

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

**FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Candida* não-*C. albicans* PROVENIENTES
DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS EM COMPARAÇÃO A ISOLADOS DE
AMOSTRAS CLÍNICAS: O IMPACTO EM *ONE HEALTH***

WELLINTON JHON CUPOZAK PINHEIRO

**DOURADOS MS
2019**

WELLINTON JHON CUPOZAK PINHEIRO

**FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Candida* não-*C. albicans* PROVENIENTES
DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS EM COMPARAÇÃO A ISOLADOS DE
AMOSTRAS CLÍNICAS: O IMPACTO EM *ONE HEALTH***

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados-Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Área: Ciência Ambiental.

Orientadora: Prof^a Dr^a Kelly Mari Pires de Oliveira.

**DOURADOS MS
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

P654f Pinheiro, Wellinton Jhon Cupozak

Fatores de virulência de *Candida* não *Candida albicans* provenientes de águas subterrâneas em comparação a isolados de amostras clínicas: o impacto em One Health [recurso eletrônico] / Wellinton Jhon Cupozak Pinheiro. -- 2019.

Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Kelly Mari Pires de Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2019.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. *Candida*. 2. . 3. biofilmes. 4. . 5. enzimas hidrolíticas. 6. . 7. One Health. 8. . 9. água potável..
I. Oliveira, Kelly Mari Pires De. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis

José de Alencar.”

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por permitir que mais este ciclo se encerre em minha vida!

A minha família. Aos meus pais Natalício e Miguelina, por estarem comigo, mesmo de longe, me apoiando e torcendo para que esta etapa fosse concluída. Que tiveram muita paciência em ouvir meus desabaços de tristeza e de alegria, sempre me confortando. Obrigado por tudo, vocês são meus exemplos. Aos meus irmãos, Jhonatan e Grasielle, meus melhores amigos e irmãos. Obrigado pelo incentivo, amizade, parceria, amor, por estarem sempre comigo nos meus momentos mais difíceis e alegres. Saibam que sempre podem contar comigo. E também a minha cunhada Bianca e minha sobrinha Quezia, obrigado. Amo vocês!

A toda a minha família materna e paterna avós, primos (as) e tios (as). Obrigado pelas orações. Em especial a minha prima Caroline Cupozak, que além de prima é uma grande irmã de outra mãe. Com quem posso sempre contar, e sempre estive disposta a me ouvir nos momentos bons e ruins. Obrigado por torcer por mim e saiba que sempre torço pelo seu sucesso.

A minha orientadora Profa Dra Kelly Mari pires de Oliveira, muito obrigado pela oportunidade de poder participar do LMA desde a graduação, pela orientação, apoio, incentivos e conselhos a mim feitos para o meu crescimento profissional e pessoal, que Deus lhe abençoe grandemente.

Aos meus amigos do grupo de pesquisa Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA). Minha família científica, Adriana, Fabiana, Renata, Pamella, Bianca, Fernanda, Monyque, Pedro, Rafaela, Nathaly, Larissa, Mateus e Ana Paula. Muito obrigado pelos momentos que passamos juntos, pelas risadas, pelo auxílio nos meus experimentos e o grande aprendizado que compartilhamos não só dentro do laboratório, mas também fora. Em especial a Adriana (Dri), que sempre estive disposta a me ajudar, esclarecer minhas dúvidas no meu trabalho, e me aconselhando, meu muito obrigado. Vocês estão no meu coração.

Aos meus amigos que a vida me deu, Thaiane, Luis Recco, Flavia, Jhonatas, Annah Xavier, Fernando Selzer, Sthephanie, Andreza e demais. Muito obrigado por sempre estarem comigo, me apoiando e torcendo por mim, aguentando minha falta de paciência, saibam q não fiz por mal. Em especial ao Anderson por ter me aturado dia-a-dia nessa fase final. Muito obrigado de coração.

Aos meus melhores amigos/irmãos que a Biotec me deu, Matheus, Carolina, Ana Claudia, Maysa e Lucas, "MC JAML", meus irmãos de pais diferentes. Uma amizade da graduação que se tornou em um laço inquebrável, que com a diferença de cada um formamos este lindo grupo que é pra toda vida. Obrigado por tudo, pela parceria, pela paciência comigo em minhas mudanças repentinas de humor, pelas brigas, afinal que irmão nunca brigou?! Obrigado por fazerem parte da minha vida e que possamos realizar as nossas tão sonhadas viagens. Contem sempre com o "Jhon".

Aos meus amigos que a PROAE me deu Gleyce, Jean, Deborah, Natanael, que de parceiros de lar desenvolvemos um vínculo e companheirismo muito bom que com a distância não mudou, muito obrigado. Em especial a minha parceira e amiga de lar atual Gleyce que me atura dia-a-dia, que esteve comigo nos meus momentos de alegria e tristeza, me apoiando, obrigado pelas conversas e conselhos.

Aos professores e técnicos, da Universidade Federal da Grande Dourados e Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

A CAPES e FUNDECT pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

Meus mais sinceros agradecimentos.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1.** Diagrama englobando a interface Saúde Humana, Animal e Ambiental, representando *One Health* e seus objetivos (Adaptado de Elanco.com, 2016).....13
- Figura 2** Relação meio ambiente-humano- animal, presença de contaminantes na seleção de microrganismos e consequências aos recursos naturais (Fonte: O autor).....15
- Figura 3** Processo de formação de biofilmes como fontes de contaminação e infecção em sistemas de água potável (Adaptado, WINGENDER; FLEMMING, 2011).....21
- Figura 4** Estrutura do biofilme de *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Imagens de microscopia eletrônica de varredura obtidas após o crescimento do biofilme em SDB após 48 h (SILVA et al., 2011).21

Capítulo 2

- Figura 5.** Produção de enzimas hidrolíticas: Fosfolipase ($p=0,048$), Esterase ($p=0,002$), Hemolisinas ($p=0,595$), DNase ($p=0,787$) e Adesão ao poliestireno ($p>0,0001$) de CNCA isoladas de água subterrânea e amostras clínicas. 1: Abs/cm² ; 2: % hidrofobicidade; 3: PZ value36
- Figura 6.** Formação de biofilmes (abs/cm²) de CNCA na presença de água subterrânea e com Sabouraud Dextrose Broth (SDB).....37
- Figura 7.** Microscopia eletrônica de varredura mostra a formação de biofilmes de *C. parapsilosis* na presença de água subterrânea (AGS) e em Sabouraud Dextrose Broth (SDB). **A1 e A2** representa *C. parapsilosis* ATCC 22019 e isolado 8, respectivamente cultivadas na presença de AGS; **B1 e B2** representa *C. parapsilosis* ATCC 22019 e isolado 8, respectivamente cultivadas na presença de SDB.....37
- Figura 8.** Capacidade de formação de biofilmes de CNCA obtidas de água subterrânea e amostras clínicas. na presença de 0,5 e 2 mg/mL de Hipoclorito de Cálcio a 65%.....38
- Figura 9.** Curva de regressão dos biofilmes de CNCA isolados de água subterrânea com 0,5 e 2 mg/mL de Hipoclorito de Cálcio a 65%. **0:** controle positivo.**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 10.** Curva de regressão dos biofilmes de CNCA isolados de amostras clínicas com 0,5 e 2 mg/mL de Hipoclorito de Cálcio a 65%. **0:** controle positivo.**Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μ L- Microlitros

mg/mL- Miligramas por mililitros

Abs- Absorbância

AGS- Água Subterrânea

ANOVA- Análise de Variância

ATCC- *American Type Culture Collection*

AVMA- Associação Médica Veterinária Americana

CNCA- *Candida não Candida albicans*

CSH- *Cell Surface Hydrophobicity*/ Hidrofobicidade da Superfície Celular

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

EPS- Substâncias Poliméricas Extracelulares

FAO- Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

FCBA- Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais

OD- Densidade Óptica

OIE- Organização Mundial da Saúde Animal

PBS- Tampão Fosfato-Salino

Pz- Zona de Precipitação

RPM- Rotações por minuto

SDA- *Sabouraud Dextrose Ágar*/ Ágar Sabouraud Dextrose

SDB- *Sabouraud Dextrose Broth*/ Caldo Sabouraud Dextrose

UFC- Unidade Formadora de Colônia

UFGD- Universidade Federal da Grande Dourados

UTI- Unidade de Terapia Intensiva

WHO/ OMS- Organização Mundial da Saúde

Resumo

1

2 O conceito *One Health* está sendo utilizado a muitos anos e visa a integração de saúde humana,
3 veterinário e o meio ambiente, com medidas para a prevenção e o controle de enfermidades. O meio
4 ambiente está sujeito a interferências humanas como o uso e descarte inadequado de agentes
5 antimicrobianos procedentes da saúde humana e veterinário, materiais hospitalares, agrotóxicos e
6 fungicidas na agricultura, o que propicia a seleção e sobrevivência de microrganismos patogênicos.
7 As leveduras do gênero *Candida* fazem parte da microbiota normal humana, causam infecções
8 dermatogênicas e oportunistas em humanos. *Candida albicans* é a espécie mais estudada no entanto,
9 *Candida* não-*C. albicans* (CNCA) são isoladas no ambiente hospitalar e apresentam um aumento
10 na resistência aos antimicrobianos como também na formação de biofilmes em superfícies. No
11 entanto, estão emergindo para o meio ambiente, sendo encontradas em água potável. O objetivo do
12 estudo foi caracterizar os fatores de virulência e avaliar a formação de biofilmes de CNCA de
13 amostras de isolados clínicos e ambientais. Foram realizados ensaios *in vitro* no qual se avaliou a
14 hidrofobicidade da superfície celular, adesão, produção de enzimas hidrolíticas e formação de
15 biofilme. Em sua maioria os isolados de ambos ambientes foram hidrofóbicos e os isolados de
16 amostras clínicas tiveram propriedades adesivas maiores que os de água subterrânea. Os isolados de
17 ambos os ambientes produziram uma ou mais enzimas hidrolíticas extracelulares e formaram
18 biofilmes tanto na presença de água quanto na presença de hipoclorito de cálcio. Nossos resultados
19 mostram a presença de CNCA de amostras clínicas e de água subterrânea, com fatores iniciais para
20 a virulência o que é preocupante pois, são patógenos oportunistas com capacidade de sobreviver em
21 quantidade reduzida de nutrientes e estão em contato constante com o ser humano e animais. Deve-
22 se considerar uma abordagem que envolva o conceito de *One Health* na tentativa de controle de
23 CNCA.

24 **Palavras-chave:** *Candida*, biofilmes, enzimas hidrolíticas, *One Health*, água potável.

25

Abstract

The One Health concept has been in use for many years and aims to integrate animal health, human health and the environment with measures for disease prevention and control. The environment is subject to human interference such as the inappropriate use and disposal of antimicrobial agents from human and animal health, hospital materials, agrochemicals and fungicides in agriculture, which favors the selection and survival of pathogenic microorganisms. *Candida non-Candida albicans* (CNCA) are isolated in the hospital environment and present an increase in resistance to antimicrobials as well as in the formation of biofilms on surfaces. However, they are emerging into the environment, being found in drinking water. The aim of the study was to characterize the virulence factors and evaluate the formation of biofilms CNCA isolated from clinical samples and groundwater. In vitro assays were performed in which cell surface hydrophobicity, adhesion, hydrolytic enzyme production and biofilm formation were evaluated. Most of the isolates from both environments were hydrophobic and those from clinical samples had higher adhesive properties than groundwater. Isolates from both environments produced one or more extracellular hydrolytic enzymes and formed biofilms only in the presence of water and calcium hypochlorite. Our results show the presence of CNCA in clinical samples and in groundwater with initial factors for virulence, which is worrying because they are opportunistic pathogens with the capacity to survive in a reduced amount of nutrients and are in constant contact with humans and animals . An approach that involves the concept of One Health in the attempt to control CNCA should be considered.

