



UNIVERSIDADE FEDERAL DO DELTA DO PARNAÍBA
CURSO DE BACHARELADO EM BIOMEDICINA

JADE OLIVEIRA VIEIRA

**FLUCONAZOL E ANFOTERICINA B FRENTE A *Candida* spp.
ISOLADAS DE REGIÕES URBANAS E PRESERVADAS DO LITORAL
PIAUIENSE**

PARNAÍBA - PI

2023

JADE OLIVEIRA VIEIRA

**FLUCONAZOL E ANFOTERICINA B FRENTE A *Candida* spp.
ISOLADAS DE REGIÕES URBANAS E PRESERVADAS DO LITORAL
PIAUIENSE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como parte dos requisitos para obtenção do grau
de Bacharel em Biomedicina, pela Universidade
Federal do Delta do Parnaíba.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tatiane Caroline Daboit

Coorientadora: Dr^a. Belize Rodrigues Leite

PARNAÍBA – PI

2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por ter me abençoado de tantas formas durante estes anos de graduação e ter me fortalecido e moldado a pessoa que sou hoje através das pessoas e oportunidades que Ele colocou em minha vida.

Aos meus pais, Joelma Benício e Fernando Vieira, por não medirem esforços em me dar a melhor educação e as melhores condições para que tivesse o privilégio de me dedicar aos meus estudos. A eles agradeço, também, por todo incentivo e, por vezes, acreditarem mais no meu potencial do que eu mesma, e por toda a confiança que depositaram em mim durante toda a vida.

A minha falecida avó que sempre estará comigo, Antonieta Maria, por ter depositado em mim toda confiança e admiração. Eu dei os meus primeiros passos nessa jornada pensando no orgulho que você sentia de mim, e, hoje, eu estou cada vez mais perto de alcançar essa vitória e eu dedico ela a você e ao orgulho que eu sei que ainda sente de mim.

Ao meu irmão, minha vida, Gabriel Benício, que sempre foi meu companheiro, obrigada pelo amor sem julgamentos que nós compartilhamos.

Ao meu namorado, Alan Ramos, por me apoiar e incentivar de todas as formas possíveis, e por ter feito dos meus últimos de anos da graduação os melhores, sem dúvida.

As minhas queridas orientadoras, professora Tatiane Daboit e Belize Leite, por enxergarem potencial em mim e terem me acolhido no GEAMICOL. Hoje vejo que depois de muitas tentativas de me encaixar na pesquisa, Deus me colocou no lugar certo, exatamente onde eu precisava estar. Devo a vocês a oportunidade de fazer pesquisa e o privilégio de ter me encontrado dentro da minha profissão, graças a vocês descobri o meu amor pela micologia. Jamais poderei agradecer o suficiente por tudo que aprendi e pelo que vocês fizeram em minha vida, sem vocês nada disso seria possível.

Aos professores pelos quais passei durante esses anos por tocarem minha vida e contribuírem com a profissional que estou me tornando. Em especial, agradeço a professora Anna Carolina Toledo por ter sido a responsável por acender em mim o amor pela microbiologia e me maravilhar com seu amor pela profissão, você é uma das minhas maiores inspirações. Sua influência me fez descobrir o quanto amo esta área e começar a dar os primeiros passos para construir a microbiologista que um dia pretendo me tornar.

As minhas queridas amigas Amanda Nogueira, Maria Clara e Wellia Adrianly por terem compartilhado estes anos de graduação comigo e terem tornado esta jornada mais leve e divertida, com muito companheirismo. Aos meus amigos Ana Paula Cerqueira, Décio Veras, Jadiel Barros, Matheus Barros e Nayara Trindade, que mesmo de longe se fazem presentes e alegram meus dias, por terem me ajudado em tantos momentos que precisei de apoio e encontrei em vocês.

Aos meus amigos e parceiros que fazem ciência ao meu lado, Andressa Trindade, Luiz Lola, Maria Clara, Neilma Oliveira, Renata Nolêto, Samara Marques e Sasha Fortes, muito obrigada por todos os momentos que passamos juntos, pelos ensinamentos e por toda ajuda nesses anos de pesquisa.

**FLUCONAZOL E ANFOTERICINA B FRENTE A *Candida* spp. ISOLADAS DE
REGIÕES URBANAS E PRESERVADAS DO LITORAL PIAUIENSE**

Artigo formatado de acordo com as normas da revista

Research, Society and Development

TITLE

FLUCONAZOLE AND AMPHOTERICIN B AGAINST *Candida* spp. ISOLATED FROM
URBAN AND PRESERVED REGIONS OF THE PIAUÍ COAST

TÍTULO

FLUCONAZOL E ANFOTERICINA B FRENTE A *Candida* spp. ISOLADAS DE
REGIÕES URBANAS E PRESERVADAS DO LITORAL PIAUIENSE

TÍTULO

FLUCONAZOL Y ANFOTERICINA B CONTRA *Candida* spp. AISLADOS DE
REGIONES URBANAS Y CONSERVADAS DE LA COSTA DE PIAUÍ

RESUMO

Candida spp. são fungos que fazem parte da microbiota humana e estão vastamente distribuídas no ambiente. A pesquisa desses microrganismos em estudos relativos à qualidade sanitária de ambientes litorâneos vem se tornando cada vez mais frequente. Visto que a anfotericina B e o fluconazol são amplamente aplicados no tratamento de candidíases, o presente trabalho teve por objetivo caracterizar isolados de *Candida* spp. quanto ao perfil de suscetibilidade *in vitro* a estes antifúngicos. Tais isolados foram obtidos de amostras de água e solo coletados de pontos urbanizados e preservados de 5 praias do litoral piauiense e do Delta do Parnaíba. Os testes de suscetibilidade foram realizados através da técnica de microdiluição em caldo (documento M27-A3 do CLSI). A identificação presuntiva das espécies do gênero *Candida* foi realizada utilizando o meio de cultura CHROMAgar™, através da qual 18 isolados foram caracterizados como *Candida krusei* e 3 como *Candida* spp. A localidade da qual se isolou o maior volume de leveduras foi o Delta do Parnaíba. Um total de 17 isolados foram resistentes ao fluconazol e 2 à anfotericina B. Todos os isolados resistentes à anfotericina B também apresentavam resistência ao fluconazol. Todas as amostras obtidas do solo mostraram-se resistentes ao fluconazol, e, deste total, cerca de 84% tratavam-se de isolados de *Candida krusei*, que é naturalmente resistente ao azólico. Aproximadamente 81% das leveduras dos ambientes urbanos foram resistentes a pelo menos um fármaco testado. Tendo em vista o observado, sugere-se que outros estudos sejam feitos para continuar monitorando as leveduras patogênicas presentes nestes ambientes.

