Lethuillier A, Marly A, Brossas JY, Gene J, Symoens F, et al. Use of mass spectrometry to identify clinical *Fusarium* isolates. Clinical Microbiology and Infection 2009; 15(7):634-642.

Marklein G, Josten M, Klanke U, Müller E, Horré R, Maier T, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. Journal of clinical microbiology 2009; 47(9):2912-2917.

Matsushita A, Jilong L, Hiruma M, Kobayashi M, Matsumoto T, Ogawa H, Padhye AA. Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Veronaea botryosa* in the People's Republic of China. J. Clin. Microbiol 2003; 41:2219– 2222.

Matsumoto T, Padhye AA, Ajello L. Medical significance of the so-called black yeasts. Eur J Epidemiol 1987; 3:87–9.

Melo NTD, Nigro RC, Pereira AD, Huggins D, Lacaz CDS. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de fezes de pombos, do solo e ninhos de pombos. RBM Rev Bras Med 1987; 44(1/2):6-9.

Mendoza L, Karuppayil SM, Szaniszlo PJ. Calcium regulates *in vitro* dimorphism in chromoblastomycotic fungi. Mycoses 1993; 36:157-164.

McCown HF, Sahn EE. Subcutaneous phaeohyphomycosis and nocardiosis in a kidney transplant patient. Journal of the American Academy of Dermatology 1997; 36(5): 863-866.

McGinnis MR, Pasarell L. In vitro evaluation of terbinafine and itraconazole against dematiaceous fungi. Med Mycol. 1998; 36:243–6.

Mendes-Giannini MJS, Melhem MSC. Fungos. In: Ferreira AW, Ávila SLM, coordenadores. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogam; 2000. p.333-4.

Menezes RDP, Penatti MPA, Pedroso RDS. Different culture media containing methyl dopa for melanin production by *Cryptococcus* species. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2011; 44(5): 591-594.

Mershon-Shier KL, Deville JG, Delair S, Fothergill AW, Wickes B, de Hoog GS, Sutton DA, Lewinski MA. *Aureobasidium pullulans* var. *melanigenum* fungemia in a pediatric patient. Med Mycol 2011; 49: 80 – 83.

Meyer W, Mitchell TG, Freedman EZ, Vilgalys R. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. Journal of Clinical Microbiology 1993; 31(9): 2274-2280.

Meyer W, Marszewska K, Amirmostofian M, Igreja RP, Hardtke C, Methling K, et al. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA—a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. *Electrophoresis* 1999; 20(8): 1790- 1799.

Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E, IberoAmerican Cryptococcal Study Group. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:189-195.

Mise N, Ono Y, Kurita N, Sai K, Nishi T, Tagawa H, Sugimoto T. *Aureobasidium pullulans* peritonitis: Case report and review of the literature. *Perit Dial Int* 2008; 28: 679 –681.

Montenegro H, Paula CR. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *C. neoformans* var. *neoformans* in the city of Sao Paulo, Brazil. *Med Mycol* 2000;38:385–90.

Morera N, Hagen F, Juan-Sallés C, Artigas C, Patricio R, Serra JI, Colom MF. Ferrets as Sentinels of the Presence of Pathogenic *Cryptococcus* Species in the Mediterranean Environment. *Mycopathologia* 2014; 178(1- 2):145-151.

Mortensen KL, Mellado E, Lass-Flörl C, Rodriguez-Tudela JL, Johansen HK, Arendrup MC. Environmental study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* and other aspergilli in Austria, Denmark, and Spain. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2010; 54(11):4545-4549.

Mseddi F, Sellami A, Jarboui MA, Sellami H, Makni F, Ayadi A. First environmental isolations of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Tunisia and review of published studies on environmental isolations in Africa. *Mycopathologia* 2011; 171(5):355-360.

Najafzadeh MJ, Sutton DA, Keisari MS, Zarrinfar H, de Hoog GS, Chowdhary A, Meis JF. In vitro activity of 8 antifungal drugs against 104 environmental and clinical isolates of *Aureobasidium pullulans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; pii:AAC/03095 – 14.

Narayan S, Batta K, Colloby P, Tan CY. Cutaneous cryptococcus infection due to *C. albidus* associated with Sezary syndrome. *Br J Dermatol* 2000; 143:632-634.