Key words: *Candida*, biofilms, hydrolytic enzymes, One Health, drinking water.

Sumário

Resumo.....	viii
Abstract	ix
1. INTRODUÇÃO.....	11
CAPÍTULO 1.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 <i>One Health</i>	13
2.1.1 Meio Ambiente em <i>One Health</i> : resistência antimicrobiana.....	15
2.1.2 Água Potável.....	16
2.2 <i>Candida</i> spp.....	17
2.3 Fatores de Virulência de Leveduras	18
2.3.1 Hidrofobicidade	19
2.3.2 Adesão.....	19
2.3.3 Enzimas Hidrolíticas	21
2.3.4 Biofilmes.....	20
3. OBJETIVOS	23
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
CAPÍTULO 2.....	30
1. MANUSCRITO: Revista <i>International Journal of Environmental Research and Public Health</i> (A2 / 2.145)	30
7. ANEXOS	45

1. INTRODUÇÃO

O uso do conceito *One Health* vem crescendo nos últimos anos, é a integração interdisciplinar entre saúde humana, saúde animal e meio ambiente com medidas para prevenção e controle de enfermidades (EVANS; LEIGHTON, 2014; MARDONES et al., 2017). Na busca por prevenir os impactos na saúde global, estas medidas são tomadas em reuniões conjuntas por responsáveis do setor público e privado diante de mecanismos que envolvam as três áreas do conceito de *One Health* (EVANS; LEIGHTON, 2014; ESSACK, 2018).

Primeiramente na área animal, com o uso em larga escala de medicamentos promotores de crescimentos, antibióticos para fins terapêuticos e profiláticos, fez com que o conceito de *One Health* fosse empregado pela medicina veterinária para buscar estratégias de prevenção de doenças e a resistência aos antimicrobianos, como também o impacto no meio ambiente gerado pelo descarte de efluentes de instalações pecuárias e aquícolas que contenha antimicrobianos (CONRAD et al., 2009; STÄRK et al., 2015; MARDONES et al., 2017).

O meio ambiente é o que está mais sujeito a atividades antrópicas, sendo via de armazenamento para microrganismos, drogas antimicrobianas advindos de uso veterinário e do ser humano, fungicidas agrícolas e materiais hospitalares (QUEENAN et al., 2016; ESSACK, 2018; AMANI et al., 2018). O contato destes resíduos contaminantes ocasiona em efeitos ao solo e aos recursos naturais como a água, contribuindo assim para a seleção de microrganismos resistentes que, posteriormente, afetam o ser humano (MARAN et al., 2016; QUEENAN et al., 2016; GOGOI et al., 2018).

Diante da necessidade em controlar a resistência microbiana e seus impactos no meio ambiente, ser humano e animal, o conceito de *One Health* foi extrapolado na saúde humana como prioridade no mundo todo (WHO, 2015; GEORGE et al., 2018). A saúde humana está sujeita aos microrganismos selecionados com o uso de antimicrobianos na veterinária e presentes no meio ambiente, além do uso de antibióticos de maneira errônea pelo próprio ser humano (QUEENAN et al., 2016; MENDELSON et al., 2018).

As leveduras do gênero *Candida* fazem parte da microbiota normal do ser humano, passou a ser associadas com casos graves de infecções no ambiente hospitalar principalmente em pacientes imunocomprometidos e atualmente, a emergência de leveduras *Candida* Não-*Candida albicans* (CNCA) tem sido motivo de preocupação (SILVA et al., 2011; ANDES et al., 2016). Estas leveduras CNCA estão presentes no meio ambiente sendo isoladas de lagos, rios e águas subterrâneas (HAGESKAL et al., 2009; PEREIRA et al., 2009; MARAN et al., 2016; BABIC et al., 2017)

CNCA apresentam fatores de virulência que facilitam um processo infeccioso como a capacidade de adesão, produção de enzimas hidrolíticas e também a resistência aos antimicrobianos

1 (SILVA et al., 2011; FATAHINIA et al., 2017; BOWEN et al., 2018). A capacidade de adesão de
2 *Candida* spp., a qualquer substrato, é a primeira etapa para a formação de biofilmes, este que é
3 composto por um conglomerado de microrganismos que estão envoltos por uma matriz extracelular
4 rica em polissacarídeos, como forma de sobrevivência em superfícies bióticas e abióticas. (SILVA et
5 al., 2012; TREVIÑO- RANGEL et al., 2015).

6 Assim, neste contexto *One Health*, onde não ocorre a indissociação do ambiente, veterinário
7 e humano, nosso objetivo foi avaliar as características de virulência de leveduras isoladas de água
8 subterrânea e de infecções clínicas da Região da Grande Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

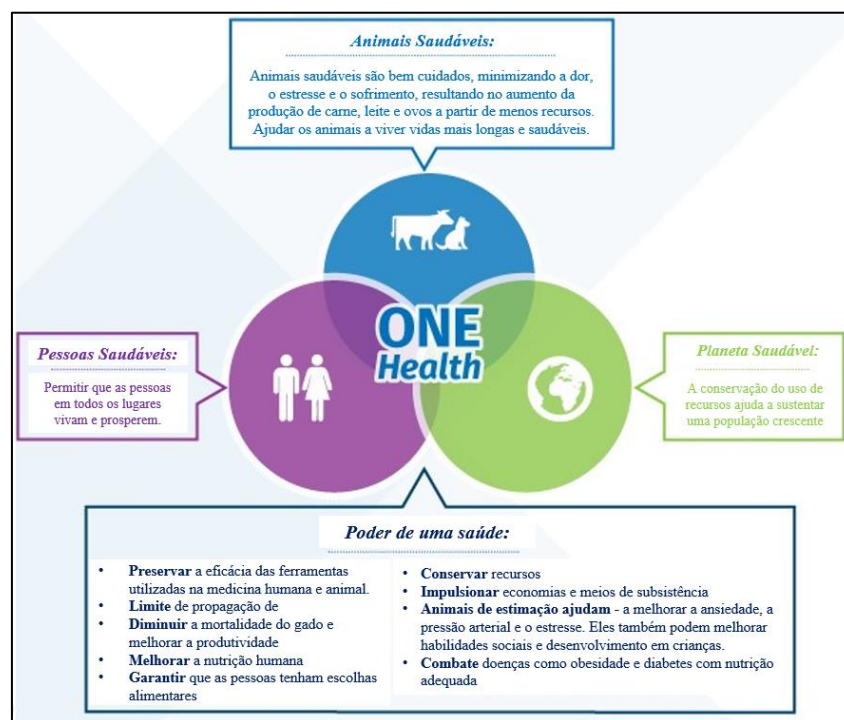
9

1 CAPÍTULO 1

2 2. REVISÃO DE LITERATURA

3 2.1 *One Health*

4 O termo *One Health* (saúde única) voltou a ser utilizado nos últimos anos e trata-se da
 5 reconceitualização de saúde através da integração entre saúde humana, veterinária e meio ambiente
 6 juntamente com medidas de prevenção e controle de enfermidades (Figura 1) (EVANS; LEIGHTON,
 7 2014; MARDONES et al., 2017; ESSACK, 2018). Este conceito visa garantir a saúde para o ser
 8 humano, animais e ao meio ambiente, por meio de decisões tomadas em conjunto por setores públicos
 9 e privados, que buscam mecanismos eficientes para avaliações de riscos à gestão da saúde global
 10 (EVANS; LEIGHTON, 2014; STÄRK et al., 2015; ROSTAL et al., 2018).



11 **Figura 1.** Diagrama englobando a interface Saúde Humana, Animal e Ambiental,
 12 representando *One Health* e seus objetivos (Adaptado de Elanco.com, 2016).
 13
 14

15 Primeiramente, a partir de 2007 o conceito de *One Health* foi empregado nos campos da
 16 medicina veterinária, em que a Associação Médica Veterinária Americana (AVMA) reforçou seu uso
 17 na tentativa de controlar e prevenir zoonoses e doenças transfronteiriças em animais, toxicidade da
 18 água devido a agentes patogênicos e agroquímicos e à resistência microbiana. Como forma de obter
 19 este controle, envolvendo iniciativas *One Health*, a pesquisa integrada de forma interdisciplinar
 20 necessitou do aprimoramento de profissionais e do desenvolvimento de centros de excelência
 21 voltados para o impacto em saúde pública e animal (CONRAD et al., 2009; ASOKAN, 2015;
 22 MARDONES et al., 2017).

1 Por ter sido bem aceito, este conceito foi extrapolado em relação à saúde humana a partir de
2 um plano de ação global emitido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2015, juntamente
3 com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e Organização
4 Mundial da Saúde Animal (OIE). Este plano alerta acerca da alta resistência antimicrobiana e as
5 consequências futuras a população e o meio ambiente. Despertou-se então o interesse em utilizar o
6 conceito *One Health* para controlar esta resistência, envolvendo setores mundiais e locais pois, com
7 o avanço sustentável mundial e as conquistas em saúde, poderiam ser corrompidos e afetar os setores
8 econômicos, como na indústria farmacêutica (WHO, 2015; QUEENAN et al., 2016; GOGOI et al.,
9 2018; MENDELSON et al., 2018).

10 Recentemente, o conceito *One health* foi utilizado com sucesso na saúde humana para o
11 controle do vírus da Febre do Vale do Rift e do Ebola na África, disseminados nos últimos tempos.
12 Com o uso de estratégias implementadas por iniciativas globais e regionais, obteve-se uma melhor
13 eficiência dos recursos investidos e uma redução dos custos quando utilizado alternativas propostas
14 pelo conceito de *One Health*, de maneira que, a integração de áreas para se atingir um único objetivo
15 é importante pois, os resultados positivos beneficiam outros objetivos em cadeia (ROSTAL et al.,
16 2018).

17 Outro estudo relata a respeito de doenças respiratórias ocasionadas por vírus da Influenza,
18 Coronavirus, Adenovírus e Enterovírus, que possuem reservatórios zoonóticos e que causam efeitos
19 adversos à saúde humana e animal, impactando secundariamente o meio ambiente. É sugerido que a
20 abordagem *One Health* seja amplamente incorporada nas mais distintas áreas disciplinares para a
21 população, dada a complexidade desses vírus (virulência, mutações, relação homem-animal
22 complexa, etc.) e alternativas inovadoras para os atuais métodos de detecção de vírus zoonóticos
23 potencialmente emergentes (BAILEY et al., 2018).