Palavras Chave: Azóis; Polienos; *Candida krusei*; Contaminação ambiental; Resistência Antifúngica.

ABSTRACT

Candida spp. are part of the human microbiota and are widely distributed in the environment. The research of these microorganisms in studies related to the sanitary quality of coastal environments is becoming more and more frequent. Since amphotericin B and fluconazole are widely applied in the treatment of candidiasis, the present work aimed to characterize *Candida* spp. regarding the *in vitro* susceptibility profile to these antifungals. Such isolates were obtained from samples of water and soil collected from urbanized and preserved points of 5 beaches on the Piauí coast and Delta do Parnaíba. Susceptibility tests were performed using the broth microdilution technique (CLSI document M27-A3). The presumptive identification of species of the genus *Candida* was performed using the CHROMAgar™ culture medium, through which 18 isolates were characterized as *Candida krusei* and 3 as *Candida* spp. The location from which the largest number of yeasts was isolated was Delta do Parnaíba. A total of 17 isolates were resistant to fluconazole and 2 to amphotericin B. All isolates resistant to amphotericin B also showed resistance to fluconazole. All soil samples were known to be resistant to fluconazole, and of this total, about 84% were isolates of *Candida krusei*, which is naturally resistant to fluconazole. Approximately 81% of yeasts from urban environments were resistant to at least one tested drug. In view of what was observed, it is suggested that other studies be carried out to continue monitoring the pathogenic yeasts present in these environments.

Keywords: Antifungal Resistance; Azoles; *Candida krusei*; Environmental contamination; Polyenes;.

RESUMEN

Candida spp. forman parte de la microbiota humana y están ampliamente distribuidos en el medio ambiente. La investigación de estos microorganismos en estudios relacionados con la calidad sanitaria de los ambientes costeros es cada vez más frecuente. Dado que la anfotericina B y el fluconazol se aplican ampliamente en el tratamiento de la candidiasis, el presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar *Candida* spp. sobre el perfil de susceptibilidad *in vitro* a estos antifúngicos. Dichos aislados se obtuvieron de muestras de agua y suelo recolectados de puntos urbanizados y preservados de 5 playas en el litoral de Piauí y Delta do Parnaíba. Las pruebas de susceptibilidad se realizaron mediante la técnica de microdilución en caldo (documento CLSI M27-A3). La identificación presuntiva de especies del género *Candida* se realizó mediante el medio de cultivo CHROMAgar™, mediante el cual se caracterizaron 18 aislados como *Candida krusei* y 3 como *Candida* spp. El lugar donde se aisló el mayor volumen de levaduras fue Delta do Parnaíba. Un total de 17 aislados fueron resistentes a fluconazol y 2 a anfotericina B. Todos los aislados resistentes a anfotericina B también mostraron resistencia a fluconazol. Se sabía que todas las muestras de suelo eran resistentes al fluconazol, y de este total, alrededor del 84 % eran aislados de *Candida krusei*, que es naturalmente resistente al azol. Aproximadamente el 81% de las levaduras de ambientes urbanos fueron resistentes a al menos un fármaco probado. En vista de lo observado, se sugiere realizar otros estudios para continuar con el monitoreo de las levaduras patógenas presentes en estos ambientes.

Palabras clave: Azoles; *Candida krusei*; Contaminación ambiental; Polienos; Resistencia Antifúngica.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Quantidade de amostras de <i>Candida</i> spp. isoladas por localidade e por material coletado no litoral piauiense e no Delta do Parnaíba.....	18
Tabela 2: Resultados das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) da anfotericina B (AmB) e do fluconazol (FLUCO) para <i>Candida</i> spp. isoladas de praias do litoral do Piauí e do Delta do Parnaíba.....	19
Tabela 3 – Resultados obtidos para <i>Candida</i> spp. recuperadas de regiões urbanas e preservadas do litoral piauiense nos ensaios de suscetibilidade <i>in vitro</i> frente à anfotericina B (AmB) e ao fluconazol (FLUCO).....	21

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aparência de colônias de <i>Candida albicans</i> , <i>Candida krusei</i> e <i>Candida tropicalis</i> em CHROMAgar™.....	16
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AmB – Anfotericina B

ATCC - **do inglês** *American Type Culture Collection*

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CLSI – **do inglês** *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DMSO - Dimetilsulfóxido

EUCAST – **do inglês** *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FLUCO - Fluconazol

MOPS - Ácido 3-(N-morfolino)-propano sulfônico

UFCs - Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

1. Introdução	14
2. Metodologia	16
2.1. Amostras fúngicas	16
2.2. Teste de suscetibilidade <i>in vitro</i>	17
3. Resultados e Discussão	19
4. Conclusão	25
Agradecimentos	25
Referências	26
Anexos	27

1. Introdução

As leveduras do gênero *Candida* causam infecções denominadas candidíases ou candidoses. Estes fungos ocasionam micoses de variadas apresentações clínicas, que podem ser classificadas desde superficiais, levando a um acometimento da pele, unhas e mucosas orofaríngeas e genitais, até infecções profundas, de alta gravidade, que se disseminam pela circulação sanguínea até outros órgãos, como é o caso da candidemia (Sá et al., 2014). Estas leveduras são comensais que fazem parte da pele humana e da microbiota intestinal e genital, sendo detectáveis em até 60% das pessoas saudáveis (Kullberg & Arendrup, 2015; McCarty & Pappas, 2016). Dessa forma, a candidíase se dá em consequência de uma colonização aumentada ou anormal, associada a um defeito nas defesas do hospedeiro (Pappas et al., 2018).

Pelo menos 15 espécies de *Candida* podem acometer humanos, sendo a maioria das infecções invasivas causadas por 5 principais espécies: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei* (McCarty & Pappas, 2016). Em algumas parte do mundo, inclusive no Brasil, *Candida auris* se destaca como um patógeno emergente (Clancy & Nguyen, 2016; Chowdhary et al., 2017; Borges & Nascimento, 2021). O crescimento de casos de candidíase envolvendo espécies não-*albicans* pode estar ligado a uma série de fatores, como o surgimento de resistência a determinados medicamentos, para os quais *C. albicans* apresenta sensibilidade, a capacidade de adaptação em diversos ambientes e a variação de espécies isoladas a depender da região geográfica (Miceli, Díaz, & Lee, 2011; Silva et al., 2012). Desse modo, o monitoramento do comportamento das espécies de *Candida* em localidades diferentes é de grande relevância para o êxito do uso terapêutico de antifúngicos e a prevenção de novos casos de candidíase.

