

***Candida* spp. isoladas de área natural e de cultivo: resistência a fluconazol como biomarcador ambiental**

***Candida* spp. natural area and cultivar isolated: resistance to fluconazole as an environmental biomarker**

DOI:10.34117/bjdv6n11-122

Recebimento dos originais:08/10/2020

Aceitação para publicação:06/11/2020

**Manoel Paiva de Araújo Neto**

Doutorado em Reprodução e Sanidade Animal

Instituto Federal do Ceará Campus Acaraú

Endereço: Av. Des. Armando de Sales Louzada, s/n, CEP: 62580-000 – Monsenhor José Edson

Magalhães– Acaraú – CE

E-mail:manoel.paiva@ifce.edu.br

**Gerlane Luziana de Maria**

Mestrado em Microbiologia Médica

Instituto Federal do Ceará Campus Acaraú

Endereço: Av. Des. Armando de Sales Louzada, s/n, CEP: 62580-000 – Monsenhor José Edson

Magalhães– Acaraú – CE

E-mail:gerlaneluziana@mail.com

**Liliane Menezes dos Santos**

Nível Técnico - Iniciação Científica

Instituto Federal do Ceará Campus Acaraú

Endereço: Av. Des. Armando de Sales Louzada, s/n, CEP: 62580-000 – Monsenhor José Edson

Magalhães– Acaraú – CE

E-mail:lilimassoterapia@hotmail.com

**Maria Milena dos Santos Targino**

Nível Técnico - Iniciação Científica

Instituto Federal do Ceará Campus Acaraú

Endereço: Av. Des. Armando de Sales Louzada, s/n, CEP: 62580-000 – Monsenhor José Edson

Magalhães– Acaraú – CE

E-mail:miletargino156@gmail.com

**Maria José do Nascimento Lima**

Nível Médio - Iniciação Científica

Instituto Federal do Ceará Campus Acaraú

Endereço: Av. Des. Armando de Sales Louzada, s/n, CEP: 62580-000 – Monsenhor José Edson

Magalhães– Acaraú – CE

E-mail: mariamj050798@gmail.com

**RESUMO**

Devido à demanda populacional, o aumento de áreas agrícolas vêm crescendo, juntamente com a utilização de agroquímicos, que podem selecionar populações microbianas e causar alterações no metabolismo desses microrganismos. Assim, o crescente despejo de agrotóxicos, que vem se tornando um dos principais problemas da atualidade, compromete a qualidade ambiental e humana, e deve ser monitorado adequadamente. Desta forma, a utilização de bioindicadores se torna uma ferramenta importante para a investigação deste tipo de impacto ambiental. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o perfil de sensibilidade em leveduras isoladas de solos cultivados impactados com fungicidas com o de ambiente de mata nativa. Para tanto as amostras foram coletada em duas áreas diferentes, uma de mata nativa e uma área de cultivo com uso de fungicidas, entre os meses de agosto de 2019 e janeiro de 2020. Para tanto, um total de 30 amostras, cinco de cada área por coleta, foram semeadas em Ágar sabouraud acrescido de cloranfenicol (0,5 g/L) e em Ágar sabouraud acrescido de cloranfenicol (0,5 g/L) e fluconazol (64 µg/mL). As cepas foram identificadas pela realização de auxonograma, zimograma, análise macro e micromorfológica, e confirmação molecular. As cepas isoladas foram submetidas ao teste de difusão em poço, com uso de fluconazol nas concentrações de 300, 500 e 700 µg/mL. Como controle foi utilizado a cepa *Candida parapsilosis* ATCC 22019. Foram isoladas 53 leveduras, pertencentes ao gênero *Candida*, sendo as espécies *Candida guilliermondii*, seguida de *Candida parapsilosis sensu lato* e *Candida albicans*, as mais frequentes ( $p=0,0017$ ). A utilização do meio com adição de fluconazol para o isolamento foi eficiente para seleção de cepas resistentes ( $p=0,04$ ). A área de mata nativa apresentou um número maior de cepas resistente ao fluconazol, com 35% em relação à 15% de resistência na área de cultivo. O fluconazol juntamente com outros antifúngicos é a primeira linha de escolha na terapia antifúngica a depender do caso, logo, a resistência a esse medicamento causa preocupação. Destaca-se ainda, que o processo de detoxificação celular pode promover a supreeexpressão de bombas de efluxo de membrana, o que pode explicar esse fenômeno de resistência observado.