24 O conceito de *One Health* torna-se um modelo padrão pois, a saúde é determinada por
25 diversos fatores de forma contínua e abrangente, que envolve amplamente ecossistemas, população
26 humana e animais, a segurança alimentar, a biodiversidade, a prosperidade econômica e o bem-estar
27 emocional e mental (EVANS; LEIGHTON, 2014; STÄRK et al., 2015). Fatores que afetam a
28 interface ecossistema-animal-saúde humana e exigem um trabalho de forma integrada são:
29 microrganismos resistentes aos antimicrobianos em humanos e em animais, escassez de água potável,
30 poluição e contaminantes no meio ambiente, suficiência e insegurança alimentar e a condição global
31 devido a mudanças ambientais (EVANS; LEIGHTON, 2014).

2.1.1 Meio Ambiente em *One Health*: resistência antimicrobiana

O meio ambiente é considerado o mais complexo dos três pilares que envolvem o conceito *One Health* (ESSACK, 2018). Diversos eventos antropogênicos afetam este ambiente, dentre eles a presença de antibióticos derivados do descarte de materiais hospitalares, efluentes com antibióticos e fungicidas agrícolas (MYUNG, 2015; AMANI et al., 2018; GOGOI et al., 2018). A permanência desses resíduos contaminantes no meio ambiente de maneira indiscriminada, quando lixiviados ocasionam efeitos adversos ao solo, a água e efluentes e contribui para a seleção de microrganismos resistentes ali presentes (Figura 2) (GOMES et al., 2014; QUEENAN et al., 2016; CORDEIRO et al., 2017; MENDELSON et al., 2018).



Figura 2 Relação meio ambiente-humano- animal, presença de contaminantes na seleção de microrganismos e consequências aos recursos naturais (Fonte: O autor).

Na medicina veterinária, há uma utilização em larga escala de antimicrobianos para fins terapêuticos em animais de grande e pequeno porte, ou para promover o crescimento em animais produtores de alimentos. Mesmo após a restrição em animais, seu uso de maneira errônea contribui para a resistência antimicrobiana e pode afetar o meio ambiente pelo contato com os efluentes de instalações pecuárias e aquícolas, e/ou descarte dos materiais contendo os antimicrobianos (QUEENAN et al., 2016; MARDONES et al., 2017; GEORGE, 2018).

O que não difere na saúde humana, pelo uso indiscriminado de medicamentos pelo ser humano ser considerado uma das grandes causas do aumento de microrganismos resistentes, a interrupção do tratamento com antibiótico indicado ou a aquisição do mesmo sem prescrição médica. Como também a presença de contaminantes no meio ambiente advindos do descarte de efluentes de

1 origem humana ou da indústria farmacêutica, auxilia na seleção de microrganismos resistentes
2 (QUEENAN et al., 2016; GOGOI et al., 2018).

3 A resistência antimicrobiana é um problema global que vem sendo alvo de alternativas para
4 seu controle no mundo todo. A OMS publicou um plano de ação global em que orienta ações para
5 sua solução (WHO, 2015; QUEENAN et al., 2016). No conceito de *One Health*, além dos impactos
6 na saúde humana e animal, a presença do descarte de antimicrobianos no meio ambiente deve ser
7 controlada pois, a seleção de microrganismos resistentes afeta a microbiota do ambiente e também os
8 recursos naturais (GOMES et al., 2014; QUEENAN et al., 2016; GOGOI et al., 2018; GEORGE,
9 2018).

10 A água potável destinada ao consumo humano e animal na rede pública e/ou privada é obtida
11 através da captação de recursos hídricos de águas superficiais e/ou subterrâneas (ROCHA et al., 2015;
12 BABIČ et al., 2016; MARAN et al 2016). O consumo pelo ser humano destas águas contendo
13 microrganismos patogênicos resistentes aos antimicrobianos é preocupante, uma vez que é relatado
14 em amostras de água a presença de bactérias e fungos (HAGESKAL et al., 2009; PEREIRA et al.,
15 2013; BABIČ et al., 2017). Como por exemplo, estudos têm demonstrado a presença frequente de
16 leveduras do gênero *Candida* encontradas no meio ambiente, em água subterrâneas, rios e efluentes
17 (PEREIRA et al., 2009; BABIČ et al., 2016; SASAKI, 2017; AMANI et al., 2018).

18

19 **2.1.2 Água Potável**

20 Como forma alternativa para abastecimento privado além da rede de autarquia, a população
21 tem optado pela construção de poços para captação de águas subterrâneas. Entretanto, a construção
22 de poços de maneira empírica pode comprometer a qualidade e potabilidade da água, onde existem
23 vários interferentes como: tipos de poços (caipira/cavado, artesiano ou semi artesiano), forma de
24 perfuração, profundidade e a proximidade com fossa séptica (HYNDS et al., 2014; MARAN et al.,
25 2016).

26 A água fornecida pela rede autárquica deve ser uma água segura para o consumo humano,
27 mas, em propriedades privadas o monitoramento e o tratamento de água potável se tornaram
28 necessários e onerosos (RISEBRO et al., 2012; FOX et al., 2016). A fim de se averiguar os parâmetros
29 microbiológicos para a potabilidade da água, é avaliada a presença ou ausência de bactérias do grupo
30 coliformes totais e *Escherichia coli* (BRASIL, 2011; WHO, 2011). A presença de *E. coli* em água é
31 indicativo de contaminação fecal e a sua resistência aos antimicrobianos é descrita em regiões onde
32 há saneamento básico precário, sendo encontrada em águas superficiais e subterrâneas e até mesmo
33 em água de fonte mineral (PEREIRA et al., 2013; ROCHA et al., 2015; MARAN et al., 2016).

1 Devido sua ação contra bactérias patogênicas, a OMS indica o tratamento de água potável
2 em rede privada e em estações de tratamento com hipoclorito de cálcio a 65% ou hipoclorito de sódio,
3 com um teor mínimo de 2 mg/L (WHO et al., 2013). Entretanto, o uso inadequado de hipoclorito de
4 cálcio em grande escala pela população e estações de tratamento, juntamente com o descarte deste
5 composto no meio ambiente faz com que ocorra a seleção de microrganismos resistentes ao cloro
6 (GOMES et al., 2016; BABIČ et al., 2017; GOGOI et al., 2018). Sasaki (2017), avaliou a atividade
7 de hipoclorito de cálcio frente leveduras isoladas de água subterrânea e estas se apresentaram
8 resistentes nas concentrações de 0,06 a 13 mg/mL.

9 A presença de leveduras, principalmente as patogênicas, não são preconizadas em análises
10 de monitoramento para água potável, o que se torna preocupante na comunidade científica
11 (HAGESKAL et al., 2009; BABIČ et al., 2016; BABIČ et al 2017). Estas podem estar presentes na
12 água de forma natural ou por meio atividades antrópicas como a perfuração de poços. A capacidade
13 de se adaptar a um microambiente com quantidade reduzida de nutrientes, a permanência por longos
14 períodos e o contato com o ser humano torna-se um alerta pois, estas podem se integrar à microbiota
15 normal do indivíduo até futura patogenia (WINGENDER; FLEMMING, 2011; GOMES et al., 2014;
16 BABIČ et al 2017).

17 Estudos têm evidenciado a preocupação de leveduras em águas superficiais, efluentes
18 domésticos e industriais e em águas subterrâneas (PEREIRA et al., 2009; BABIČ et al., 2016;
19 SASAKI, 2017; AMANI et al., 2018). A presença da levedura do gênero *Candida* é relatada em água
20 subterrânea em países como Eslovênia, Portugal e Brasil (HAGESKAL et al., 2009; PEREIRA et al.,
21 2009; BABIČ et al., 2016; SASAKI, 2017). Além da presença natural de *Candida* spp. no meio
22 ambiente, a água pode ocasionar seu transporte para o ser humano e/ou animais, como também de
23 leveduras resistentes ao antimicrobianos, sendo motivo de alerta de futura patogenia em relação ao
24 consumo destas águas pelos indivíduos (HAGESKAL et al., 2009; MUYNG et al., 2015; SASAKI,
25 2017).

27 **2.2 *Candida* spp.**

28 O gênero *Candida* possui mais de 100 espécies descritas e fazem parte da microbiota
29 endógena do ser humano presente em 20% a 80% da população adulta saudável, colonizando
30 principalmente o trato gastrointestinal, a vagina, boca, pele e unhas (SILVA et al., 2011; DADAR et
31 al., 2018). Causam infecções oportunistas em indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos,
32 como infecções sistêmicas ou superficiais sendo aftas, candidíase e candidúria, micose em unhas
33 (MUADCHEINGK; TANTIVITAYAKUL, 2015; QUEIROZ et al., 2015; DADAR et al., 2018).

1 No ambiente hospitalar, havia uma preocupação somente com infecções bacterianas no ser
2 humano no entanto, nas últimas duas décadas começaram-se a relacionar infecções transversais por
3 leveduras do gênero *Candida* em indivíduos e nos dispositivos médicos, onde estas são encontradas
4 em cateteres, sondas, próteses, equipamentos de unidade de terapia intensiva (UTI) e em líquidos
5 cavitários como sangue, urinas, secreções (ALMEIDA et al., 2013; MOTHIBE; PATEL, 2017;
6 TREVIÑO-RANGEL et al 2018).

7 *Candida albicans* é a principal espécie, a mais estudada e relacionada com infecções
8 oportunistas (DADAR et al., 2018). No entanto outras espécies deste gênero, como *C. glabrata*, *C.*
9 *tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, denominadas por *Candida* não-*C. albicans* (CNCA) estão sendo
10 encontradas com frequência como patógenos humanos. O aumento do isolamento de CNCA no
11 ambiente hospitalar em dispositivos médicos e secreções, foi associado aos principais fatores de
12 virulência para este gênero como também a resistência destes a antifúngicos (SILVA et al., 2012;
13 MUADCHEINGK; TANTIVITAYAKUL, 2015; ARAÚJO et al., 2017).

14 Diversos autores destacam o isolamento de CNCA do ambiente, como em água potável
15 (BABIČ et al., 2016; SASAKI, 2017), mineral (ISHIDA et al., 2012), rios e lagos (PEREIRA et al.,
16 2009), evidenciando a ubiquidade deste gênero em se adaptar a diversos locais. No Brasil, *C.*
17 *parapsilosis* é a espécie mais encontrada em água subterrânea (SASAKI, 2017). *C. glabrata*, *C.*
18 *tropicalis* e *C. parapsilosis*, são encontradas com frequência em ambientes hospitalares (STORTI et
19 al., 2012; SAVASTANO et al., 2016). No estado de Mato Grosso do Sul (MS), *C. glabrata*, *C.*
20 *tropicalis* e *C. parapsilosis* são as espécies que mais causam candidemia em pacientes (ALMEIDA
21 et al., 2013; MATTOS et al., 2017; ALENCAR et al., 2017).

22 A transferência de leveduras CNCA do meio ambiente para o ambiente hospitalar e seus
23 fatores de virulência que envolvem o processo infeccioso são um problema crescente e afetam as
24 áreas que envolvem o conceito *One Health*, a saúde humana-animal-ambiental, o que necessita de
25 medidas para seu controle. Na saúde humana *C. glabrata* e *C. parapsilosis* são as espécies mais
26 encontradas em infecções invasivas e em candidemia persistente por cateter venoso central
27 (ARENDRUP, 2010; STORTI et al., 2012; KANG et al., 2017). Na saúde animal, *C. parapsilosis* e
28 *C. tropicalis* são um problema por causarem infecções em animais (BRILHANTE et al., 2016;
29 CORDEIRO, et al., 2017).