Entre os antifúngicos aplicados no tratamento de candidíases estão o fluconazol (FLUCO), pertencente ao grupo dos triazólicos, e a anfotericina B (AmB), um derivado poliênico (Vieira & Santos, 2017). O FLUCO é um fármaco de amplo uso no combate a *Candida* spp. que tem sua ação baseada na inibição da enzima lanosterol-14 α -desmetilase, responsável pela conversão de lanosterol em ergosterol, afetando a fluidez da membrana fúngica (Chudzik et al., 2015). A AmB é sugerida para a terapêutica de formas graves de candidíase invasiva, e trata-se de uma molécula que age sobre a membrana celular fúngica, com afinidade pelo ergosterol (Vieira & Santos, 2017). Este fármaco perturba a permeabilidade da membrana e sua capacidade de transporte por formar grandes poros na mesma, o que

desencadeia um desequilíbrio iônico, além de utilizar vias de sinalização que induzem à morte celular (Chudzik et al., 2015).

Pelo fato destas leveduras serem encontradas em diversos ambientes aquáticos, livres ou em associação com sedimentos, muitos estudos relacionados à qualidade sanitária de praias têm incluído a pesquisa de espécies de *Candida* como indicador da qualidade microbiológica das águas e do solo (Oliveira et al., 2020; Arora et al., 2021; Rosa et al., 2021; Frenkel et al., 2022). Muitos destes microrganismos ambientais podem ser espécies patogênicas ao homem, e alguns deles, inclusive, são de grande risco para a saúde humana, como o recente isolamento de *Candida auris*, recuperada de um ecossistema marinho na Índia (Arora et al., 2021).

Assim, o presente estudo buscou avaliar o perfil de suscetibilidade de *Candida* spp., isoladas das águas e dos solos de 5 praias do estado do Piauí e do Delta do Parnaíba, frente aos antifúngicos fluconazol e anfotericina B.

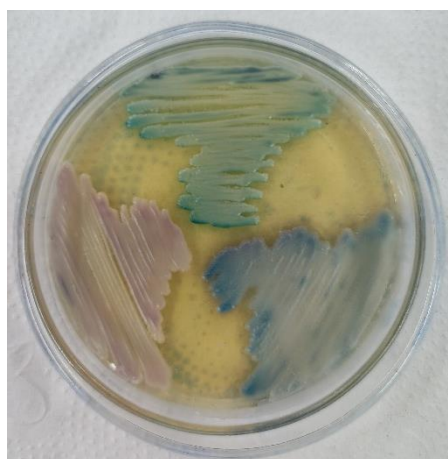
2. Metodologia

2.1. Amostras fúngicas

Neste estudo foram utilizadas 21 amostras de *Candida* spp. mantidas na micoteca do Grupo de Estudos Avançados em Micologia Médica (GEAMICOL) da Universidade Federal do Delta do Parnaíba. Esses isolados foram obtidos a partir do processamento de amostras de água e solo seco de áreas urbanas e preservadas das praias de Pedra do Sal (2°48'34" Sul, 41°44'00" Oeste), Atalaia (2°53'02" Sul, 41°38'08" Oeste), Itaqui (2°54'01" Sul, 41°33'17" Oeste), Barra Grande (2°54'37" Sul, 41°25'10" Oeste), Barrinha (2°54'42" Sul, 41°23'09" Oeste), e do Delta do Parnaíba (2°48'56" Sul, 41°50'23" Oeste). O projeto da coleta foi cadastrado na plataforma SISGEN sob o nº A22E225.

A identificação presuntiva das espécies do gênero *Candida* foi realizada utilizando o meio de cultura CHROMAgar™ (Difco, França), um meio de identificação que tem por princípio a produção de cor nas colônias, por reações enzimáticas, com um substrato cromogênico do meio. *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis* formam, respectivamente, colônias de coloração verde, rosa e azul metálico (Figura 1), e as demais, coloração branca.

Figura 1: Aparência de colônias de *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis* em CHROMAgar™.



Fonte: Autoria própria.

Legenda: *C. albicans* (colônias de coloração verde); *C. krusei* (colônias de coloração rosa); *C. tropicalis* (colônias de coloração azul metálico).

2.2. Teste de suscetibilidade *in vitro*

Os testes de suscetibilidade foram realizados em triplicata mediante a técnica de microdiluição em caldo, conforme preconiza o documento M27-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008), com adaptações. Foram utilizadas microplacas estéreis de 96 poços com fundo em “U”. As soluções-estoque de AmB (Sigma®) e FLUCO (Sigma®) foram preparadas com dimetilsulfóxido (DMSO, Vetec, Brasil). Estas, por sua vez, foram diluídas em meio RPMI 1640 (MP Biomedicals, França) suplementado com 2% de glicose, e tamponado com ácido 3-(N-morfolino)-propano sulfônico (MOPS, Vetec, Brasil),

Inicialmente, os isolados fúngicos haviam sido repicados em tubos contendo Ágar Batata e incubados em estufa a 35°C durante 24 horas. As suspensões das leveduras foram preparadas em solução salina estéril a 0,85% e padronizados em espectrofotômetro com $\lambda = 530$ nm, até se obter um valor de transmitância de 90%. Foram distribuídos 100 μ L de meio RPMI-1640, previamente filtrado, nas microplacas a serem testadas. Em seguida foi pipetado 100 μ L dos antifúngicos, ajustados na concentração preconizada pela CLSI M27-A3 (2008) e feita a diluição seriada. Em seguida, os inóculos, previamente preparados, foram diluídos em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS e suplementado com 2% de glicose, até se atingir uma concentração final de microrganismos entre $0,5 \times 10^3$ e $2,5 \times 10^3$ UFCs/mL. As faixas de concentração final testadas foram de 0,0313 – 16 μ g/mL para a AmB, e de 0,125 – 64 μ g/mL para o FLUCO.

Após prontas, as placas seguiram para a incubação em estufa por 24 horas a 35 °C. A concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos foi determinada por meio da visualização a olho nu de ausência de crescimento em comparação ao controle de crescimento e ao controle de esterilidade. A CIM é considerada a menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento do microrganismo (CLSI, 2008). Uma cepa de *Candida krusei* ATCC 6258 foi utilizada como controle de qualidade.