Neuhof T, Dieckmann R, Druzhinhina IS, Kubicek CP, Nakari-Setälä T, Penttilä M, et al. Direct identification of hydrophobins and their processing in *Trichoderma* using intact-cell MALDI-TOF MS. *FEBS Journal* 2007/ 274(3):841-852.

Nosanchuk JD, Casadevall A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 3519-3528.

Nucci M, Akiti T, Barreiros G, Silveira F, Revankar SG, Sutton DA, et al. Nosocomial fungemia due to *Exophiala jeanselmei* var. *jeanselmei* and a Rhinocladiella species: newly described causes of bloodstream infection. Journal of clinical microbiology 2001; 39(2): 514-518.

Özhak-Baysan B, Ögünç D, Döğen A, Ilkit M, de Hoog GS. MALDI-TOF MS-based identification of black yeasts of the genus *Exophiala*. Medical mycology 2015; 53(4): 347-352.

Soares MC, Paula CR, Dias AL, Caseiro MM, Costa SO. Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2005; 47(1):31–6.

Souza LK, Fernandes Ode F, Kobayashi CC, Passos XS, Costa CR, Lemos JA, et al. Antifungal susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Goiania city, Goias, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2005; 47(5):253–6.

Trösken ER, Adamska M, Arand M, Zarn JA, Patten C, Völkel W, et al. Comparison of lanosterol-14 α -demethylase (CYP51) of human and *Candida albicans* for inhibition by different antifungal azoles. Toxicology 2006; 228(1):24-32.

Panda A, Das H, Deb M, Khanal B, Kumar S. *Aureobasidium pullulans* keratitis. Clin Experiment Ophthalmol 2006; 34:260 – 264.

Pappalardo MC, Szeszs MW, Martins MA, Baceti LB, Bonfietti LX, Purisco SU, Melhem MS. Susceptibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B using time–kill methodology. Diagnostic microbiology and infectious disease 2009; 64(2), 146-151.

Passoni LFC, Wanke B, Nishikawa MM, Lazera MS. *Cryptococcus neoformans* isolated from human dwellings in Rio de Janeiro, Brazil: An analysis of domestic environment of Aids patients with and without cryptococcosis. Med Mycol 1998;36:305–11.

Pedroso RDS, Ferreira JC, Candido RC. In vitro susceptibility to antifungal agents of environmental *Cryptococcus* spp. isolated in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2006; 101(3): 239-243.

Pedroso RS, Costa KRC, Ferreira JC, Candido RC. Evaluation of melanin production by *Cryptococcus* species in four different culture media. Rev Soc Bras Med Trop 2007; 40:566-568.

Pedroso RS, Ferreira JC, Lavrador MA, Maffei CM, Candido RC. Evaluation of the experimental inoculation of *Cryptococcus albidus* and *Cryptococcus laurentii* in normal mice: virulence factors and molecular profile before and after animal passage. Mycopathologia 2009; 168(2):59–72.

Perfect JR, Magee BB, Magee PT. Separation of chromosomes of *Cryptococcus neoformans* by pulsed field gel electrophoresis. *Infection and immunity* 1989; 57(9): 2624-2627.

Pérez-Carrera E, Hansen M, León VM, Björklund E, Krogh KA, Halling- Sørensen B, et al. Multiresidue method for the determination of 32 human and veterinary pharmaceuticals in soil and sediment by pressurized-liquid extraction and LC-MS/MS. *Analytical and bioanalytical chemistry* 2010; 398(3):1173-1184.

Pfaller MA. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *The American journal of medicine* 2012; 125(1): S3-S13.

Pfeiffer T, Ellis D. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from California. *J Infect Dis* 1991; 163:929–930.

Pfeiffer TJ, Ellis DH. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus tereticornis*. *J Med Vet Mycol* 1992; 30:407–408.

Pikazis D, Xynos ID, Xila V, Velegraki A, Aroni K. Extended fungal skin infection due to *Aureobasidium pullulans*. *Clin Exp Dermatol* 2009; 34: e892 – e894.

Polak A. Melanin as a virulence factor in pathogenic fungi. *Mycoses* 1990; 33:215–224.

Polacheck I, Lebens GA. Electrophoretic karyotype of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Journal of general microbiology* 1989; 135(1): 65-71.