31 **2.3 Fatores de Virulência de Leveduras**

32 A capacidade de adesão e formação de biofilmes, hidrofobicidade de sua superfície celular
33 e secreção de enzimas hidrolíticas são fatores relacionados com a capacidade das leveduras serem
34 patogênicas e causarem doença.

2.3.1 Hidrofobicidade

A hidrofobicidade da superfície celular (CSH) é importante no processo infeccioso para as leveduras do gênero *Candida* pois, pode auxiliar na aderência e conseqüentemente na formação de biofilmes. É uma propriedade intrínseca presente na camada celular externa da levedura, em que interações físico-químicas permitem que estas se agreguem e se desenvolvam em superfícies bióticas ou inertes como materiais hospitalares, domésticos e industriais (SILVA et al., 2012). A CSH de *Candida* spp., pode ser determinada a partir da interação com hidrocarbonetos xileno, *n*-hexadecano, em que após a separação das fases é realizado a quantificação da fase aquosa e então as células são classificadas em hidrofílicas ou hidrofóbicas ao solvente (RAUT et al., 2010; AMANI et al., 2018).

Células hidrofóbicas são mais virulentas do que hidrofílicas, este por ser um dos mecanismos de defesa que a levedura apresenta contra a ação de agentes antimicrobianos, impedindo que estes penetrem nas células e facilite sua adesão a superfícies. No indivíduo, este fator contribui no processo infeccioso, como é relatado na literatura quando se trata de células epiteliais (MUADHEINGKA; TANTIVITAYAKUL, 2015; PEREIRA et al., 2016). Não só isolados clínicos podem apresentar hidrofobicidade a hidrocarbonetos, esta pode ser observada também em isolados ambientais (AMANI et al., 2018).

2.3.2 Adesão

A adesão, além de estar relacionada com a hidrofobicidade e a interações eletrostáticas, é o passo inicial para a formação de biofilmes de *Candida* spp (RAUT et al., 2010; SILVA et al., 2011; SILVA et al., 2012). No processo infeccioso a adesão é um fator fundamental pois, as leveduras se instalam de maneira irreversível e mediadas por proteínas presentes na membrana celular da levedura denominadas adesinas, irão interagir com as células da mucosa oral, vaginal, pele e então iniciarem a secreção de enzimas hidrolíticas extracelulares (SILVA et al., 2011; FATAHINIA et al., 2017; MOTHIBE; PATEL, 2017).

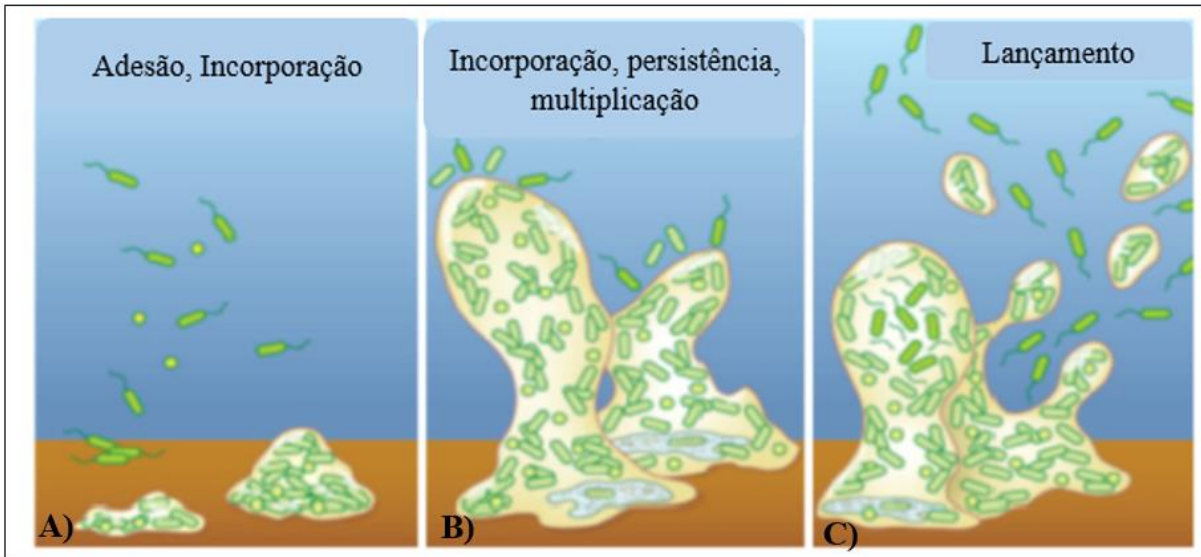
Em superfícies inertes, a integridade e as interações físico-químicas do material e as células da levedura, a presença de líquidos ricos em nutrientes, auxiliam o processo de aderência. Dispositivos médicos são os mais conhecidos, no entanto a adesão de leveduras em ambientes industriais e domésticos tem sido causa de alerta, por se tornarem uma fonte de contaminação constante, uma vez que se instalam de maneira que seja propício a formação de biofilmes e como proteção a agentes sanitizantes e antimicrobianos. (QUEIROZ et al., 2015; TOMIČIĆ et al., 2017; AMANI et al., 2018).

2.3.3 Biofilmes

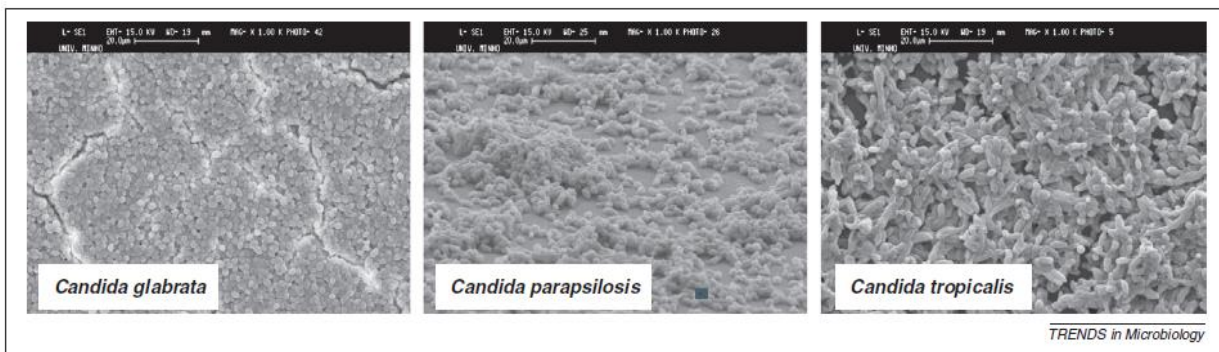
A formação de biofilme fúngico é um processo bem organizado. Definido por um complexo estruturado em comunidade de microrganismos rodeados por uma matriz extracelular de polissacarídeos, aderidos um ao outro numa superfície ou interface (SILVA et al., 2011; ESTIVIL et al., 2011). É realizado em três momentos (Figura 3): **A**) o primeiro sendo o pré-condicionamento e adesão, no qual a levedura em fase planctônica é transportada e se adere a superfície; **B**) Fase intermediária onde se inicia a formação de microcolônias de leveduras, que servirão de base, estando cada microcolônia aderida à superfície, com moléculas de sinalização célula-célula e a produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS); **C**) Maturação, estando completa a formação de hifas e pseudohifas e a produção de EPS rica em proteínas e polissacarídeos, ocorre o desprendimento das células filhas que são transportadas para uma nova adesão (WINGENDER; FLEMMING, 2011; TREVIÑO-RANGEL et al., 2015; BOWEN et al., 2018).

A estrutura do biofilme pode variar entre as espécies CNCA no processo infeccioso e ao se instalar em superfícies, sendo que a matriz que envolve os biofilmes atua na proteção dos microrganismos ali presentes contra condições de estresse, é composta principalmente por proteínas, carboidratos e outras moléculas (Figura 4; WINGENDER; FLEMMING, 2011; GOMES et al., 2014). Biofilmes formados por *C. parapsilosis*, apresentam uma biomassa maior e compacta, com multicamadas de EPS composta por grandes quantidades de proteínas e baixos níveis de carboidratos. Os biofilmes de *C. tropicalis* são formados por blastoconídeos e hifas, EPS espessas com hexosaminas e baixo teor de carboidratos e proteínas. No biofilme de *C. glabrata* suas células estão inseridas em uma matriz extracelular delgada, a qual é composta por altos níveis de carboidratos e proteínas. (SILVA et al., 2009; SILVA et al., 2011; NEGRI et al., 2015).

No ambiente hospitalar, a formação de biofilmes em dispositivos médicos por *Candida* spp., são um problema constante e estão associados com casos de infecções, o que dificulta o tratamento antimicrobiano (SILVA et al., 2011; ESTIVIL et al., 2011; ARAÚJO et al., 2017). No meio ambiente, em água potável é relatado que *Candida* spp. são capazes de formar biofilmes, como por exemplo na rede de distribuição doméstica. Fazendo com que ocorra a manutenção dos biofilmes por longos períodos e em constante contato com o indivíduo que consome a água. Como consequência, ocorre alterações nas propriedades organolépticas da água, degradação da tubulação e a resistência aos métodos de desinfecção (PEREIRA et al., 2009; GOMES et al., 2014; BABIČ et al., 2016; LIU et al., 2017).



1
2 **Figura 3** Processo de formação de biofilmes como fontes de contaminação e infecção em sistemas de água potável
3 (Adaptado, WINGENDER; FLEMMING, 2011).
4



5
6 **Figura 4** Estrutura do biofilme de *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Imagens de microscopia eletrônica
7 de varredura obtidas após o crescimento do biofilme em SDB após 48 h (SILVA et al., 2011).
8

9 2.3.4 Enzimas Hidrolíticas

10 A secreção de enzimas hidrolíticas como fosfolipases, esterases, hemolisinas e DNases
11 caracterizam fatores iniciais no processo de infecção por *Candida* spp, por auxiliar na destruição das
12 células e na ação do sistema imune do indivíduo (SILVA et al., 2011; FATAHINIA et al., 2017;
13 TREVIÑO-RANGEL et al., 2018).

14 Considerada uma das principais enzimas hidrolíticas produzidas por *Candida* spp., as
15 fosfolipases atuam na hidrólise dos fosfolipídios da membrana celular, facilitando a invasão da
16 levedura na célula do hospedeiro (PEREIRA et al., 2016; WIEBUSH et al., 2017; TREVIÑO-
17 RANGEL et al., 2018). Classificadas em A, B, C e D, de acordo com o sítio de clivagem da ligação
18 éster, transformando-os em subprodutos: diacilglicerol (DAG), ácidos graxos livres (FFAs), ácido
19 fosfatídico (PA), e liso-fosfolipídios (LPLs) (BARMAN et al., 2018). *In vitro*, a produção de
20 fosfolipase pode ser observada em ágar contendo gema de ovo, no qual a degradação dos fosfolipídios

1 é avaliada pela formação de um precipitado em torno da colônia de levedura (PRICE et al., 1983;
2 SAMARANAYAKE et al., 2005).