Os resultados da CIM para FLUCO foram interpretados usando pontos de corte clínicos de acordo com as diretrizes do CLSI (2022). Foram consideradas resistentes para FLUCO as cepas com $CIM \geq 8$ μ g/mL, com sensibilidade dose-dependente as cepas com CIM de 4 μ g/mL e sensíveis as cepas com $CIM \leq 2$ μ g/mL. Os resultados da CIM para AmB foram interpretados usando valores de corte clínicos de acordo com as diretrizes do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (2020). Foram utilizadas duas fontes para interpretação, devido à ausência de dados acerca da AmB nas diretrizes do CLSI (2022). Foram

consideradas resistentes para AmB as cepas com CIM > 1 µg/mL e sensíveis as cepas com CIM ≤ 1 µg/mL.

3. Resultados e Discussão

O presente estudo é pioneiro ao fornecer dados quantitativos acerca da ação antifúngica frente a *Candida* spp. isoladas de água e solo de praias do litoral do Piauí e água e solo do Delta do Parnaíba. Do total de 21 isolados, 11 foram provenientes da água e 10 de solo (Tabela 1). A grande maioria dos isolados (85,71%) foram identificados como *Candida krusei* ao passo que não foi possível identificar as demais amostras pela análise visual em meio CHROMAgar™.

Tabela 1: Quantidade de amostras de *Candida* spp. isoladas por localidade e por material coletado no litoral piauiense e no Delta do Parnaíba.

Locais das coletas	Material Coletado	
	Água	Solo
Atalaia	3	1
Barra Grande	3	-
Barrinha	2	-
Delta do Parnaíba	1	6
Itaqui	1	-
Pedra do Sal	1	3
Número total de isolados	11	10

Fonte: Autoria própria.

A maior quantidade de isolados foram obtidos do Delta do Parnaíba ($n = 7$), seguido das praias de Pedra do Sal ($n = 4$) e de Atalaia ($n = 4$) (Tabela 1). Embora sejam regiões com intensa fluxo humano, não foi possível obter-se isolados do solo das praias de Barra Grande e Barrinha, o que pode ser justificado pelo grande crescimento fúngico nos meios de cultura, impossibilitando a observação e isolamento de colônias leveduriformes. As CIM's observadas para FLUCO variaram entre 0,125 e 32 $\mu\text{g/mL}$, à medida que as CIM's observadas para AmB variaram entre $<0,03125$ e 2 $\mu\text{g/mL}$. Frente à AmB, 2 (9,52%) isolados foram interpretados como resistentes (CIMs $> 1 \mu\text{g/mL}$) e 19 (90,48%) isolados apresentaram sensibilidade (CIM $\leq 1 \mu\text{g/mL}$) (Tabela 3). Dos isolados testados neste trabalho, somente 2 (9,52%) apresentaram resistência a ambos os antifúngicos testados, e apenas 1 (4,76%) isolado teve seu crescimento inibido por ambos os fármacos (Tabela 3).

Com relação ao FLUCO, 17 isolados (80,95%) se mostraram resistentes (CIMs $\geq 8 \mu\text{g/mL}$), ao passo que 3 (14,29%) apresentaram sensibilidade dose-dependente (CIM = 4 $\mu\text{g/mL}$) e, por fim, apenas 1 isolado (4,76%) foi sensível à ação do fármaco (CIM $\leq 2 \mu\text{g/mL}$) (Tabela 3). Dentre os 17 isolados resistentes ao FLUCO, 14 se tratavam de *C. krusei* (Tabela

2), resultado este que condiz com o fato de esta espécie possuir resistência intrínseca a tal fármaco, sendo considerada de grande importância médica por isto (Brandão et al., 2017). Foi observada resistência ao FLUCO mesmo nas amostras recuperadas de regiões preservadas (70%), fato que se justifica pela resistência intrínseca, por também se tratarem de isolados de *C. krusei* (Tabela 2).

Tabela 2: Resultados das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) da anfotericina B (AmB) e fluconazol (FLUCO) para *Candida* spp. isoladas de praias do litoral do Piauí e do Delta do Parnaíba.

Locais das coletas	Isolados fúngicos	Amostra	Área	Espécies	CIM AmB (µg/mL)	CIM FLUCO (µg/mL)
Delta do Parnaíba	CkD1	Solo	Preservada	<i>Candida krusei</i>	0,5	8
	CkD4	Solo	Preservada	<i>Candida krusei</i>	1	16
	CDU3	Solo	Urbana	<i>Candida</i> sp.	0,25	32
	CkDU4	Água	Urbana	<i>Candida krusei</i>	0,0625	4
	CkADU2	Solo	Urbana	<i>Candida krusei</i>	0,5	8
	CkADU3	Solo	Urbana	<i>Candida krusei</i>	0,25	8
	CkArD1	Solo	Preservada	<i>Candida krusei</i>	0,25	8
Atalaia	CkAt3	Água	Preservada	<i>Candida krusei</i>	0,5	4
	CkAt5	Água	Preservada	<i>Candida krusei</i>	2	16
	CkAt6	Água	Preservada	<i>Candida krusei</i>	<0,03125	0,125
	CkArAU1	Solo	Urbana	<i>Candida krusei</i>	0,0625	16
Barrinha	CkB1	Água	Preservada	<i>Candida krusei</i>	0,25	8
	CkB3	Água	Preservada	<i>Candida krusei</i>	0,25	8
Barra Grande	CkBG3	Água	Urbana	<i>Candida krusei</i>	0,0625	4
	CkBG4	Água	Urbana	<i>Candida krusei</i>	0,5	8
	CkBG5	Água	Urbana	<i>Candida krusei</i>	0,5	16
Itaqui	CkIta2	Água	Preservada	<i>Candida krusei</i>	0,25	8
Pedra do Sal	BArPU7	Solo	Urbana	<i>Candida</i> sp.	0,25	16
	CkArP	Solo	Preservada	<i>Candida krusei</i>	0,5	8
	CkArPU	Solo	Urbana	<i>Candida krusei</i>	2	8
	PU10	Água	Urbana	<i>Candida</i> sp.	0,5	16

Fonte: Autoria própria.

O FLUCO é um antifúngico pertencente ao grupo dos azóis, sendo um composto triazólico (Ruiz et al., 2005). Os azóis tem sua ação baseada na inibição da lanosterol 14<-desmetilase do citocromo P-450, responsável pela síntese do ergosterol, o qual compõe a

membrana celular do fungo (Ruiz et al., 2005). A resistência aos azóis se dá por diversos mecanismos, como mutações ou superexpressão do gene ERG11, levando à substituição de aminoácidos e, dessa forma, alterando a enzima alvo, fazendo com que a afinidade do FLUCO por ela diminua (Bondaryk et al., 2013).