Prenafeta-Boldu FX, Summerbell R, de Hoog S. Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard? *FEMS Microbiol Rev* 2006; 30:109–130.

Pritchard RC, Muir DB. Black fungi: a survey of dematiaceous hyphomycetes from clinical specimens identified over a five-year period in a reference laboratory. *Pathology* 1987; 19:281–284.

Ragupathi L, Reyna M. Case report of *Cryptococcus albidus* peritonitis in a peritoneal dialysis patient and a review of the literature. *Peritoneal Dialysis International*; 2014 pdi-2013.

Rakeman JL, Bui U, LaFe K, Chen YC, Honeycutt RJ, Cookson BT. Multilocus DNA sequence comparisons rapidly identify pathogenic molds. *Journal of clinical microbiology* 2005; 43(7): 3324-3333.

Ramchandren R, Gladstone DE. *Cryptococcus albidus* infection in a patient undergoing autologous progenitor cell transplant. *Transplantation* 2004; 77:956.

Randhawa HS, Kowshik T, Khan ZU. Decayed wood of *Syzygium cunini* and

Ficus religiosa living trees in Delhi/New Delhi metropolitan area as natural habitat of *Cryptococcus neoformans*. Medical Mycology 2003; 41(3):199-209.

Raso TF, Werther K, Miranda ET, Mendes-Giannini MJ. Cryptococcosis outbreak in psittacine birds in Brazil. Med Mycol 2004; 42(4):355–62.

Rath PM, Müller KD, Dermoumi H, Ansorg R. A comparison of methods of phenotypic and genotypic fingerprinting of *Exophiala dermatitidis* isolated from sputum samples of patients with cystic fibrosis. Journal of medical microbiology 1997; 46(9): 757-762.

Refojo N, Perrotta D, Brudny M, Abrantes R, Hevia AI, Davel G. Isolation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from trunk hollows of living trees in Buenos Aires City, Argentina. Medical Mycology 2009; 47(2): 177-184.

Revankar SG, Sutton DA. Melanized fungi in human disease. Clin Microbiol Rev 2010; 23:884 –928.

Ribeiro MA, Ngamskulrungrroj P. Molecular characterization of environmental *Cryptococcus neoformans* isolated in Vitoria, ES, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo 2008; 50: 315–20.

Rippon JW. Medical mycology, 2nd ed. Philadelphia. The W.B. Saunders Co;1982.

Rivas F, de Martin MC, Rojas V. *Cryptococcus neoformans* isolation from the soil in Panama. Rev Med Panama 1999; 24(1): 4-6.

Ruibal C, Gueidan C, Selbmann L, Gorbushina AA, Crous PW, Groenewald JZ, Muggia L, Grube M, Isola D, Schoch CL, Staley JT, Lutzoni F, de Hoog GS. Phylogeny of rock-inhabiting fungi related to Dothideomycetes. Stud Mycol 2009; 64:123–S7–133–S7.

Ruiz A, Fromtling RA, Bulmer GS. Distribution of *Cryptococcus neoformans* in a natural site. Infection and immunity 1981; 31(2): 560-563.

Saag MS, Graybill RJ, Larsen RA, Pappas PG, Perfect JR, Powderly WG, et al. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. Clinical Infectious Diseases 2000; 30(4): 710-718.

Sabo JA, Abdel-Rahman SM. Voriconazole: a new triazole antifungal. Ann Pharmacother 2000; 34: 1032–43.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, pp.7.19-7.22.

Santos C, Paterson RRM, Venâncio A, Lima N. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Journal of applied microbiology 2010; 108(2):375-385.

Sartoris KE, Baillie GM, Tiernan R, Rajagopalan PR. Phaeohyphomycosis from *Exophiala jeanselmei* with concomitant *Nocardia asteroides* infection in a renal transplant recipient: case report and review of the literature. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* 1999; 19(8): 995-1001.

Schreck E, Geret F, Gontier L, Treilhou M. Development and validation of a rapid multiresidue method for pesticide determination using gas chromatography–mass spectrometry: a realistic case in vineyard soils. *Talanta* 2008; 77(1):298-303.