**Palavras-Chave:** Contaminação ambiental, Resistência a Azólicos, Levedura.

**ABSTRACT**

Due to population demand, the increase in agricultural areas has been growing, along with the use of agrochemicals, which can select microbial populations and cause changes in the metabolism of these microorganisms. Thus, the increasing dumping of agrochemicals, which is becoming one of the main problems of today, compromises environmental and human quality, and must be adequately monitored. In this way, the use of bioindicators becomes an important tool for the investigation of this type of environmental impact. Thus, this work aimed to evaluate the sensitivity profile in isolated yeasts of cultivated soils impacted with fungicides with that of native forest environment. The samples were collected in two different areas, one of native forest and one area of cultivation using fungicides, between the months of August 2019 and January 2020. For this purpose, a total of 30 samples, five from each area per collection, were sown on chloramphenicol (0.5 g/L) and chloramphenicol (0.5 g/L) and fluconazole (64 µg/mL) Sabouraud agar. The strains were identified by performing an auxonogram, zimogram, macro and micromorphological analysis, and molecular confirmation. The isolated strains were submitted to the well diffusion test, using fluconazole in concentrations of 300, 500 and 700 µg/mL. *Candida parapsilosis* ATCC 22019 strain was used as control. 53 yeasts belonging to the genus *Candida* were isolated, being the species *Candida guilliermondii*, followed by *Candida parapsilosis sensu lato* and *Candida albicans*, the most frequent ( $p=0.0017$ ). The use of medium with the addition of fluconazole for isolation was efficient for selection of resistant strains ( $p=0.04$ ). The area of native forest presented a higher number of fluconazole resistant strains, with 35% in relation to 15% resistance in the cultivation area. Fluconazole together with other antifungals is the first line of choice in

antifungal therapy depending on the case, so resistance to this drug causes concern. It is also noted that the cell detoxification process may promote the overexpression of membrane efflux pumps, which may explain this observed resistance phenomenon.

**Keywords:** Environmental contamination, Azolic resistance, Yeast.

## 1 INTRODUÇÃO

A vida humana permanece alicerçada nos ecossistemas do solo, no entanto a intensidade e a forma como é utilizado mostra que há muito a ser descoberto sobre solos e suas relações com os organismos, mas é sabido que quando o ambiente está equilibrado possui características microbianas ideais para conversão e degradação da matéria orgânica (WARDLE et al., 2004). No entanto em virtude do crescimento demográfico, áreas que eram equilibradas por serem nativas, estão sendo agora destinadas aos diversos tipos de cultivo (ESPINDOLA; CUNHA, 2015).

A agricultura gera grande impacto sobre os organismos do solo, mas o conhecimento sobre esses organismos ainda é limitado. Devido às mudanças ocasionadas pelos cultivos, nessas áreas ocorre uma alteração na composição, produtividade, taxas de decomposição e muitas outras propriedades do solo, principalmente por conta das alterações nas comunidades microbianas residentes. Desta forma, a agricultura muda os ciclos de nutrientes e da biodiversidade no ecossistema afetado. Esses processos são bem conhecidos, mas os mecanismos que afetam a resposta microbiana nesses ecossistemas e o impacto dos mesmos na diversidade, estrutura e comportamento dos microrganismos das camadas mais superficiais do solo ainda precisam ser esclarecidos (YURKOV et al., 2012; WARDLE et al., 2004).