3 As esterases fazem parte das enzimas lipofílicas, juntamente com as fosfolipases e com a
4 liberação dos ácidos graxos se ligam às moléculas de cálcio (SLIFKIN, 2000). É relatado que a
5 produção desta enzima por *Candida* spp., auxilia na invasão destas nas células do hospedeiro,
6 principalmente em imunocomprometidos (KUMAR et al., 2006; FATAHINIA et al., 2017; AMANI
7 et al., 2018). Sua produção, pode ser observada *in vitro* por meio do teste de opacidade na presença
8 Tween, onde o complexo de cálcio é visualizado como cristais insolúveis ao redor da colônia. Esta
9 enzima também pode ser observada em bactérias e outras leveduras (SLIFKIN, 2000; KUMAR et
10 al., 2006; PAKSHIR et al., 2013).

11 Enzimas hemolíticas ou hemolisinas são consideradas como elementos chaves na virulência
12 de *Candida* spp., pois degradam a hemoglobina/hemina para obter ferro e desenvolver seus
13 blastoconídeos e pseudohifas que invadem as células do hospedeiro (LUO et al., 2001; SILVA et al.,
14 2011; SILVA et al., 2012). Em ágar acrescido de sangue e glicose é avaliado a produção desta enzima
15 *in vitro*, em que observa-se a presença de um halo esverdeado (lise total) ou translúcido (lise parcial),
16 considerando como produção positiva para a enzima (LUO et al., 2001; FRANÇA et al., 2017). Das
17 CNCA, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* são capazes de produzir este fator, lisando os
18 eritrócitos parcialmente ou totalmente (NEGRI et al., 2010; RICETO et al., 2015; AMANI et al.,
19 2018).

20 A DNase (desoxirribonuclease) degrada o DNA celular inativando-o e sua produção
21 juntamente com outras enzimas hidrolíticas é considerada um contribuinte para virulência.
22 Inicialmente, sua produção foi descrita por bactérias *Staphylococcus* e *Streptococcus* spp., entretanto
23 para leveduras o tema está sendo pouco explorado (SÁNCHEZ; COLOM, 2010; MARTINS et al.,
24 2012). Os primeiros relatos se deram com as leveduras do gênero *Cryptococcus*, onde a presença
25 desta enzima foi comparada com a evasão do sistema imune inato, no qual a presença de neutrófilos
26 auxilia na morte da levedura (SÁNCHEZ; COLOM, 2010). Já para leveduras do gênero *Candida*
27 existem poucos relatos, mas foi descrito que *C. glabrata* e *C. albicans* podem produzir tal enzima
28 (MARTINS et al., 2012; RICETO et al., 2015; MENEZES et al., 2016; TREVIÑO-RANGEL et al.,
29 2018).

30
31

1 **3. OBJETIVOS**

2 **3.1 Objetivo Geral**

3 Avaliar os fatores de virulência e a formação de biofilmes de leveduras *Candida não-Candida*
4 *albicans* (CNCA) provenientes de águas subterrâneas e comparar com isolados de amostras
5 clínicas

6

7

8 **3.2 Objetivos Específicos**

- 9 • Avaliar a produção de enzimas hidrolíticas de leveduras de CNCA.
- 10 • Determinar a hidrofobicidade da superfície celular de CNCA.
- 11 • Quantificar a adesão inicial de CNCA em microplacas de poliestireno.
- 12 • Quantificar a formação de biofilmes de CNCA na presença de água potável.
- 13 • Avaliar a ação de hipoclorito de cálcio a 65% em biofilmes de CNCA.
- 14 • Observar a estrutura dos biofilmes de CNCA por microscopia eletrônica de varredura.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALENCAR, D. S. O.; TSUJISAKI, R. A. S.; SPOSITTO, F.L.E.; NUNES, M. O.; ALMEIDA, A.A.; MARTINS, M. A.; MELHEM, M. S. C.; CHANG, M.R. Candidaemia due to *Candida parapsilosis* species complex at a hospital in Brazil: Clinical characteristics and antifungal susceptibility profile. **Rev Iberoam Micol.** v. 34, n. 2, p. 106–108, 2017.
- ALMEIDA, A.A.; MESQUITA, C.S.S.; SVIDZINSKI, T.I.E.; OLIVEIRA, K.M.P. Antifungal susceptibility and distribution of *Candida* spp. isolates from the University Hospital in the municipality of Dourados, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Tro.** v. 46, n. 3, p. 335-339, 2013.
- AMANI, D.; EMIRA, N.; ISMAIL, T.; JAMEL, E.; DOMINIQUE, S.; ROSA, D. C.; MEJDI, S. Extracellular enzymes and adhesive properties of medically importante *Candida* spp. strains from landfill leachate. **Microbial Pathogenesis**, v.116, p.328–334, 2018.
- ARAÚJO, D.; HENRIQUES, M.; SILVA, S. Portait of *Candida* Species Biofilm Regulatory Network Genes. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 1, 2017.
- ARENDRUP, M. C. Epidemiology of invasive candidiasis. **Current Opinion Critical Care.** v.16, p. 445–452, 2010
- ASOKAN, G. V. One Health and Zoonoses: The Evolution of One Health and Incorporation of Zoonoses. **Central Asian Journal of Global Health**, v.4, n.1, 2015
- BABIČ, M.N.; ZALAR, P.; ŽENKOB, B.; DŽEROSKIB, S.; GUNDE-CIMERMAN, N. Yeast and yeast-like fungi in tap water and groundwater, and their transmission to household appliances. **Fungal Ecology**, v. 20, p. 30-39, 2016.
- BABIČ, M. N.; GUNDE-CINERMAN, N.; VARGHA, M.; TISCHNER, Z.; MAGYAR, D.; VERÍSSIMO, C.; SABINO, R.; VIEGAS, C.; MEYER, W.; BRANDÃO, J. Fungal Contaminants in Drinking Water Regulation? A Tale of Ecology, Exposure, Purificação and Clinical Relevance. **Int J Environ Res Public Health.** 14(6) (2017): 636.
- BAILEY, E. S.; FIELDHOUSE, J. K.; CHOI, J. Y.; GRAY, G. C. A Mini Review of the Zoonotic Threat Potential of influenza viruses, Coronaviruses, Adenoviruses, and enteroviruses. **Frontiers in Public Health**, v.6, n. 104, p1-7, 2018.
- BARMAN, A.; GOHAIN, D.; BORA, U.; TAMULI, R. Phospholipases play multiple cellular roles including growth, stress tolerance, sexual development, and virulence in fungi. **Microbiological Research**, v, 209, p. 55–69, 2018.
- BOWEN, W. H.; BURNE, R. A.; WU, H.; KOO, H. Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments. **Trends in Microbiology**, v.26, n.3, p.229-242, 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Controle de vifilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília, DF: Ministério da Saúde. Diário Oficial da União, Portaria n. 2.914, 12 de dezembro, 2011.

- 1 BRILHANTE, R. S.N.; OLIVEIRA, J. S.; EVANGELISTA, A. J. J.; SERPA, R.; SILVA, A. L.;
2 AGUIAR, F. R. M.; PEREIRA, V. S.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; PEREIRA-NETO, W.
3 A.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Candida tropicalis* from veterinary
4 and human sources shows similar in vitro hemolytic activity, antifungal biofilm susceptibility and
5 pathogenesis against *Caenorhabditis elegans*. **Veterinary Microbiology**. v.192, p.213–219,
6 2016.
- 7 CONRAD, P.A.; MAZET, J. A.; CLIFFORD, D.; SCOTT, C.; WILKES, M. Evolution of a
8 transdisciplinary “One Medicine–One Health” approach to global health education at the
9 University of California, Davis. **Preventive Veterinary Medicine**, v.92, p.268–274, 2009.
- 10 CORDEIRO, R. A.; SALES, J. A.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; BRILHANTE, R. S. N.;
11 PONTE, Y. B.; ARAÚJO G. S.; MENDES, P. B. L.; PEREIRA, V. S.; ALENCAR, L P.;
12 PINHEIRO, A. Q. SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Candida parapsilosis* complex in
13 veterinary practice: A historical overview, biology, virulence attributes and antifungal
14 susceptibility traits. **Veterinary Microbiology**, v.212, p.22-30, 2017.
- 15 DADAR, M.; TIWARI, R.; KARTHIK, K.; CHAKRABORTY, S.; SHAHALI, Y.; DHAMA, K.
16 *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis
17 and control – An update. **Microbial Pathogenesis**, v.117, p.128–138, 2018.
- 18 ESSACK, S. Y. Environment: the neglected component of the One Health triad. **The Lancet**
19 **Planetary Health**, v.2, n. 6, p.238-239, 2018.
- 20 ESTIVILL, D.; ARIAS, A.; TORRES-LANA, A.; CARRILLO-MUÑOZ, A.J.; ARÉVALO, M.P.
21 Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials. **J. Microbiol. Methods**.
22 v. 86, n.2, p.238-242, 2011.
- 23 EVANS, B. R.; LEIGHTON, F. A. A history of One Health. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.**, v. 33,
24 n.2, p.413-420, 2014.
- 25 FATAHINIA, M.; HALVAEEZADEH, M.; REZAEI-MATHKOLAEI, A. Comparison of
26 enzymatic activities in diferente *Candida* species isolated from women with vulvovaginitis.
27 **Jounal de Mycologie Médicale**. v.28, p.188-194, 2017.
- 28 FOX, M.A.; NACHMAN, K.E.; ANDERSON, B.; LAM, J.; RESNICK, B. Meeting the public
29 health challenge of protecting private wells: Proceedings and recommendations from an expert
30 panel workshop. **Sci. Total. Environ**. v. 554-555, n. 1, p. 113-118, 2016.
- 31 FRANÇA, E. J. G.; FURLANETO-MAIA, L.; FURLANETO, M. C. Hemolytic capability and
32 expression of a putative haem oxygenase- encoding gene by blood isolates of *Candida tropicalis*
33 are influenced by iron deprivation and the presence of hemoglobin and erythrocytes. **Microbial**
34 **Pathogenesis**, v.105, p. 235-239, 2017.
- 35 GEORGE, A. Antimicrobial resistance, trade, food safety and security. **One Health**, v. 5,
36 p.6–8, 2018.
- 37 GOGOI, A.; MAZUMDER, P.; TYAGI, V. K.; TUSHARA CHAMINDA, G. G.; AN, A. K.;
38 KUMAR, M. Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: A review.
39 **Groundwater for Sustainable Development**, v.6, p.169–180, 2018.