Schnitzler N, Peltroche-Llacsahuanga H, Bestier N, Zundorf J, Lutticken R, Haase G. Effect of melanin and carotenoids of *Exophiala (Wangiella) dermatitidis* on phagocytosis, oxidative burst, and killing by human neutrophils. *Infect Immun* 1999; 67:94 –101.40.

Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W. Fungal Barcoding Consortium Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109:6241–6246.

Seyedmousavi S, Guillot J, de Hoog GS. Phaeohyphomycoses emerging opportunistic diseases in animals. *Clin Microbiol Rev* 2013; 26:19 –35.

Seyedmousavi S, Netea MG, Mouton JW, Melchers WJ, Verweij PE, de Hoog GS. Black Yeasts and Their Filamentous Relatives: Principles of Pathogenesis and Host Defense. *Clinical microbiology reviews* 2014; 27(3):527-542.

Shankar EM, Kumarasamy N, Bella D, Renuka S, Kownhar H, Suniti S, et al. Pneumonia and pleural effusion due to *Cryptococcus laurentii* in a clinically proven case of AIDS. *Can Respir J* 2006; 13: 275 -278.

Sharkey PK, Graybill JR, Rinaldi MG, Stevens DA, Tucker RM, Peterie JD, Hoepfich PD, Greer DL, Frenkel L, Counts GW. Itraconazole treatment of phaeohyphomycosis. *J Am Acad Dermatol* 1990; 23:577 – 586.

Sharpton TJ, Neafsey DE, Galagan JE, Taylor JW. Mechanisms of intron gain and loss in *Cryptococcus*. *Genome Biol* 2008; 9(1): R24.

Silva ME. Ocorrência de *Cryptococcus neoformans* e *Microsporium gypseum* em solos da Bahia, Brasil. *Bol Fund Gonçalo Moniz*. 1960;17:1-14

Silva DC, Martins MA, Szeszs MW, Bonfietti LX, Castro e Silva DM, Melhem MSC. Susceptibility to Antifungal Agents and Genotypes of Clinical and Environmental *Cryptococcus gattii* strains. *Diag Microbiol Infect Dis* 2012;72: 332-339.

SINDAG. Sindicato Nacional das Indústrias de Defensivos Agrícolas. Vendas de defensivos agrícolas são recordes e vão a US\$ 8,5 bi em 2011 [internet]. Porto Alegre; 2012. [acesso em 2013 jan 15]. Disponível em:

http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=2256.

Sionov E, Chang YC, Garraffo HM, Kwon-Chung KJ. Heteroresistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* is intrinsic and associated with virulence. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2009; 53(7), 2804-2815.

Sionov E, Lee H, Chang YC, Kwon-Chung KJ. *Cryptococcus neoformans* overcomes stress of azole drugs by formation of disomy in specific multiple chromosomes. *PLoS pathogens* 2010; 6(4), e1000848.

Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2011; 75(2): 213-267.

Snelders E, Huis in't Veld RA, Rijs AJMM, Kema GHJ, Melchers WJG, Verweij PE. Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75(2):4053- 4057.

Sorrel TC. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Medical Mycology* 2001; 39(2):55-168.

Staib F. *Cyptococcus neoformans* und *Guizotia abyssinica* (syn. *G. oleifera* DC). *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten, medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Virologie*, 1962; 148(5):466-475.

Stephen C, Lester S, Black W, Fyfe M, Raverty S. Multispecies outbreak of cryptococcosis on southern Vancouver Island, British Columbia. *Can Vet J* 2002; 43:792–794.

Sudduth EJ, Crumbley AJ, Farram WE. Phaeohyphomycosis due to *Exophiala* species: clinical spectrum of disease in humans. *Clinical infectious diseases* 1992; 15(4): 639-644.

Tadeo JL, Sánchez-Brunete C, Albero B, García-Valcárcel AI. Application of ultrasound-assisted extraction to the determination of contaminants in food and soil samples. *Journal of Chromatography A* 2010; 1217(16):2415-2440.

Takahara M, Imafuku S, Matsuda T, Uenotsuchi T, Matsumoto T, Padhye AA, Furue M. Concurrent double infections of the skin: phaeohyphomycosis and nocardiosis in a patient with idiopathic thrombocytopenic purpura. *J Am Acad Dermatol* 2005; 53:S277–S280.