Um dos componentes do ecossistema do solo são os fungos, e estes estão relacionados com a decomposição e liberação de nutrientes (CHRISTENSEN, 1989). Esses microrganismos são eucariotos, e conforme a morfologia é dividida, em filamentosos e leveduras. Os filamentosos são multicelulares e possui filamentos longos de células conectadas denominadas hifas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). As leveduras são unicelulares, variando de brancos a avermelhados (DE HOOG et al., 2002).

Existem inúmeros estudos relacionados ao levantamento de espécies de leveduras sobre os meios de isolamento utilizado pelo pesquisador. Mas pouco se sabe acerca do que ocorre em leveduras numa amostra particular do solo (BOTHÁ, 2006). Ademais, existem muitos trabalhos relacionando a resistência fúngica em amostras clínicas mas quando comparadas às amostras ambientais essas ainda são escassas (CASTELO-BRANCO et al., 2020).

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi investigar o uso de leveduras isoladas de solos cultivados impactados com agrotóxicos e de ambiente de mata nativa como bioindicadores ambientais, e identificar e quantificar leveduras do gênero *Candida* spp. isoladas das áreas de estudo afim de avaliar a resistência de *Candida* spp. a fluconazol por meio do teste de difusão em poço.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1 Área de estudo

Este trabalho foi realizado no Perímetro Irrigado Baixo Acaraú, localizado na região Norte do estado do Ceará. A temperatura varia de 26° C a 28° C. As médias anuais da umidade relativa e da velocidade do vento são de 70%. As chuvas ocorrem principalmente nos meses de fevereiro a abril (IPECE, 2017). As amostras foram coletas em duas áreas diferentes, uma de mata nativa e uma área com cultivo com aplicação de fungicidas. Os fungicidas utilizados na área estão listados na tabela 1.

Tabela 1 – Fungicidas utilizados na área estudadas

Princípio ativo	Classificação toxicológica	Registro no MAPA*
Azoxistrobina + Ciproconazole	III – medianamente tóxico	04903
Benzimidazol	III – medianamente tóxico	03406
Hidroxido de cobre	III – medianamente tóxico	1208
Tiofanato-Metfílico	III – medianamente tóxico	01228309
Mancozebe	III – medianamente tóxico	06313
Tiofanatometilico+Clorotalonil	I – extremamente tóxico	02188606

\*MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

### 2.2.2 Colheita do solo

Antes da colheita das amostras, foi removido manualmente a serapilheira presente na superfície do solo. As amostras de solo foram colhidas segunda RECH et al., (2013) com modificações, no qual foram selecionados três pontos em cada planta, no total de dez plantas para cada área. Com o auxílio de uma espátula foi coletado o solo a uma profundidade de 0-20 cm.

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

### 2.2.3 Isolamento dos microrganismos do solo

O isolamento seguiu a metodologia utilizada por Abboud (2011) e Pinotti et al. (2011), com modificações. Realizado através da técnica de diluições seriadas, onde 1 g do solo foi homogeneizada com 9 mL de salina. Em seguida 1mL dessa solução foi adicionado 9mL de salina. Seguiu-se o

protocolo até chegar em diluição de  $10^3$ . Da diluição final foi retirada uma alíquota de 20  $\mu$ L para semeadura em placa. Foi utilizado o meio de cultura ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol (0,5 g/L), para o isolamento primário.

#### **2.2.4 Isolamento leveduras resistentes e identificação das leveduras**

Para o isolamento de leveduras resistentes foi utilizado o meio ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol (0,5g/L) e fluconazol em uma concentração de 64  $\mu$ g/mL.

Posteriormente as colônias foram submetidas a coloração de Gram para confirmação de leveduras e descarte de contaminação bacteriana. Em seguida, as leveduras foram identificadas em nível de gênero e, quando possível, à espécie, por meio da realização de testes morfológicos e bioquímicos específicos (BRILHANTE et al., 2011; BRILHANTE et al., 2010, CASTELO-BRANCO et al., 2020). Adicionalmente foi realizado a identificação molecular para identificação das cepas, de acordo com metodologia proposta por Tavanti et al. (2005) e Feng et al. (2014), cujo a extração do DNA foi feita por meio do kit High Pure PCR Template Preparation (Roche Applied Science kit, Germany).