- 1 GOMES, I.B.; SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C. An overview on the reactors to study drinking water
2 biofilms. **Water research**, v. 62, p. 63-87, 2014.
- 3 GOMES, I.B.; SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C. The effects of sodium hypochlorite against selected
4 drinking water-isolated bacteria in planktonic and sessile states. **Science of the Total**
5 **Environment**, v. 565, p. 40-46, 2016.
- 6 HAGESKAL, G.; LIMA, N.; SKAAR, I. The study of fungi in drinking water. **Mycological**
7 **Research**, v. 113, n. 2, p. 165-172, 2009
- 8 HYNDS, P.; MISSTEAR, B.D.; GILL, L.W.; MURPHY, H.M. Groundwater source
9 contamination mechanisms: Physicochemical profile clustering, risk factor analysis and
10 multivariate modelling. **J. Contam. Hydrol.** v.156, p.47-56, 2014.
- 11 ISHIDA, K.; UEDA-YAMAGUCHI, M.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.;
12 YAMADA-OGATTA, S. F.; NAKAMURA, C. V.; Performance of methods for identification of
13 yeast isolated from blotted water: High prevalence of *Candida parapsilosis*. **Semina: Ciências**
14 **Biológicas e da Saúde**, v. 34, n. 2, p. 205-214, 2013.
- 15 KUMAR, C. P. G.; MENON, T.; SUNDARARAJAN, T.; NALINI, S.; THURUARAYAN, M.
16 A. Esterase activity of *Candida* species isolated from immunocompromised hosts. **Rev Iberoam**
17 **Micol**, v.23, p.101-103, 2006;
- 18 LIU, R.; ZHU, J.; YU, Z.; JOSHI, D.; ZHANG, H.; LIN, W.; YANG, M. Molecular analysis of
19 long-term biofilm formation on PVC and castiron surfaces in drinking water distribution system.
20 **Journal of Environmental Sciences**, v.26, p. 865-874, 2014.
- 21 LUO, G.; SAMARANAYAKE, L.P.; YAU, J. Y. Y. *Candida* species exhibit diferencial *in vitro*
22 hemolytic activities. **J Clin Microbiol.** v.39, p.2971-2974, 2001.
- 23 MARAN, N.H.; CRISPIM, B.A.; IAHHN, S.R.; ARAÚJO, R.P.; GRISOLIA, A.B.; OLIVEIRA,
24 K.M.P. Depth and Well Type Related to Groundwater Microbiological Contamination. **Int. J.**
25 **Environ. Res. Public Health**, v.13, n.10, p.1036, 2016.
- 26 MARDONES, F. O.; HERNANDEZ-JOVER, M.; BEREZOWSKI, J. A.; LINDBERG, A.;
27 MAZET, J. A. K.; MORRIS, R. S. Veterinary epidemiology: Forging a path toward one health.
28 **Preventive Veterinary Medicine.** v.137, p.147–150, 2017.
- 29 MARTINS, M.; HENRIQUES, M.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; OLIVEIRA, R. Addition of DNase
30 Improves the In Vitro Activity of Antifungal Drugs against *Candida albicans* Biofilms. **Mycoses.**
31 v.55, n.1, p.80–85, 2012.
- 32 MATTOS, K.; RODRIGUES, L. C.; OLIVEIRA, K. M. P.; DINIZ, P. F.; MARQUES, L. I.;
33 ARAUJO, A. A.; CHANG, M. R. Variability in the clinical distributions of *Candida* species and
34 the emergence of azole-resistant non-*Candida albicans* species in public hospitals in the Midwest
35 region of Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.**v.50, n.6, p.843-847, 2017.
- 36 MENDELSON, M.; BRINK, A.; GOWS, J.; MBELLE, N.; NAIDOO, V.; POPLE, T.;
37 SCHELLACK, N; VUUREN, M. V.; REES, H. The One Health stewardship of colistin as na
38 antibiotic of last resort for human health in South Africa. **Lancet Infect Dis**, 2018.

- 1 MENEZES, R. P.; RICETO, É. B. M.; BORGES, A. S.; RODER, D. V. D. B.; PEDROSO, R. S.
2 Evaluation of virulence factors of *Candida albicans* isolated from HIV-positive individuals using
3 HAART. **Archives of Oral Biology**, v.66, p.061-65, 2016.
- 4 MOTHIBE, J. V.; PATEL, M. Pathogenic characteristics of *Candida albicans* isolated from oral
5 cavities of denture wearers and cancer patients wearing oral prostheses. **Microbial Pathogenesis**,
6 v. 110, p.128e134, 2017.
- 7 MUADCHEINGK, T.; TANTIVITAYAKUL, P.; Distribution of *Candida vb albicans* and non-
8 albicans *Candida* species in oral candidiasis patients: Correlation between cell surface
9 Hidrofóbcity and biofilm forming activities - **Archiv of oral biol**, v. 60, p. 894 – 901, 2015.
- 10 MYUNG, K. Can agricultural fungicides accelerate the discovery of human antifungal drugs?
11 **Drug Discov. Today**. v.20, n.1, p. 710, 2015.
- 12 NEGRI, M.; MARTINS, M.; HENRIQUES, M.; SVIDZINSKI, T. I. E.; AZEREDO, J.;
13 OLIVEIRA, R. Examination of Potential Virulence Factors of *Candida tropicalis* Clinical
14 Isolates From Hospitalized Patients. **Mycopathologia**, v. 169, p.175–182, 2010.
- 15 NEGRI, M.; SILVA, S.; CAPOCI, I. R. G.; AZEREDO, J.; HENRIQUES, M. *Candida tropicalis*
16 Biofilms: Biomass, Metabolic Activity and Secreted Aspartyl Proteinase Production.
17 **Mycopathologia**, v. 181, n. 3-4, p.217-24, 2015.
- 18 PAKSHIR, K.; ZOMORODIAN, K.; KARAMITALAB, M.; JAFARI, M.; TARAZ, H.;
19 EBRAHIMI, H. Phospholipase, esterase and hemolytic activities of *Candida* spp. isolated from
20 onychomycosis and oral lichen planus lesions. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 23, p. 113—
21 118, 2013.
- 22 PEREIRA, V.J.; BASÍLIO, M.C.; FERNANDES, D.; DOMINGUES, M.; PAIVA, J.M.;
23 BENOLIEL, M.J.; CRESPO, M.T.; ROMÃO, M.V. San. Occurrence of filamentous fungi and
24 yeasts in three diferente drinking water sources. **Water Research**, v. 48, p. 3813-3819, 2009.
- 25 PEREIRA, A.; SANTOS, A.; TACÃO, M.; ALVES, A.; HENRIQUES, I.; CORREIA, A. Genetic
26 diversity and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from Tagus estuary (Portugal). **Science**
27 **of the Total Environment**, v.461, p.65–71, 2013.
- 28 PEREIRA, C. A.; DOMINGUES, N.; ARAÚJO, M. I. D. S. A.; JUNQUEIRA, J. C.; BACK-
29 BRITO, G. N.; JORGE, A. O. C. Production of virulence factors in *Candida* strains isolated from
30 patients with denture stomatitis and control individuals. **Diagnostic Microbiology and**
31 **Infectious Disease**, v.85, p.66–72, 2016.
- 32 PRICE, M. F., WILKINSON, I. D., & GENTRY, L. O. Plate method for detection of
33 phospholipase activity in *Candida albicans*, **Sabouraudia**. v. 20, n.1, p.7–14, 1982.
- 34 QUEENAN, K.; HÄSLER, B.; RUSHTON, J. One Health approach to antimicrobial resistance
35 surveillance: is there a business case for it? **International Journal of Antimicrobial Agents**.
36 v.48, p.422–427, 2016.
- 37 QUEIROZ, P.A.; GODOY, J. S. R.; MENDONÇA, P. S. B.; PEDROSO, R. B.; SVIDZINSKI,
38 T. I. E.; NEGRI, M. Adhesion and biofilm formation in artificial saliva and susceptibility os yeasts

- 1 isolated from chronic kidney patients undergoing haemodialysis. **Journal of Medical**
2 **Microbiology**, v. 64, p.960-966, 2015.
- 3 RAUT, J.; RATHOD, V.; KARUPPAYIL, S.M. Cell surface Hidrofobicoity and adhesion: a
4 study on fifty clinical isolates of *Candida albicans* Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi, v.51, n.3,
5 p. 131-136, 2010.
- 6 RICETO, É. B. M.; MENEZES, R. P.; PENATTI, M. P. A.; PEDROSO, R. S. Enzymatic and
7 hemolytic activity in different *Candida* species. **Rev Iberoam Micol**, v. 32, n. 2, p. 79–82, 2015.
- 8 RISEBRO, H.L.; BRETON, L.; AIRD, H.; HOOPER, A.; HUNTER, P.R. Contaminated Small
9 Drinking Water Supplies and Risk of Infectious Intestinal Disease: A Prospective Cohort Study.
10 **Plos One**. v.7, n. 8, p. 1-12, 2012.
- 11 ROCHA, M. P.; DOURADO, P. L. R.; RODRIGUES, M. S.; RAPOSO JR, J. L.; GRISOLIA, A.
12 B.; OLIVEIRA, K. M. P. The influence of industrial and agricultural waste on water quality in
13 the Água Boa stream (Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil). **Environ Monit Assess**, v. 187, p.
14 442, 2015.
- 15 ROSTAL, M. K.; ROSS, N.; MACHALABA, C.; CORDEL, C.; PAWESKA, J. T.; KARESH,
16 W. B. Benefits of a one health approach: An example using Rift Valley fever. **One Health**. v.5,
17 p 34-36, 2018.
- 18 SAMARANAYAKE, Y. H.; DASSANAYAKE, R.S.; JAYATILAKE, J.A.; CHEUNG, B. P.;
19 YAU, J. Y. Y.; YEUNG, K.W. S.; SAMARANAYAKE, L.P. Phospholipase B enzyme
20 expression is not associated with other virulence attributes in *Candida albicans* isolates from
21 patients with human immunodeficiency virus infection. **J. Med Microbiol**, v 54, p 583-93, 2005.
- 22 SÁNCHEZ, M. COLOM, F. Extracellular DNase activity of *Cryptococcus neoformans* and
23 *Cryptococcus gattii*. **Rev Iberoam Micol**. v.27, n.1, p.10–13, 2010.
- 24 SASAKI, M. H. Caracterização de leveduras isoladas de água subterrânea para consumo humano.
25 Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade
26 Federal da Grande Dourados (UFGD), 2017.
- 27 SAVASTANO, C.; SILVA, E.O.; GONÇALVES, L. L.; NERY, J. M.; SILVA, N. C.; DIAS, A.
28 L. T. *Candida glabrata* among *Candida* spp. from environmental health practitioners of a
29 Brazilian Hospital. **Brazilian journal of microbiology**, v. 47, n. 2, p.367–372, 2016.
- 30 SILVA, S.; HENRIQUES, M.; MARTINS, A.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.; AZEREDO, J.
31 Biofilms of non- *Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix
32 composition. **Medical Mycology**, v.47, p.681-689, 2009.
- 33 SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.; AZEREDO, J.
34 Silicone colonization by non-*Candida albicans* *Candida* species in the presence of urine. **J Med**
35 **Microbiol** v.59, p.747-54, 2010.
- 36 SILVA, S; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.W.; AZEREDO, J.
37 Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. **Trends Microbiol**,
38 v. 19, n.5, 2011.