Teodoro VLI, Gullo FP, Sardi JDGO, Torres, EM, Fusco-Almeida A, Mendes-Giannini MJS. Environmental isolation, biochemical identification, and antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus* species. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2013; 46(6): 759-764.

Thornewell SJ, Peery RB, Skatrud PL. Cloning and characterization of *CneMDR1*: a *Cryptococcus neoformans* gene encoding a protein related to multidrug resistance proteins. *Gene* 1997; 201: 21–29.

- Turnidge J, Paterson DL. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. *Clinical microbiology reviews* 2007; 20(3):391-408.
- Vaclavik E, Halling-Sorensen B, Ingerslev F. Evaluation of manometric respiration tests to assess the effects of veterinary antibiotics in soil. *Chemosphere* 2004; 56:667–676.
- Vadkertiova R, Slavikova E. Killer activity of yeasts isolated from the water environment. *Can J Microbiol* 1995; 41:759–766.
- Vanden Bossche H, Marichal P, Gorrens J, Bellens D, Moereels H, Janssen, PAJ. Mutation in cytochromeP450-dependent 14 a-demethylase results in decreased affinity for azole antifungals. *Biochem Soc Trans* 1990; 18:56-59.
- Varma A, Kwon-Chung KJ. Heteroresistance of *Cryptococcus gattii* to fluconazole. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2010; 54(6): 2303-2311.
- Vicente VA, Attili-Angelis D, Pie MR, Queiroz-Telles F, Cruz LM, Najafzadeh MJ, de Hoog S, Zhao J, Pizzirani-Kleiner A. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. *Stud Mycol* 2008; 61:137–144.
- Vilcins I, Krockenberger M, Agus H, Carter D. Environmental sampling for *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from the Blue Mountains National Park, Sydney, Australia. *Med Mycol* 2002; 40:53–60.
- Vlchkova-Lashkoska M, Kamberova S, Starova A, Goleva-Mishevaska L, Tsatsa Biljanovska N, Janevska V, et al. Cutaneous *Cryptococcus laurentii* infection in a human immunodeficiency virus negative subject. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2004; 18: 99-100.
- Wang Y, Casadevall A. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. *Applied and environmental microbiology* 1994; 60(10): 3864-3866.
- Wardle DA, Parkinson, D. Effects of three herbicides on soil microbial biomass and activity. *Plant and Soil* 1990; 122:21-28.
- Wells GM, Gajjar A, Pearson TA, Hale KL, Shenep JL. Brief report. Pulmonary cryptosporidiosis and *Cryptococcus albidus* fungemia in a child with acute lymphocytic leukemia. *Med Pediatr Oncol* 1998; 31:544-546.
- Woollons A, Darley CR, Pandian S, Arnstein P, Blackee J, Paul J. Phaeohyphomycosis caused by *Exophiala dermatitidis* following intra- articular steroid injection. *British Journal of Dermatology* 1996; 135(3): 475- 477.
- Yamamura AAM, Freire RL, Yamamura MH, Felix A, Taroda A. Study of ecological niches from pathogenic yeasts of the species *Cryptococcus*

neoformans and *Cryptococcus gattii* in Londrina City, PR. Semina: Ciências Agrárias (Londrina) 2013; 34(2):793-803.

Yamamoto Y, Kohno S, Noda T, Kakeya H, Yanagihara K, Ohno H, et al. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from environments (pigeon excreta) in Nagasaki. The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases 1995; 69(6):642-645.

Yamazumi T, Pfaller MA, Messer SA, Houston A, Hollis RJ, Jones RN. In vitro activities of Ravuconazole (BMS-207147) against 541 clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2000; 44(10): 2883-2886.

Yang YL, Lin CC, Chang TP, Lauderdale TL, Chen HT, Lee CF, et al. (2012). Comparison of human and soil *Candida tropicalis* isolates with reduced susceptibility to fluconazole. PloS one 2012; 7(4):e34609.


Zaragoza O, Mesa-Arango AC, Gómez-López A, Bernal-Martinez L, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Process analysis of variables for standardization of antifungal susceptibility testing of non-fermentative yeasts. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55(4): 1563-1570.

Zeng JS, Sutton DA, Fothergill AW, Rinaldi MG, Harrak MJ, de Hoog GS. Spectrum of clinically relevant *Exophiala* species in the United States. J Clin Microbiol 2007; 45: 3713 – 3720.