#### **2.2.5 Difusão em poço**

O teste de difusão em poço foi baseado em Bona et al., (2009) e Silveira et al., (2009), ambos com modificações. O teste foi realizado para determinar a sensibilidade das leveduras que foram isolados do meio contendo fluconazol. O teste é de caráter qualitativo, e avaliou se a levedura é ou não resistente. As leveduras foram submetidas a crescimento prévio de 48 horas em meio ágar batata dextrose.

A partir das culturas foi feito um inóculo em 2 mL de salina, ajustado a turbidez de acordo com padrão 0,5 da escala McFarland, em que a suspensão permaneceu em repouso por até cinco minutos. Foi preparado previamente as placas de petri contendo meio ágar batata e devidamente identificadas. Com um *swab* estéril foi feito a semeadura em placa, em seguida com uma pipeta Pasteur foi feito quatro poços equidistantes, no qual foram adicionados 20  $\mu$ L de fluconazol em cada poço, para cada concentração testada. A droga foi diluída previamente em 2 mL de água destilada nas concentrações de 300 $\mu$ L, 500 $\mu$ L e 700 $\mu$ L. No quarto poço foi utilizado salina estéril como controle negativo.

A leitura das placas foi realizada em 24-48 horas. Foi utilizado a cepa *Candida parapsilosis* ATCC 22019 como controle do experimento.

### 2.2.6 Análise estatística

Os resultados foram submetidos ao teste ANOVA e para a comparação entre as médias foram utilizados os testes Mann Whitney e Kruskal-Wallis. O Software utilizado foi o GraphpadPrism® 6.0, e a diferença foi considerada significativa quando  $p \leq 0,05$ .

### 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas e identificadas 53 leveduras nas duas áreas de estudo, todas pertencentes ao gênero *Candida*. A espécie *Candida guilliermondii* (19/53; 36%), foi a que apresentou maior número de isolados, seguida de *Candida parapsilosis sensu lato* (18/53; 34%), *C. famata* (10/53; 19%) e *C. albicans* (6/53; 11%).

O gênero *Candida* é reconhecido como agentes de infecções em hospitais, e responde por cerca de 80% das infecções fúngicas documentadas. Assumi grande importância pela alta frequência com que colonizam e infectam o hospedeiro humano (COLOMBO, GUIMARÃES, 2003).

Diferentes espécies de levedura têm sido isoladas de uma grande variedade de ecossistemas e as espécies isoladas com maior frequência no ambiente terrestre pertencem aos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* *Trichosporon* (BOTHA, 2006; SLAÁVIKOVÁ; VADKERTIOVA, 2003).

Com relação a distribuição das espécies fúngicas nos diferentes sítios de coleta e meios de isolamento, a área com agrotóxico sem fluconazol apresentou o maior número de isolados, (22/53; 41%), seguido da mata nativa sem fluconazol (11/53; 21%), os isolados com agrotóxico com fluconazol e mata nativa com fluconazol apresentaram o mesmo valor (10/ 53; 19%), como mostra a tabela 2.

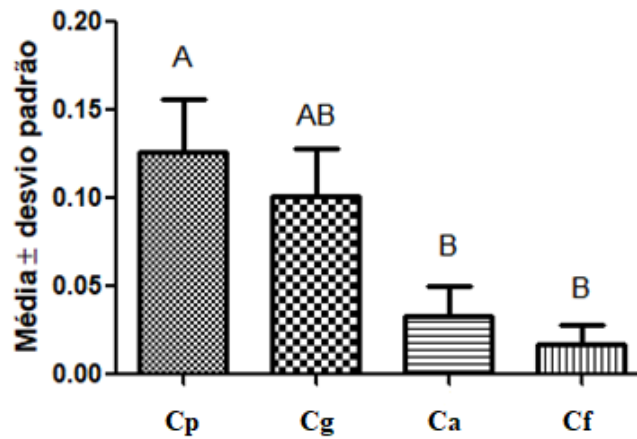
Tabela 2 – Distribuição das espécies fúngicas nos diferentes sítios de coleta e meios de isolamento.