- 1 SILVA, S.; NEGRI, M; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.W.; AZEREDO, J.
 2 *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* *Candida tropicalis*: biology,
 3 epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**. v.36,
 4 p.288–30, 2012.
- 5 SLIFKIN, M. Tween 80 Opacity Test Responses of Various *Candida* Species. **Journal of**
 6 **Clinical Microbiology**, v38, n.12, p.4626-4628, 2000
- 7 STÄRK, K. D. C.; KURIBREÑA, M. A.; DAUPHIN, G.; VOKATY, S.; WARD, M. P.;
 8 WIELAND, B.; LINDBERG, A. One Health surveillance – More than a buzz word? **Preventive**
 9 **Veterinary Medicine**. v.120, p.124–130, 2015.
- 10 STORTI, L. R.; PASQUALE, G.; SCOMPARIM, R.; GALASTRI, A. L.; ALTERTHUM, F.;
 11 GAMBALE, W.; PAULA, C. R. *Candida* spp. Isolated from inpatients, the environment, and
 12 health practitioners in the Pediatric Unit at the University Hospital of the Jundiaí Medical
 13 College, State of São Paulo, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**. v.45, n.2, p. 225-231, 2012.
- 14 TOMIČIĆ, R.; TOMIČIĆ, Z.; RASPOR, P. Adhesion of *Candida* spp. and *Pichia* spp. to
 15 Wooden Surface. **Food Technology & Biotechnology**, v. 55, n. 1, p. 138-142, 2017.
- 16 TREVIÑO- RANGEL, R. J.; RODRÍGUEZ-SANCHEZ, I.P.; ROSAS- TARACO, A. G.;
 17 HÉRNANDEZ- BELLO, R.; GONZÁLEZ, J. G.; GONZÁLEZ, G.M. Biofilm formation and
 18 genetic variability of BCR1 gene in the *Candida parapsilosis* complex- **Revista Iberoamericana**
 19 **de Micología**, v.32, n.3, p.180-184, 2015.
- 20 TREVIÑO-RANGEL, R. J.; PEÑA-LOPEZ, C. D.; HERNÁNDEZ-RODRIGUES, P.A.;
 21 BELTRÁN-SANTIAGO, D.; GONZÁLEZ, G. M. Association between *Candida* biofilm-
 22 forming bloodstream isolates and the clinical evolution in patients with candidemia: An
 23 observational nine-year single center study in Mexico. **Rev Iberoam Micol**, v. 35, n. 1, p. 11–16,
 24 2018.
- 25 WHO - World Health Organization. Guidelines for Drinking-water Quality. 4th ed. Geneva, 2011.
- 26 WHO - World Health Organization. Water Quality and Health Strategy: 2013 -2020. Geneva,
 27 2013.
- 28 WHO- World Health Organization. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. Geneva,
 29 2015.
- 30 WIEBUSCH, L.; ALMEIDA-APOLONIO, A. A.; RODRIGUES, L. M. C.; BICUDO, B. P.;
 31 SILVA, D. B. S.; LONCHIATI, D. F.; ARAÚJO, R. P.; GRISOLIA, A. B.; OLIVEIRA, K. M. P.
 32 *Candida albicans* isolated from urine: Phenotypic and molecular identification, virulence factors
 33 and antifungal susceptibility. **Asian Pac J Trop Biomed**, v. 7, n.7, p. 624–628, 2017.
- 34 WINGENDER, J.; FLEMMING, H.C. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for
 35 pathogens. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 214, p. 417-423,
 36 2011.
- 37 ZUPANČIČ, J.; BABIČ, M. N.; GUNDE-CIMERMAN, N. High Incidence of an Emerging
 38 Opportunistic Pathogen *Candida parapsilosis* in Water-Related Domestic Environments. **Fungal**
 39 **Infection** (2018) 1-13

1 **CAPÍTULO 2**

2 1. MANUSCRITO: Revista *International Journal of Environmental Research and Public*
3 *Health* (A2 / 2.145)

4 Normas da revista (<https://www.mdpi.com/journal/ijerph/instructions>).

5 ***Candida* não-*C. albicans* provenientes de amostras ambientais produzem** 6 **enzimas hidrolíticas e biofilmes iguais aos isolados de amostras clínicas**

7 **CUPOZAK-PINHEIRO, W. J¹; XXX²; OLIVEIRA, K. M. P³**

8 ¹ Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados

9 ² Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados.

10 ³Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, e-mail:
11 kellyoliveira@ufgd.edu.br.

13 **Resumo/ abstract**

14 O meio ambiente é afetado pela interferência humana através do descarte inadequado de agentes
15 antimicrobianos e materiais hospitalares que propiciam a seleção de microrganismos patogênicos.
16 Leveduras do gênero *Candida* fazem parte da microbiota normal humana e causam infecções
17 dermatogênicas e oportunistas em humanos. *Candida* não-*C. albicans* (CNCA) são encontradas em
18 amostras clínicas, no entanto estão emergindo para meio ambiente, presentes em água subterrânea.
19 No presente estudo, avaliamos *in vitro* os fatores de virulência e a formação de biofilmes de CNCA
20 isoladas de amostras ambientais e clínicas. Os isolados de CNCA são hidrofóbicas e as de amostras
21 clínicas apresentaram maior capacidade de adesão. A produção de enzimas hidrolíticas para os
22 isolados foi semelhante. CNCA foram capazes de formar biofilmes na presença de água subterrânea
23 e de hipoclorito de cálcio. Nossos resultados mostram que CNCA de amostras ambientais podem
24 produzir fatores de virulência iguais aos de amostras clínicas. Alertamos a presença de CNCA em
25 água subterrânea e em relação ao consumo desta água pelo do ser humano pois, são patógenos
26 oportunistas com capacidade de sobreviver em quantidade reduzida de nutrientes. Assim, medidas de
27 prevenção de CNCA são necessárias e sugerimos uma abordagem que envolva o conceito *One Health*,
28 este que visa a integração de saúde humana, veterinário e ambiental para o controle e prevenção de
29 enfermidades.

31 **Palavras-chave:** *Candida*, *One health*, água potável, fatores de virulência.

32 **Keywords:** *Candida*, *One Health*, Drinking water, Virulence factors.

34 **1. Introdução**

35 O uso do conceito *One Health* visa à integração entre saúde humana, veterinária e do meio
36 ambiente através de medidas de prevenção e controle de enfermidades [1,2]. Este conceito começou
37 a ser utilizado na saúde humana e veterinária, decorrente do uso em larga escala de medicamentos
38 para fins terapêuticos ou promotores de crescimento, na seleção de microrganismos resistentes pela
39 utilização de antimicrobianos veterinários, além do uso de antibióticos de maneira errônea pelo
40 próprio ser humano como também seus impactos no meio ambiente [2-4].

41 As atividades antrópicas afetam o meio ambiente, este que é via de armazenamento de
42 microrganismos, drogas antimicrobianas de uso veterinário e humano, fungicidas agrícolas e

1 materiais hospitalares [4-6]. O contato destes resíduos contaminantes contribui para a seleção de
2 microrganismos resistentes e a presença elevada destes microrganismos nos recursos naturais como
3 a água afetam o ser humano [7-9]. A presença de *Candida* spp. em amostras clínicas e em amostras
4 ambientais vêm sendo relatada na comunidade científica, estas que fazem parte da microbiota normal
5 humana e causam infecções dermatocutâneas e oportunistas sistêmicas em imunocomprometidos [10-
6 12].

7 *C. albicans* é a principal espécie, a mais estudada e relacionada com infecções oportunistas.
8 No entanto, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* fazem parte do grupo de espécies *Candida*
9 não-*C. albicans* (CNCA) têm se mostrado importantes agentes patogênicos emergentes [12,13].
10 Fatores de virulência como hidrofobicidade da superfície celular, adesão, formação de biofilmes e a
11 produção de enzimas hidrolíticas auxiliam no processo infeccioso de *Candida* spp. no indivíduo, como
12 na invasão nas células do hospedeiro, na tolerância as drogas antifúngicas e no meio ambiente afetam
13 a integridade dos recursos naturais [13-16]. No ambiente hospitalar, CNCA são associadas com casos
14 graves de infecções e adesão a dispositivos médicos [13, 17,18].

15 CNCA estão presentes no meio ambiente, sendo isoladas a partir de amostras de água
16 subterrânea, água mineral, efluentes domésticos e industriais, rios e lagos, evidenciando a ubiquidade
17 deste gênero em se adaptar a diversos locais [6,7,15,19-22]. CNCA tem sido isolada em água
18 subterrânea em países como Eslovênia, Portugal e Brasil [19,20,23]. No Brasil, *C parapsilosis* é mais
19 isolada em água subterrânea [23] e *C. glabrata*, *C tropicalis* e *C. parapsilosis* são encontradas com
20 frequência em ambientes hospitalares e são as espécies que mais causam candidemia em pacientes
21 [17,18, 24,25].

22 Contudo, pouco se sabe a respeito do perfil de virulência de CNCA que estão presentes em
23 no meio ambiente, como em água subterrânea, esta que através do consumo pode ser um veículo de
24 transmissão destes patógenos para o ser humano, sendo necessário realizar estudos para avaliar a
25 patogenicidade de *Candida* spp, e também auxiliar na busca por soluções por meio da abordagem do
26 conceito *One Health*. [2,9,8] Portanto, neste contexto *One Health* buscamos avaliar os fatores de
27 virulência de espécimes de CNCA provenientes de amostras ambientais e clínicas.

28

29 **2. Material e Métodos**

30 **2.1 Microrganismos**

31 Os isolados fazem parte da micoteca do Laboratório de Microbiologia Aplicada, da
32 Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, na Universidade Federal da Grande Dourados.
33 Foram utilizadas 33 leveduras CNCA (*C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, e *C. glabrata*), sendo 18
34 leveduras isoladas de amostras clínicas como hemocultura, urocultura e secreção traqueal [26] e 15

1 leveduras de amostras ambientais provenientes de água subterrânea destinada para o consumo
2 humano e que foi coletada a partir de poços privados [7,23]. Nos ensaios, foram utilizadas as cepas
3 de referências da *American Type Culture Collection* (ATCC) *C. tropicalis* ATCC 750, *C. parapsilosis*
4 ATCC 22019 e *C. glabrata* ATCC 2001. Os isolados foram reativados em Caldo Sabouraud Dextrose
5 (SDB; Acumedia) e semeados em CHROMagarCandida® (Difco, Faísca, MD, EUA) para confirmar
6 sua pureza. Todos os ensaios a seguir foram realizados em triplicatas.

7

8 **2.2 Enzimas hidrolíticas**

9 **2.2.1 Preparo do Inóculo**

10 Os isolados foram reativados e transferidos para placa com SDA e incubados por 24 h antes
11 da realização dos testes. A suspensão de leveduras para os testes enzimáticos foram ajustados a uma
12 turbidez de acordo com a OD₅₃₀: 0,12- 0,15 (1- 5x10⁶ UFC/mL escala 0,5 McFarland).

13

14 **2.2.2 Produção de Fosfolipase**

15 Foi semeado 5 µL da suspensão de leveduras em ágar gema de ovo e incubadas a 37 °C por
16 6-7 dias conforme descrito por Samaranyake et al., [29]. Os resultados foram expressos pela razão
17 entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação (em mm). O halo (PZ
18 value) de 1,0 indica não atividade enzimática, 0,63 <PZ<1,0 indica atividade enzimática moderada,
19 e PZ≤0,63 indica forte atividade enzimática [30]. Como controle positivo do teste foi utilizado a cepa
20 padrão *C. albicans* ATCC 90028.

21

22 **2.2.3 Atividade Hemolítica**

23 Para a avaliação da produção de hemolisinas o ensaio foi realizado de acordo com Luo et
24 al., [31]. Foi inoculado 5 µL da suspensão de leveduras em SDA enriquecido com 7% de sangue
25 desfibrinado e 4% de glucose. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h e os resultados foram
26 expressos de acordo com PZ value [30]. Como controle positivo do teste foi utilizado as cepas padrões
27 *C. tropicalis* ATCC 750, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. glabrata* ATCC 2001.