A AmB é um antifúngico de amplo espectro do grupo dos polienos, o qual interage com o ergosterol, levando a formação de poros na membrana e consequente perda de sua integridade, causando distúrbios no equilíbrio iônico, com perda de potássio e outros íons (Lemke et al., 2005; Falci & Pasqualotto, 2015). O mecanismo de resistência a esse fármaco se dá, principalmente, pela diminuição do teor do ergosterol na membrana, mudança esta que está associada a mutações nos genes ERG3 e ERG6, os quais codificam enzimas envolvidas na biossíntese do ergosterol (Spampinato & Leonardi, 2013). Estes mecanismos trazem sérias consequências à sobrevivência da levedura, diminuindo a sua tolerância a estresses externos, assim como, aumentando a ocorrência de defeitos na filamentação e invasão tecidual (Vincent et al., 2013; Ren et al., 2014). Por este motivo, casos de resistência à AmB têm sido relatados com uma frequência relativamente baixa na literatura, similarmente ao resultado encontrado no presente estudo.

Os resultados obtidos com o ensaio de suscetibilidade foram semelhantes aos resultados observados em estudos prévios que avaliaram o perfil de suscetibilidade de leveduras isoladas do ambiente. Milanezi et al. (2018) desenvolveram um estudo através do qual demonstraram a ocorrência de leveduras oportunistas em amostras de água do Arroio Dilúvio em Porto Alegre. Estas amostras foram submetidas a testes de suscetibilidade antifúngica, utilizando-se da mesma metodologia aplicada no presente estudo. Os resultados de Milanezi e colaboradores demonstraram que cerca de 44,2% dos isolados foram resistentes ao FLUCO, 18,9% apresentaram sensibilidade dose-dependente e 36,8% foram suscetíveis ao fármaco. Para o antifúngico AmB, 16,8% dos isolados foram resistentes e 83,2% apresentaram sensibilidade. Com respeito à AmB, os resultados dos autores foram consistentes com os observados no litoral piauiense, porém, em relação ao fluconazol, nós observamos o dobro de taxa de resistência.

Maciel et al. (2019) ao testarem a sensibilidade antifúngica de leveduras obtidas de praias recreacionais dos estados Rio de Janeiro e Paraná, observaram que 11% das amostras apresentaram resistência ao FLUCO, e que 20% mostraram resistência à AmB. Estes resultados diferem em parte do nosso estudo, em que observamos a uma maior porcentagem de isolados resistentes ao FLUCO. Porém, os dados obtidos para a AmB são similares. Dentre as 21 espécies de *Candida* obtidas por eles, *Candida parapsilosis* se destacou por ser a espécie com

o maior volume de isolados, seguida de *Candida tropicalis* e *Candida intermedia*, o que pode explicar a diferença de resultados com relação aos nossos.

No estudo realizado por Brandão e Kindel (2013), onde foi analisada a suscetibilidade de leveduras recuperadas do Rio Turvo Limpo em Minas Gerais, observou-se um maior perfil de resistência à AmB, no entanto, com sensibilidade alta ao FLUCO. Contrastando com os dados obtidos por Brandão e colaboradores, os isolados do Litoral do Piauí apresentaram perfil de suscetibilidade para AmB, e maior resistência ao FLUCO. De acordo com Silva et al. (2012), as divergências que podem ser observadas nos perfis de suscetibilidade aos antifúngicos podem estar ligadas à região geográfica e à população, variando de uma localidade para outra.

Tabela 3 – Resultados obtidos para *Candida* spp. recuperadas de regiões urbanas e preservadas do litoral piauiense nos ensaios de suscetibilidade *in vitro* frente à anfotericina B (AmB) e ao fluconazol (FLUCO).

Locais das coletas	Isolados fúngicos	AmB	FLUCO
Delta do Parnaíba	CkD1	S	R
	CkD4	S	R
	CDU3	S	R
	CkDU4	S	SDD
	CkADU2	S	R
	CkADU3	S	R
	CkArD1	S	R
Atalaia	CkAt3	S	SDD
	CkAt5	R	R
	CkAt6	S	S
	CkArAU1	S	R
Barrinha	CkB1	S	R
	CkB3	S	R
Barra Grande	CkB3G	S	SDD
	CkB4G	S	R
	CkB5G	S	R
Itaqui	CkIta2	S	R
Pedra do Sal	BArPU7	S	R
	CkArP	S	R
	CkArPU	R	R
	PU10	S	R

Legenda: R – Resistente; S – Sensível; SDD – Sensibilidade Dose Dependente.

Fonte: Autoria própria.

A utilização de agentes antimicrobianos é um grande avanço na medicina, contudo, o uso descontrolado destes fármacos levou a um aumento da incidência de microrganismos resistentes em uma população que antes era suscetível (Huang & Kao, 2012). Além disso, o desenvolvimento de novos antifúngicos é limitado, devido a problemas para identificar agente efetivo que atue nas células eucarióticas fúngicas e que, concomitantemente, não seja tóxico para as células do hospedeiro (Silva et al., 2012).

O estudo realizado demonstrou que 81% das leveduras provenientes dos ambientes urbanos foram resistentes a pelo menos um fármaco testado. Tal resultado equipara-se aos de Pagani et al. (2022) que, ao investigar a presença de leveduras potencialmente resistentes a antifúngicos na lagoa de Tramandaí na região urbana de Osório no estado do Rio Grande do Sul, isolou 28 espécies de leveduras e observou que 93% dos isolados apresentaram CIMs acima dos pontos de resistência estabelecidos para espécies de *Candida* para pelos menos dois antifúngicos. São resultados semelhantes, também, aos de Oliveira et al. (2020) que, ao pesquisar a ocorrência de fungos na água e no solo de praias da região metropolitana de Maceió no Estado de Alagoas, obtiveram um total de 310 isolados distribuídos entre fungos filamentosos e leveduriformes, 18 deles se tratando de *Candida* sp.

A presença destes microrganismos resistentes selecionados e o aumento na variedade de espécies, está relacionada com a poluição que chega a estes ecossistemas (Pagani et al., 2022). As interferências que causam mudanças ambientais, tais como deposição de poluentes e dejetos, podem levar à indução de mecanismos genéticos responsáveis pelo advento de resistência a fármacos antifúngicos em *Candida* spp. (Brilhante et al., 2015). Ademais, o uso difundido e indiscriminado de agentes antifúngicos para o tratamento de candidíases resultou no surgimento de organismos menos suscetíveis e no desenvolvimento de mecanismos de resistência (Crocco et al., 2004), sendo que o contato estreito das pessoas com o ambiente em suas atividades de lazer nas praias contribui para a disseminação de leveduras resistentes selecionadas (Maier et al., 2003).