Espécies	SFLZ		CFLZ	
	ACA	MN	ACA	MN
<i>C. parapsilosis sensu lato</i>	8	7	3	1
<i>C. guilliermondii</i>	9	3	3	3
<i>C. albicans</i>	3	1	2	0
<i>C. famata</i>	2	0	2	6
<b>TOTAL</b>	<b>22</b>	<b>11</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

ACA = área de cultivo com agrotóxico; MN – Mata nativa; SFLZ – sem fluconazol; CFLZ – com fluconazol.

A análise da dispersão de fungos isolados a partir de meio de cultura sem adição de fluconazol, mostrou que *Candida parapsilosis sensu lato* mostrou dominância em relação as outras espécies (Figura 1).

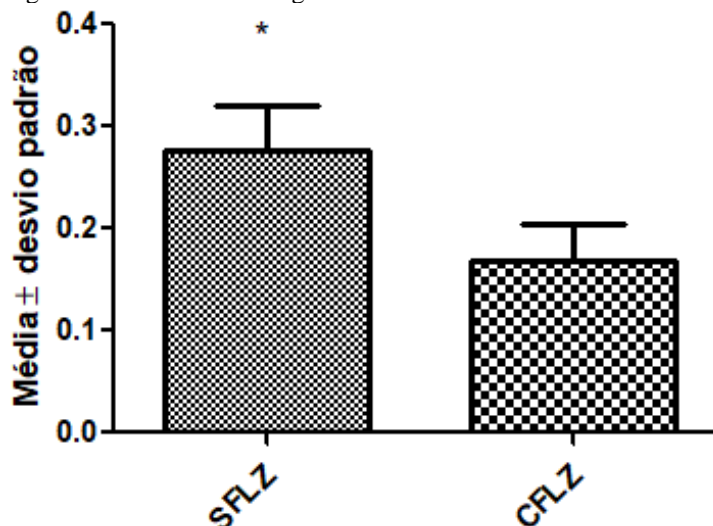
Figura1 – Dispersão de fungos isolados a partir de meio de cultura sem adição de fluconazol, teste de Kruskal Wallis, diferença estatística significativa (p = 0,0017). Cp – *Candida parapsilosis*. Cg – *Candida guilliermondii*; Ca – *Candida albicans*; Cf – *Candida famata*.



Em um trabalho realizado por Costa (2006), sobre um levantamento da diversidade de leveduras do solo na região do semiárido da Bahia, as espécies pertencentes aos gêneros *Candida*, *Cryptococcus* e *Rhodotorula*, com dez, cinco e quatro espécies, respectivamente foram às espécies com maior frequência de isolamento, no qual *Candida parapsilosis* aparece com uma das espécies mais frequentes corroborando com esse estudo.

A partir da análise da diversidade fúngica nos diferentes meios de isolamento, foi constatado que houve diferença nos dois meios de isolamento, no qual o meio sem fluconazol apresentou maior diversidade (Figura 2).

Figura 2 – Diversidade fúngica nos diferentes meios de isolamento.



SFLZ – sem fluconazol; CFLZ – com fluconazol; \*Diferença estatística significativa, Teste Mann Whitney (p = 0,04).

As leveduras que foram isoladas das amostras do meio com adição de fluconazol foram submetidas ao teste de difusão em poço. A área de mata nativa apresentou o maior número de isolados resistentes ao fluconazol (7/20; 70%), em todas as concentrações testadas, sendo uma cepa de *C. parapsilosis sensu lato* resistente apenas na menor concentração, enquanto que a área com agrotóxico teve um menor número de isolados resistente ao fluconazol (3/20; 30%), como mostra a tabela 3.