ANEXOS

Anexo 1

Handwritten note: José Maria



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
CONSELHO TÉCNICO CIENTÍFICO – CTC / IAL



São Paulo, 04 de abril de 2012
Ref: SISRAD

Projeto Multicêntrico: **48 D/2011**
Caracterização molecular e perfil de susceptibilidade de *Cryptococcus* e outra leveduras melanizadas de ambiente contaminado com fungicidas azólicos.

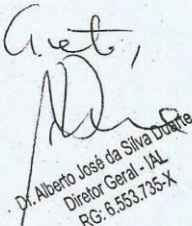
Coordenação: **Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem – CRL-Rio Claro**

Prezado Diretor Geral,

Encaminho o projeto citado acima, e o parecer final do CTC para avaliação e aprovação pela Diretoria Geral. De acordo com o fluxograma de avaliação dos projetos de pesquisa solicito que o mesmo seja devolvido ao CTC para os devidos encaminhamentos.


A proposta foi elaborada para desenvolvimento de tese de doutorado da aluna Juliana Possatto Takahashi, sob a orientação da Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem, com insumos adquiridos pelo IAL (meios de cultura e material descartável) e com recursos a serem solicitados a FAPESP e ao PPG-CCD/SES (verba de bancada).

O projeto foi avaliado e aprovado quanto ao Mérito Científico pelo CTC.



Dr. Alberto José da Silva Duarte
Diretor Geral - IAL
RG: 6.553.735-X

Atenciosamente,



MARIA DO CARMO SAMPAIO TAVARES TIMENETSKY
PRESIDENTE DO CTC/IAL

Anexo 2

São Paulo, 10 de agosto de 2012.

Instituto Adolfo Lutz
Centro de Parasitologia e Micologia
Núcleo de Micologia
Av. Dr. Arnaldo, nº 355, Pacaembu, São Paulo
CEP: 01246-000
Tel: (11) 3088-3041

Prezados,

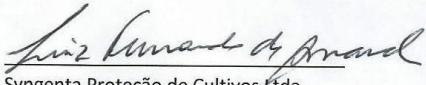
A Syngenta Proteção de Cultivos Ltda., empresa socialmente responsável, realiza, dentre outras atividades, a comercialização de defensivos agrícolas, tais como os fungicidas Ciproconazole, Difenconazole e Propiconazole, que são produtos devidamente registrados perante os órgãos competentes e passíveis de serem comercializados de acordo com a legislação brasileira.

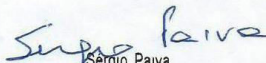
Tendo em vista o conhecimento de que o Instituto Adolfo Lutz, é uma instituição voltada à pesquisa, dentre outras coisas, e que uma de suas alunas, a Sra. Juliana Possatto Takahashi, R.G. nº 40.625.732-2, sob orientação da pesquisadora do Núcleo de Micologia e Coordenadora do Instituto Adolfo Lutz, Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem, R.G. nº 4.111.600, está desenvolvendo o projeto "Caracterização molecular e perfil de suscetibilidade de *Cryptococcus* e outras leveduras melanizadas de ambiente contaminado com fungicidas azólicos", a Syngenta Proteção de Cultivos Ltda vem atender ao requerimento efetuado pelo Instituto Adolfo Lutz e, por meio do presente documento, indica a doação dos seguintes defensivos agrícolas nas quantidades doravante indicadas:

Ciproconazole: 100g/L,
Difenconazole: 250g/L,
Propiconazole: 250g/L.

Ao aceitar a doação dos materiais acima mencionados o Instituto Adolfo Lutz compromete-se a utilizar os materiais de acordo com os objetivos da instituição, comprometendo-se a não revender os materiais ou utilizá-los como forma de obtenção de renda, bem como utilizá-los de acordo com a legislação vigente.