Confirmando esta lógica, observou-se no presente estudo que todos os isolados das amostras de solo mostraram resistência ao FLUCO, e que 63% dos isolados oriundos da água apresentaram alguma resistência antifúngica. O acúmulo de leveduras no solo da praia se dá através da sua capacidade de filtrar microrganismos durante os ciclos das marés (Vogel et al., 2007), bem como por meio da interferência dos humanos e animais. Estes transmitem ao solo

microrganismos potencialmente patogênicos, dos quais são portadores, além de produzirem resíduos que serão utilizados como substrato pelos mesmos (Maier et al., 2003).

Devido às grandes mudanças climáticas induzidas pelo homem, a temperatura média da Terra aumentou 1,2 °C desde o período pré-industrial (Archer et al., 2023). Consequentemente, surge a preocupação de que a elevação das temperaturas globais leve à seleção de linhagens de microrganismos mais tolerantes termicamente (Casadevall et al., 2019). Os impactos podem ser ainda maiores nas costas, onde acontece a interação dos ecossistemas naturais e a população humana, representando, desta forma, uma importante fonte de infecções humanas. Casadevall e colaboradores (2019) relataram a possível relação do aquecimento global com o surgimento de *Candida auris* como um patógeno emergente. Os autores descrevem que, antes disto, *C. auris* era um fungo ambiental, mas os efeitos do aquecimento global podem ter resultado no aumento da tolerância térmica e à salinidade pelo fungo.

De maneira semelhante, Archer e colaboradores (2023) mostraram que, na costa dos Estados Unidos, o número de infecções por *Vibrio vulnificus*, um vibrião que cresce em água costeiras, aumentou de 10 para 80 em 30 anos. Além disso, todos os anos os casos ocorriam mais ao Norte do país, uma região mais fria, e o estudo observou a incidência de casos em regiões mais quentes, tais como o Golfo do México e a costa sul do Atlântico. Os autores postulam que essas mudanças podem estar diretamente ligadas ao aquecimento global. -A possibilidade das altas temperaturas selecionarem microrganismos mais tolerantes é muito preocupante, pois este cenário contribui para que fungos menos sensíveis à temperatura corporal sejam mais adaptados, possibilitando o surgimento de novas cepas patogênicas. Esta situação é ainda mais alarmante quando associada com a provável existência de fungos naturalmente resistentes a fármacos, o que deve preocupar não somente indivíduos hígidos, mas principalmente aqueles imunodeprimidos, como por exemplo os transplantados e pacientes HIV/AIDS, crianças e idosos, os quais tendem a ser mais suscetíveis às infecções fúngicas (Varano et al., 2019).

A qualidade microbiológica da água e do solo das praias é de grande relevância para a preservação da saúde das pessoas que fazem uso destes ambientes. As autoridades ambientais, geralmente, limitam-se à pesquisa dos níveis de balneabilidade das águas através de indicadores de contaminação fecal, mesmo que o solo represente uma ameaça à saúde dos usuários, devido ao seu contato prolongado com a mesma (Pereira et al., 2013). Ademais, existem limitadas pesquisas sobre a presença de fungos nesses ambientes, apesar de seu potencial patogênico. Dessa maneira, o monitoramento ambiental oferece a possibilidade de identificar agentes

patogênicos e alertar as autoridades ambientais, as de saúde e a população em geral acerca do possível risco que a exposição a estes locais oferece.

4. Conclusão

Este estudo evidenciou a presença de fungos potencialmente patogênicos presentes no solo e água de 5 praias do litoral do Piauí e do Delta do Parnaíba. A maioria dos isolados se tratavam, possivelmente, de *Candida krusei*. O Delta do Parnaíba foi a localidade da qual se isolou o maior número de leveduras. A maioria dos isolados apresentaram resistência ao fluconazol, ao passo que se observou uma maior sensibilidade à anfotericina B.

Uma limitação do estudo realizado é a identificação presuntiva das leveduras, já que o método utilizado não possui grande precisão e sua capacidade de diferenciação se limita a três espécies, apenas. Outro aspecto limitante é o reduzido volume amostral analisado, pois um número maior de isolados analisados atribuiria mais confiabilidade nos resultados encontrados. Dessa forma, recomenda-se o desenvolvimento de novos estudos com um número de isolados maior e o uso de técnicas de biologia molecular, a fim de uma identificação mais acurada.

Diversos estudos ao redor do mundo mostram que a influência da urbanização em ambientes naturais leva a uma maior presença e diversidade de patógenos, bem como a uma maior resistência à antimicrobianos pelos mesmos. A presente investigação demonstrou que tais fenômenos também ocorrem no litoral do Piauí. A presença de leveduras patogênicas nestes ambientes mostra a necessidade de investigação e tomada de medidas para a diminuição do risco oferecido à população, tendo em vista a negligência que doenças causadas por fungos sofrem na sociedade, agravando a situação. O isolamento de espécies com resistência intrínseca nestes ambientes também é destacada como um agravante, pois, uma vez adquiridas infecções pelas mesmas, o tratamento se torna dificultado pela pouca variedade de antifúngicos disponíveis.

Agradecimentos

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI) pelas bolsas de estudo e pelo fomento.