Tabela 3 – Resultado do teste de difusão em poço da resistência ao fluconazol em diferentes concentrações.

Identificação	Áreas de coleta		Concentração 300µL	Concentração 500 µL	Concentração 700 µL
	MN	CA	Fluconazol	Fluconazol	Fluconazol
<i>C. guilliermondii</i>	3 <sup>L</sup>	-	R (2) <sup>n</sup> S (1)	R (2) <sup>n</sup> S (1)	R (2) <sup>n</sup> S (1)
	-	3 <sup>L</sup>	R (1) S (2)	R (1) S (2)	R (1) S (2)
<i>C. parapsilosis sensu lato</i>	1 <sup>L</sup>	-	R (1)	S (1)	S (1)
	-	3 <sup>L</sup>	R (1) S (1)	R (1) S (2)	R (1) S (2)
<i>C. famata</i>	6 <sup>L</sup>	-	R (4) S (2)	R (4) S (2)	R (4) S (2)
	-	2 <sup>L</sup>	S (2)	S (2)	S (2)
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-
	-	2 <sup>L</sup>	R (1) S (1)	R (1) S (1)	R (1) S (1)

MN – Mata Nativa; CA – com agrotóxico; L – Leveduras isoladas por área de estudo; n – número de cepas isoladas de acordo com o perfil de sensibilidade; R – Resistente; S – Sensível.

Em um estudo realizado por Brilhante et al. (2012), foi avaliado a sensibilidade de *Candida spp.* isoladas do trato gastrointestinal de aves de rapina e observaram elevada proporção de cepas resistentes a azólicos, os pesquisadores sugeriram essa resistência, provavelmente, seria justificada pelo contato desses animais com alimento e ambientes próximo à regiões cultivadas que faziam o uso de antifúngicos agrícolas, que selecionaram e/ou modificaram o metabolismo desses fungos.

Embora a taxa de resistência clínica seja baixa, existem relatos de amostras ambientais que superam os valores de 75% de resistência em leveduras, o que é alarmante e pode estar diretamente relacionada à utilização de antifúngicos agrícolas próximo aos ambientes estudados (MEDEIROS et al., 2008; BRILHANTE et al., 2011; BRILHANTE et al., 2015; CASTELO-BRANCO et al., 2020).

Algumas cepas de leveduras, previamente considerados colonizadores simples ou contaminantes, são resistentes a diversas drogas antifúngicas disponíveis e podem causar infecções em humanos. Essas infecções são descritas com frequência crescente em relação às permissivas condições ambientais, a pressão seletiva antifúngica e a pacientes imunodeprimidos (CANUTO; RODERO, 2002; ENOCH; LUDLAM; BROWN, 2006; PFALLER; DIEKEMA, 2007).



Rodrigues et al., (2007) observaram a resistência em isolados de *Guignardia citricarpa*, obtidos em áreas com elevada frequência de aplicação de fungicidas benzimidazóis e que a aplicação de carbendazim e piraclostrobina, em folhas infectadas de áreas sem histórico de aplicação destes fungicidas, controla de forma eficiente a produção de ascósporos e decomposição da folha por *G. citricarpa*. A constatação de isolados resistentes ao carbendazim, obtidos em campo é um indício de que está surgindo resistência a esse fungicida nos pomares citrícolas brasileiros.

Segundo Veríssimo et al., (2016), a prevalência de isolados clínicos do gênero *Aspergillus* com resistência a azólicos tem aumentado. As razões propostas para tal situação incluem o desenvolvimento de uma resistência adquirida por falência de tratamento ou por prolongada profilaxia antifúngica. No entanto, a utilização de azólicos agrícolas e a inalação de isolados de origem ambiental resistentes a esses antifúngicos são uma das maiores e mais recentes preocupações.