Atenciosamente,

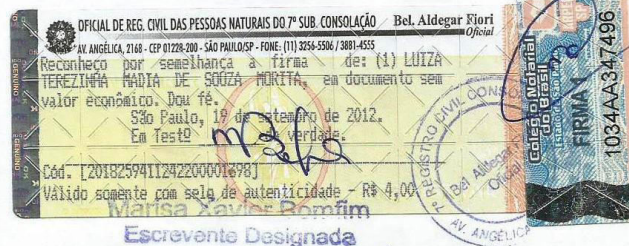

Syngenta Proteção de Cultivos Ltda.
Luiz Fernando Amaral
Pesquisa e Desenvolvimento
LATAM


Sergio Paiva
Pesquisa & Desenvolvimento
Syngenta Proteção de Cultivos Ltda

Em, 10 de agosto de 2012, declaro que li e aceito os termos acima:

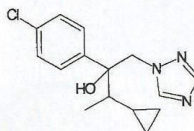

Instituto Adolfo Lutz

Luíza Terezinha M. de Souza
Diretora Geral Substituta - IAL



Certificate of Analysis

Cyproconazole (SAN619)



WRS 1161/2 - Purity 97.9 %

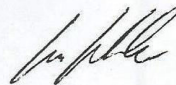
Batch Identification	WRS 1161/2
Product Code	Cyproconazole
Other Product Code(s)	SAN619
ISO Common Name	Cyproconazole
CA Reg. No.	94361-06-5
CA Index Name	1H-1,2,4-triazole-1-ethanol, alpha-(4-chlorophenyl)-alpha-(1-cyclopropylethyl)-
IUPAC Name	2-(4-chloro-phenyl)-3-cyclopropyl-1-[1,2,4]triazol-1-yl-butan-2-ol
Molecular formula	C ₁₅ H ₁₈ ClN ₃ O
Molecular mass	291.8
Chemical Analysis	
- Identity*	confirmed
- Content of Cyproconazole *	97.9 %
Methodology used for Characterization / Recertification	HPLC, ¹ H-NMR, Karl Fischer Titration
Physical Analysis	
- Appearance *	white powder
Stability:	
- Storage Temperature	< 30°C
- Recertification Date	End of March 2016

If stored under the conditions given above, this test substance can be considered stable until the recertification date is reached.

This Certificate of Analysis summarizes data which originates either from a single study or from several individual studies. Tests marked with an asterisk (*) have been conducted in compliance with GLP. Raw data, documentation, study plans, any amendments to study plans and reports pertaining to this/these study/studies are stored under the study number(s) referenced below within the archives of the GLP Testing Facility WMU at Syngenta Crop Protection Muenchwilen AG.

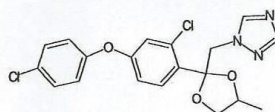
Study number of batch characterization: SMG10395
 Study number(s) of batch recertification: 124177

Authorisation: *March 22, 2012*


 U. Spuhler
 Analytical Development & Product Chemistry

Certificate of Analysis

Difenoconazole



WRS 1324/1 - Purity 96.3 %

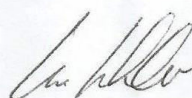
Batch Identification	WRS 1324/1
Product Code	CGA169374
Other Product Code(s)	---
ISO Common Name	Difenoconazole
CA Reg. No.	119446-68-3
CA Index Name	1H-1,2,4-triazole, 1-[[2-[2-chloro-4-(4-chlorophenoxy)phenyl]-4-methyl-1,3-dioxolan-2-yl]methyl]-
IUPAC Name	cis,trans-3-chloro-4-[4-methyl-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-2-yl]phenyl 4-chlorophenyl ether
Molecular formula	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃
Molecular mass	406.3
Chemical Analysis	
– Identity of Difenoconazole *	confirmed
– Content of Difenoconazole *	96.3 %
Methodology used for Characterization / Reanalysis	GC, ¹ H-NMR, titration Karl Fischer
Physical Analysis	
– Appearance *	white powder
Stability:	
– Storage Temperature	< 30°C
– Reanalysis date	End of June 2013

The stability of this test substance will be controlled by reanalysis of material held in the inventory at Syngenta Crop Protection Mönchwil AG at the appropriate time.

This Certificate of Analysis summarizes data which originates either from a single study or from several individual studies. Tests marked with an asterisk (*) have been conducted in compliance with GLP. Raw data, documentation, study plans, any amendments to study plans and reports pertaining to this/these study/studies are stored under the study number(s) referenced below within the archives of the GLP Testing Facility WMU at Syngenta Crop Protection Mönchwil AG.

Characterization: 120051 Reanalysis:

Authorization:

30-June-2009 

Urs Spuhler
Analytical Development & Product Chemistry