Referências

- Abdelzaher, A. M., Wright, M. E., Ortega, C., Solo-Gabriele, H. M., Miller, G., Elmir, S., Newman, X., Shih, P., Bonilla, J. A., Bonilla, T. D., Palmer, C. J., Scott, T., Lukasik, J., Harwood, V. J., McQuaig, S., Sinigalliano, C., Gidley, M., Plano, L. R. W., Zhu, X., & Wang, J. D. (2010). Presence of Pathogens and Indicator Microbes at a Non-Point Source Subtropical Recreational Marine Beach. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (3), 724–732. <https://doi.org/10.1128/AEM.02127-09>.
- Archer, E. J., Baker-Austin, C., Osborn, T. J., Jones, N. R., Martínez-Urtaza, J., Trinanes, J., Oliver, J. D., González, F. J. C., & Lake, I. R. (2023). Climate warming and increasing *Vibrio vulnificus* infections in North America. *Scientific Reports*, 13 (1), 3893. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28247-2>.
- Arora, P., Singh, P., Wang, Y., Yadav, A., Pawar, K., Singh, A., Padmavati, G., Xu, J., & Chowdhary, A. (2021). Environmental Isolation of *Candida auris* from the Coastal Wetlands of Andaman Islands, India. *MBio*, 12 (2). <https://doi.org/10.1128/mbio.03181-20>.
- Bondaryk, M., Kurzątkowski, W., & Staniszevska, M. (2013). Antifungal agents commonly used in the superficial and mucosal candidiasis treatment: mode of action and resistance development. *Advances in Dermatology and Allergology*, 5, 293–301. <https://doi.org/10.5114/pdia.2013.38358>.
- Borges, F. M. & Nascimento, T. C. (2021). *Candida auris*: patógeno fúngico emergente é detectado no Brasil. *HU Revista*. 47, 1-2.
- Brandão, L. R., Vaz, A. B., Santo, L. C. E., Pimenta, R. S., Morais, P. B., Libkind, D., ... & Rosa, C. A. (2017). Diversity and biogeographical patterns of yeast communities in Antarctic, Patagonian and tropical lakes. *Fungal Ecology*, 28, 33-43. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2017.04.003>
- Brandão, T. V., & Kindel, E. A. I. (2013). Dilúvio: Visões sobre um arroio. *REMEA - Revista Eletrônica Do Mestrado Em Educação Ambiental*, 25.
- Brilhante, R. S. N., Paiva, M. A. N., Sampaio, C. M. S., Castelo-Branco, D. S. C. M., Alencar, L. P., Bandeira, T. J. P. G., ... Rocha, M. F. G. (2015). Surveillance of Azole Resistance Among *Candida* spp. as a Strategy for the Indirect Monitoring of Freshwater Environments. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226 (3). <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2340-7>.
- Casadevall, A., Kontoyiannis, D. P., & Robert, V. (2019). On the emergence of *Candida auris*: Climate change, azoles, swamps, and birds. *MBio*, 10 (4). <https://doi.org/10.1128/mbio.01397-19>.
- Chowdhary, A., Sharma, C., & Meis, J. F. (2017). *Candida auris*: A rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. *PLOS Pathogens*, 13 (5), e1006290. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006290>.
- Chudzik, B., Koselski, M., Czuryło, A., Trębacz, K., & Gagoś, M. (2015). A new look at the antibiotic amphotericin B effect on *Candida albicans* plasma membrane permeability and cell viability functions. *European Biophysics Journal*, 44 (1-2), 77–90. <https://doi.org/10.1007/s00249-014-1003-8>.
- Clancy, C. J., & Nguyen, M. H. (2016). Emergence of *Candida auris*: An International Call to Arms. *Clinical Infectious Diseases*, 64 (2), 141–143. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw696>
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2008) *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Approved Standard-Third Edition*. CLSI document M27-A3.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2022) *Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Third Edition*. CLSI document M27-M44S.
- Crocco, E. I., Mimica, L. M. J., Muramatu, L. H., Garcia, C., Souza, V. M., Ruiz, L. R. B., & Zaitz, C. (2004). Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica in vitro: Estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 79, 689–697. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962004000600005>.
- Falci, D. R., & Pasqualotto, A. C. (2015). Anfotericina B: uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade. *Clinical and Biomedical Research*, 35 (2). <http://dx.doi.org/10.4322/2357-9730.560>.
- Frenkel, M., Serhan, H., Blum, S. E., Fleker, M., Sionov, E., Amit, S., Gazit, Z., Gefen-Halevi, S., & Segal, E. (2022). What Is Hiding in the Israeli Mediterranean Seawater and Beach Sand. *Journal of Fungi*, 8 (9), 950. <https://doi.org/10.3390/jof8090950>.
- Huang, M., & Kao, K. C. (2012). Population dynamics and the evolution of antifungal drug resistance in *Candida albicans*. *FEMS Microbiology Letters*, 333 (2), 85–93. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02587.x>.
- Kullberg, B. J., & Arendrup, M. C. (2015). Invasive Candidiasis. *New England Journal of Medicine*, 373 (15), 1445–1456. <https://doi.org/10.1056/nejmra1315399>.
- Lemke, A., Kiderlen, A. F., & Kayser, O. (2005). Amphotericin B. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68 (2), 151–162. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1955-9>.
- Maciel, N. O., Johann, S., Brandão, L. R., Kucharíková, S., Morais, C. G., Oliveira, A. P., ... & Rosa, C. A. (2019). Occurrence, antifungal susceptibility, and virulence factors of opportunistic yeasts isolated from Brazilian beaches. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 114. <https://doi.org/10.1590/0074-02760180566>.
- McCarty, T. P., & Pappas, P. G. (2016). Invasive Candidiasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30 (1), 103–124. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.013>.