A ocorrência de resistência a fungicidas é uma das mais importantes consequências da agricultura. Este fato pode ser resultado de mutações em genes codificadores de resistência a fungicidas ou a diferentes mecanismos que são induzidos por estresse devido a doses subletais dos produtos utilizados. Estes mecanismos produzem diferentes e variados níveis de resistência (DEISING; REIMANN; PASCHOLATI, 2008).

Neste estudo foi avaliado o perfil de resistência pela técnica de difusão em poço a partir do isolamento seletivo, com utilização de meio acrescido de antifúngico. Embora tenha sido observado uma diminuição na diversidade de isolados, 50% dos isolados apresentaram resistência na técnica de difusão em poço. Isso pode ser pelo fato do tempo de exposição ao meio para crescimento primário ser maior que aquele utilizado na metodologia de difusão (até 10 dias e 48 horas, respectivamente). Assim, sugerimos que sejam realizados mais testes, para avaliar qual o mecanismo de resistência observado.

Ademais, devido à exposição contínua que leveduras do gênero *Candida* estão submetidas no ambiente de cultivo, sugerimos que a resistência observada pode estar relacionada com superexpressão de bombas de efluxo, conforme já demonstrado em outros estudos (BRILHANTE et al., 2015; CASTELO-BRANCO et al., 2020)

O uso indiscriminado de grandes quantidades de antifúngicos na agricultura para proteção das culturas pode explicar esse fenômeno, milhares de toneladas de azólicos são usadas no mundo todos, há muito tempo (HOF, 2008).

Desta forma faz-se necessário avaliar o papel do uso de fungicidas sobre a diversidade e perfil de resistência em células planctônicas sobre espécies de *Candida*, uma vez que pode estar ocorrendo uma pressão seletiva na área, além do elevado número de isolados deste gênero resistente ao fluconazol.

### 3 CONCLUSÃO

A resistência a fluconazol foi observado em todos os gêneros isolados. Destaca-se que a área de mata nativa apresentou o maior número de isolados ao fluconazol.

A resistência observada nos isolados oriundos da mata nativa pode estar relacionada com a aplicação de fungicidas nas áreas de estudo ou próximos a elas. O fluconazol juntamente com outros antifúngicos é a primeira linha de escolha na terapia antifúngica a depender do caso, logo, a resistência a esse medicamento causa preocupação.

Os isolados de leveduras do gênero *Candida* resistente ao fluconazol, é preocupante, pois alerta para o surgimento de cepas ambientais resistente.

A resistência observada pode ser oriunda da superexpressão de bombas de efluxo, devido à resistência cruzada aos agrotóxicos utilizados no ambiente. Assim, mais estudos devem ser delineados para avaliar esta hipótese

### AGRADECIMENTOS

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FUNCAP - N° do Processo BP3-0139-00331.01.00/18. Pelo apoio e financiamento à pesquisa.

## REFERÊNCIAS

- ABBOUD, M. A. A. Bioimpact of application of pesticides with plant growth hormone (*gibberellic acid*) on target and non-target microorganisms. Journal of Saudi Chemical Society, v. 18, n.6, p. 1005-1010, 2014.
- BOTHA, A. Yeasts in soil. In: ROSA, C.; GÁBOR, P. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. Berlin: Springer, p. 371-417, 2006.
- BONA, E, A, M. et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. Arquivos do Instituto de Biologia, v.81, n.3, p. 218-225, 2014
- BRILHANTE, R. S. N. et al.. Characterization of the gastrointestinal yeast microbiota of cockatiels (*Nymphicus hollandicus*): a potential hazard to human health. Journal of Medical Microbiology, v.59, p.718-723, 2010.
- BRILHANTE, R. S. N. et al. Yeast from *Macrobrachium amazonicum*: a focus on antifungal susceptibility and virulence factors of *Candida* spp. FEMS Microbiology Ecology, Oxford, v. 76, n. 2, p. 268-177, 2011.
- BRILHANTE, R. S. N. et al. Yeast microbiota of raptors: a possible tool for environmental monitoring. Environmental Microbiology Reports, v. 4, n. 2, p.189-193, 2012.
- BRILHANTE, R. S. N. et al. Surveillance of Azole Resistance among *Candida* spp. as a Strategy for the Indirect Monitoring of Freshwater Environments. Water, Air and Soil Pollution (Print), [S.L.], v. 226, n.3, p.1-12, 2015.
- CANUTO, M. M.; RODERO, F. G. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. Lancet Infectious Diseases, v.2, n.9, p. 550-563, 2002.
- CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; PAIVA, M. A. N.; TEIXEIRA, C. E. C.; CAETANO, E. P.; GUEDES, G. M. M.; CODEIRO, R. A.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C. Azole resistance in *Candida* from animals calls for the One Health approach to tackle the emergence of antimicrobial resistance. Medical Mycology, v. xx, p. 1-10, 2020.
- COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.136, n.5, p. 599-607, 2003.
- CHRISTENSEN, M. A view of fungal ecology. Mycologia, v. 81, n.1, p.1-19, 1989.
- DEISING, H.B; REIMANN, S; PASCHOLATI, S. F. Mechanisms and significance of fungicide resistance. Brazilian Journal of Microbiology, v.39, n.2, p.286-295, 2008.
- DE HOOG GS, GUARRO J & GEN´E J (eds) Atlas of Clinical Fungi 2<sup>nd</sup> edition. Centraalbureau voor Schimmelcultuur. Universitat Rovira i Virgili, Delf. 2002

ENOCH, D. A.; LUDLAM, H. A.; BROWN, N. M. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. *Journal of Medical Microbiology*, v.55, n.7, p. 809-818, 2006.

FENG, L. et al. Relationship between antifungal resistance of fluconazole resistant *Candida albicans* and mutations in ERG11 gene. *Chinese Medical Journal*, v.123, n.5, p.544-548, 2010.

HOF, H. Is there a serious risk of resistance development to azoles among fungi due to the widespread use and long-term application of azole antifungals in medicine? *Drug Resistance Updates*, v.11, n.1-2, p.25-31, 2008.

IPECE - INSTITUTO DE PESQUISA E ESTRATÉGIA ECONÔMICA DO CEARÁ (IPECE). Perfil básico municipal de Acaraú. 2017.,m

MEDEIROS, A.O. et al. Diversity and antifungal susceptibility of yeasts from tropical fresh water environments in Southeastern Brazil. *Water Research*, v.42, n.14, p.3921-3929, 2008.

PFALLER, A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*, v.20, n.1, p.133-163, 2007.

PINOTTI, M. M. Z. et al. Isolamento de fungos de solo associados a culturas de Amora, Framboesa e Mirtilo no sul do Brasil. *Revista Brasileira de Agroecologia*, v.6, n.1, p.67-80, 2011.

RECH, M. et al. Microbiota do solo em vinhedos agroecológico e convencional e sob vegetação nativa em Caxias do Sul, RS. *Revista Brasileira de Agroecologia*, v.8, n.3, p.141-151, 2013.

RODRIGUES, M. B. C. et al. Resistência a benzimidazóis por *Guignardia citricarpa*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 42, n.3, p.323-327, 2007.

SILVEIRA, L.M.S. ET AL. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: Comparação entre duas técnicas de ágar difusão. *Revista Brasileira de Farmacologia*, 90(2), 2009.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 10. ed. Porto Alegre : Artmed, 2012.

VERÍSSIMO,C; RAQUEL SABINO,R; MARTINS,C BRANDÃO,J. Infecção fúngica em Portugal - O gigante adormecido. *Infecção & Sepsis*, v.2, 2016.

WARDLE, D. A. et al. Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science*, v. 304, p.1629-1633, 2004.

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