- Maier, L. M., Oliveira, V. R., Rezende, K. C. R., Vieira, V. D. R., Carvalho, C. R. (2003). Avaliação da presença de fungos e bactérias patogênicas em duas praias do município do Rio de Janeiro. *Coleção Estudos da Cidade*, 13.
- Miceli, M. H., Díaz, J. A., & Lee, S. A. (2011). Emerging opportunistic yeast infections. *The Lancet Infectious Diseases*, 11 (2), 142–151. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(10\)70218-8](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(10)70218-8).
- Milanezi, A. C. M., Witusk, J. P. D., & Van Der Sand, S. T. (2018). Antifungal susceptibility of yeasts isolated from anthropogenic watershed. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 91. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170369>.
- Oliveira, J. O. de, Santos, I. M. R. dos, Silva, D. P. da, Calumby, R. J. N., Moreira, R. T. de F., & Araújo, M. A. dos S. (2020). Ocorrência de fungos na água e areia de praias urbanas. *Diversitas Journal*, 5 (4), 2779–2791. <https://doi.org/10.17648/diversitas-journal-v5i4-1255>.
- Pappas, P. G., Lionakis, M. S., Arendrup, M. C., Ostrosky-Zeichner, L., & Kullberg, B. J. (2018). Invasive candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers*, 4, 18026. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.26>.
- Pagani, D. M., Heidrich, D., Tormente, F., Milani, G., Jank, L., They, N. H., Valente, P., & Scroferneker, M. L. (2022). High MICs for antifungal agents in yeasts from an anthropized lagoon in South America. *Microbiological Research*, 262, 127083. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127083>.
- Pereira, E., Figueira, C., Aguiar, N., Vasconcelos, R., Vasconcelos, S., Calado, G., Brandão, J., & Prada, S. (2013). Microbiological and mycological beach sand quality in a volcanic environment: Madeira archipelago, Portugal. *Science of the Total Environment*, 461-462, 469–479. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.05.025>.
- Ren, B., Dai, H.-Q., Pei, G., Tong, Y.-J., Zhuo, Y., Yang, N., Su, M.-Y., Huang, P., Yang, Y.-Z., & Zhang, L.-X. (2014). ABC transporters coupled with the elevated ergosterol contents contribute to the azole resistance and amphotericin B susceptibility. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98 (6), 2609–2616. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5425-5>.
- Rosa, F. C., Santos, C. I. dos, Monteiro, C. de A., Soares, J. F., Pereira, J. K. R., Farias, J. R., & Soares, N. R. do N. (2021). Identificação de fungos patogênicos em areia da praia do Calhau, São Luís-Ma, litoral nordeste do Brasil. *Revista Saúde E Meio Ambiente*, 12 (1), 336–346.
- Ruiz, L. S., Sugizaki, M. F., Montelli, A. C., Matsumoto, F. E., Pires, M. F. C., Da Silva, B. C. M., Silva, E. H., Gandra, R. F., Gonçalves da Silva, E., Auler, M. E., & Paula, C. R. (2005). Fungemia by yeasts in Brazil: occurrence and phenotypic study of strains isolated at the Public Hospital, Botucatu, São Paulo. *Journal de Mycologie Médicale*, 15 (1), 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2004.12.002>.
- Sá, M. C. N., Sousa, H. R. de, Amaro, C. S. O., Pinheiro, D. N., Oliveira, M. M. M. de, & Pinheiro, M. da C. N. (2014). Isolamento de *Candida* no esfregaço cérvico-vaginal de mulheres não gestantes residentes em área ribeirinha do Estado do Maranhão, Brasil, 2012. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 5 (1), 25–34. <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232014000100003>.
- Saberinia, F., Farhangi, M., Yaghmaeian Mahabadi, N., Shokati, R., & Ghorbanzadeh, N. (2023). Antibiotic Resistance Index of Heterotrophic and Coliform Bacteria in Water and Sediment of Goharood River. *Journal of Water and Soil*, 36 (6), 743–759. <https://doi.org/10.22067/jsw.2022.72320.1088>.
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W., & Azeredo, J. (2012). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 36 (2), 288–305. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x>.
- Spampinato, C., & Leonardi, D. (2013). *Candida* Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents. *BioMed Research International*, 2013, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2013/204237>.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2020). *Breakpoint tables for interpretation of MICs for antifungal agents*.
- Vieira, A. J. H., & Santos, J. I. dos. (2017). Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 49 (3). <https://doi.org/10.21877/2448-3877.201600407>.
- Vincent, B. M., Lancaster, A. K., Scherz-Shouval, R., Whitesell, L., & Lindquist, S. (2013). Fitness Trade-offs Restrict the Evolution of Resistance to Amphotericin B. *PLoS Biology*, 11 (10), e1001692. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001692>.
- Vogel, C., Rogerson, A., Schatz, S., Laubach, H., Tallman, A., & Fell, J. (2007). Prevalence of yeasts in beach sand at three bathing beaches in South Florida. *Water Research*, 41 (9), 1915–1920. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.02.010>.

Anexos

Anexo 1: Regras de Formatação da Revista “Research, Society and Development”

Author Guidelines

1) Text structure:

- Title in this sequence: English, Portuguese and Spanish.
- The authors of the article (must be placed in this sequence: name, ORCID, institution, e-mail). NOTE: The ORCID number is individual for each author, and it is necessary for registration at the DOI, and in case of error, it is not possible to register at the DOI).
- Abstract and Keywords in this sequence: Portuguese, English and Spanish (the abstract must contain the objective of the article, methodology, results and conclusion of the study. It must have between 150 and 250 words);
- Body of the text (must contain the sections: 1. Introduction, in which there is context, problem studied and objective of the article; 2. Methodology used in the study, as well as authors supporting the methodology; 3. Results (or alternatively, 3. Results and Discussion, renumbering the other subitems), 4. Discussion and, 5. Final considerations or Conclusion);
- References: (Authors, the article must have at least 20 references as current as possible. Both the citation in the text and the item of References, use the formatting style of the APA - American Psychological Association. References must be complete and updated Placed in ascending alphabetical order, by the surname of the first author of the reference, they must not be numbered, they must be placed in size 8 and 1.0 spacing, separated from each other by a blank space).

- Título nesta sequência: inglês, português e espanhol.
- Resumo e Palavras-chave nesta sequência: Português, Inglês e Espanhol (o resumo deve conter o objetivo do artigo, metodologia, resultados e conclusão do estudo. Deve ter entre 150 e 250 palavras);
- Corpo do texto (deve conter as seções: 1. Introdução, em que há contexto, problema estudado e objetivo do artigo; 2. Metodologia utilizada no estudo, bem como autores que sustentam a metodologia; 3. Resultados (ou alternativamente, 3. Resultados e Discussão, renumerando os demais subitens), 4. Discussão e, 5. Considerações finais ou Conclusão);
- Referências: (Autores, o artigo deve ter no mínimo 20 referências tão atuais quanto possível. Tanto a citação no texto quanto o item de Referências, utilizar o estilo de formatação da APA - American Psychological Association. As referências devem ser completas e atualizadas. Ordem alfabética crescente, pelo sobrenome do primeiro autor da referência, não devem ser numerados, devem ser colocados em tamanho 8 e espaçamento 1,0, separados entre si por um espaço em branco).

3) Figures:

The use of images, tables and illustrations must follow common sense and, preferably, the ethics and axiology of the scientific community that discusses the themes of the manuscript. Note: the maximum file size to be submitted is 10 MB (10 mega).

Figures, tables, charts etc. (they must have their call in the text before they are inserted. After their insertion, the source (where the figure or table comes from ...) and a comment paragraph in which to say what the reader must observe is important in this resource The figures, tables and charts ... must be numbered in ascending order, the titles of the tables, figures or charts must be placed at the top and the sources at the bottom.

- A utilização de imagens, tabelas e ilustrações deve seguir o senso comum e, preferencialmente, a ética e axiologia da comunidade científica que discute os temas do manuscrito. Observação: O tamanho máximo do arquivo a ser enviado é de 10 MB (10 mega).
- Figuras, tabelas, quadros etc. (devem ter sua chamada no texto antes de serem inseridas. Após sua inserção, a fonte (de onde vem a figura ou tabela...) e um parágrafo de comentário para dizer o que o leitor deve observar é importante neste recurso As figuras, tabelas e gráficos ... devem ser numerados em ordem crescente, os títulos das tabelas, figuras ou gráficos devem ser colocados na parte superior e as fontes na parte inferior.