28

29 **2.2.4 Atividade de Esterase**

30 A produção de esterase dos isolados foi realizada usando o meio de teste de opacidade em
31 Tween 80 (Dinâmica, Brasil) conforme Slifkin, [32]. Foram adicionados 5 µL da suspensão de
32 leveduras em ágar contendo Tween 80 e incubadas durante 10 dias a 30 °C. A presença de um halo
33 opaco em torno das colônias indica a produção da enzima, o qual foi avaliado de acordo com PZ

1 value [30]. Como controle positivo do teste foi utilizado as cepas padrões *C. tropicalis* ATCC 750,
2 *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. glabrata* ATCC 2001.

4 **2.2.5 Atividade de DNase**

5 A produção de DNase extracelular foi determinada de acordo com Sánchez; Colom, [33] com
6 algumas modificações. Em placas contendo DNAse Test Agar (NewProv, Brasil) suplementado com
7 1% de verde de metila, 5 µL da suspensão de leveduras foram inoculados, incubados a 30°C durante
8 7 dias. A formação de zonas claras (halo) em torno das colônias foi avaliada e classificada de acordo
9 com Price et al, [30]. Como controle positivo do teste foi utilizado a cepa padrão *Staphylococcus*
10 *aureus* ATCC 25923

12 **2.3 Hidrofobicidade da Superfície Celular (CSH)**

13 CSH foi determinada pela a adesão microbiana aos hidrocarbonetos de acordo com Raut et
14 al., [27] com algumas modificações. Os isolados foram cultivados em Caldo Extrato de Leveduras-
15 Peptona-Dextrose (YPD), centrifugados a 5000 g por 5 min, lavados por 3 vezes com solução salina
16 tamponada com fosfato (PBS, pH 7, 0.1 M) e ajustado a suspensão em uma densidade ótica (OD) de
17 0.5 (1-2 x 10⁵ UFC/mL) a 630 nm em espectrofotômetro. 100 µL da suspensão foram distribuídos em
18 uma microplaca de poliestireno com 96 poços (Kasvi) e a OD₆₃₀ inicial determinada em um leitor de
19 microplacas (Celer Biotecnologia S/A- Polaris, Brasil). Em tubos, 150 µL de *n*- hexadecano (Merk,
20 Hohenbrunn, Germany) foram adicionados a 600 µL de inóculo, agitados por 3 min em vortex e
21 deixados em repouso durante 15 min para separação das fases. Por fim, 100 µL da fase aquosa foram
22 transferidos para outra microplaca e a OD₆₃₀ final determinada em leitor de microplaca. A
23 porcentagem de CSH foi calculada pela fórmula: %CSH= (1- OD final / OD inicial) x 100.

25 **2.4 Adesão a Superfície de Poliestireno**

26 O teste de adesão foi realizado em microplacas de poliestireno com 96 poços, de acordo com
27 Raut et al., [27] com algumas modificações. As leveduras foram reativadas e transferidas para placas
28 contendo Ágar Sabouraud Dextrose (SDA; Sigma-Aldrich), a 37 °C, 24 h antes do teste. A OD₆₃₀ 1
29 x 10⁷ UFC/mL da suspensão foi ajustada em espectrofotômetro em solução PBS. 100 µL da suspensão
30 foram transferidos para uma microplaca de 96 poços, incubada a 37 °C por 90 min sob agitação
31 contínua de 50 rpm. Após os poços foram lavados três vezes com PBS e então quantificados pelo
32 método de cristal violeta [28].

2.5 Biofilmes

2.5.1 Condições de Crescimento

Os isolados foram cultivados em SDB por 24 h a 37 °C sob agitação constante de 80 rpm. As células foram recolhidas por centrifugação a 5000 g, lavadas três vezes com PBS e a concentração da suspensão foi ajustada a uma $OD_{630} = 1.0$ (1×10^7 UFC/mL) [34].

2.5.2 Formação de biofilmes na presença de Água Subterrânea

A água subterrânea (AGS) utilizada no estudo foi coletada de um poço privado em que não houve processo de tratamento, posteriormente esterilizada por autoclave. O ensaio foi avaliado de acordo com Silva et al., [35] com algumas modificações. Em microplacas de 96 poços foram adicionados 100 µL de AGS e 100 µL da suspensão de leveduras, as microplacas foram incubadas a 37 °C por 48 h com meio de cultivo renovado em 24 h. Posteriormente, as células não aderidas foram retiradas por meio de lavagem com PBS por três vezes e realizado a quantificação dos biofilmes por cristal violeta [28]. Como controle positivo, os isolados foram incubados com SDB, e controle negativo foi utilizado somente AGS sem a presença de leveduras, sob as mesmas condições. A formação de biofilme foi expressa pela diferença de crescimento do isolado em relação ao controle positivo.

2.5.3 Avaliação do Hipoclorito de Cálcio 65% na formação de biofilmes

Foram utilizadas as concentrações de 0,5 e 2 mg/mL de hipoclorito de cálcio (65%) diluídas em AGS. 100 µL de cada concentração de hipoclorito de cálcio (65%) e 100 µL da suspensão de leveduras foram adicionados em microplacas de poliestireno com 96 poços, estas foram incubadas a 37 °C por 48 h a 80 rpm [35]. Após as células não aderidas foram retiradas por meio de lavagem com PBS por três vezes e realizado a quantificação dos biofilmes pelo método de cristal violeta [28]. Como controle positivo foi utilizado somente as leveduras sem hipoclorito e o controle negativo sem inóculo. A formação de biofilme foi expressa pela diferença de crescimento do isolado em relação ao controle positivo.

2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

MEV foi utilizada para observar a estrutura dos biofilmes de um isolado ambiental de *C. parapsilosis* (8) proveniente de água subterrânea e a cepa padrão *C. parapsilosis* ATCC 22019 após o cultivo em AGS e em SDB. A formação dos biofilmes foi realizada microplacas de poliestireno com 24 poços de acordo com o item 2.5.1 e 2.5.2. Para a análise de imagem, os biofilmes foram fixados em solução contendo glutaraldeído a 2,5% (Sigma-Aldrich) em cacodilato de sódio (0,1 M,

1 pH 7.4; Sigma-Aldrich) por 24 h a 4°C e cupons (1 x 1 cm) do fundo dos poços foram cortados com
 2 uma lâmina de bisturi. Os biofilmes foram desidratados com uma série de soluções de etanol (30%,
 3 50%, 70%, 80%, 85%, 90% 95% e 100%, 15 min cada) e levados para secagem hiper-crítica em CO₂.
 4 Os cupons foram metalizados com ouro e observados sob um microscópio eletrônico de varredura
 5 JSM-6380LV (Jeol, EUA).

7 2.7 Análise estatística

8 Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o PROC MIXED
 9 de acordo com o seguinte modelo:

$$10 Y_i = \mu + A_i + e_i$$

11 Com $e_{ijk} \approx N(0, \sigma_i^2)$; onde Y_{ijk} é o valor da variável dependente; μ é a média geral; A_i é o
 12 efeito fixo da ambiente; e_{ijk} é o erro residual; N representa distribuição gaussiana e σ_i^2 é a variância
 13 associada a cada tratamento. Os graus de liberdade foram corrigidos pelo método de Rogers (1997).

14 Para a determinação da concentração ideal de hipoclorito de cálcio (65%), foi realizado uma
 15 análise de regressão polinomial simples considerando apenas as concentrações de hipoclorito de
 16 cálcio, através do PROC REG. Com nível de significância de $p=0,05$ (versão 9.3, SAS Institute Cary,
 17 NC).

19 3. Resultados

20 3.1 Enzimas Hidrolíticas

21 Para a avaliação da produção de enzimas hidrolíticas (Figura 5), dos 33 isolados de CNCA
 22 avaliados: 33,33% (11) destes produziram fosfolipases, 100% (33) hemolisinas, 24,24% (8) DNase,
 23 e 48,48% (16) esterase. Todas classificadas com atividade muito forte ($PZ \leq 0,63$; Tabela S1).

24 De acordo com a figura 5, a produção de fosfolipases por isolados de amostras clínicas (0,462)
 25 apresentou diferença significativa ($p=0,048$) em comparação aos de água subterrânea (0,442). Já, as
 26 esterases produzidas pelos isolados de água subterrânea (0,438) foram diferentes estatisticamente
 27 ($p=0,002$) dos isolados de amostras clínicas (0,384). A produção de hemolisinas e DNases entre os
 28 isolados de amostras clínicas e de água subterrânea foram iguais estatisticamente ($p=0,595$ para
 29 hemolisinas e $p=0,787$ para DNases). *C. parapsilosis* de ambos os ambientes produziram DNases,
 30 *C. glabrata* não produziu fosfolipases e os isolados de água subterrânea desta espécie não
 31 apresentaram produção de esterases.

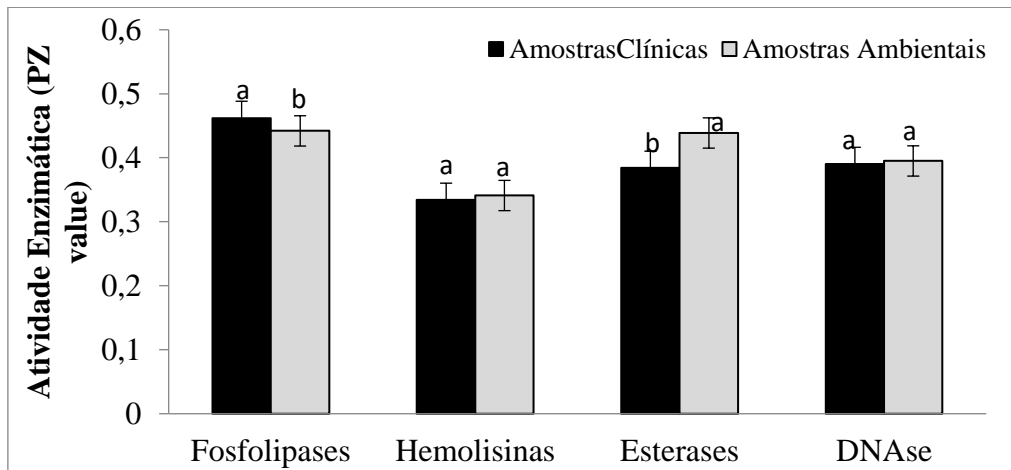


Figura 5. Produção de enzimas hidrolíticas: Fosfolipase ($p=0,048$), Esterase ($p=0,002$), Hemolisinas ($p=0,595$), DNase ($p=0,787$) e Adesão ao poliestireno ($p>0,0001$) de CNCA isoladas de água subterrânea e amostras clínicas.

Tabela 1. Produção de enzimas hidrolíticas (Fosfolipase, Esterase, Hemolisina e DNase), Hidrofobicidade da superfície celular (CSH), Adesão ao poliestireno, de CNCA isoladas de água subterrânea e amostras clínicas.

Item	Origem		EPM	Valor de P
	Amostras Clínicas	Amostras Ambientais		
Adesão ¹	0.407	0.161	0.01	<.0001
Hidrofobicidade ²	86.70	86.63	4.43	0.994
Fosfolipase ³	0.462	0.442	0.07	0.048
Hemolisina ³	0.334	0.341	0.06	0.595
Esterase ³	0.384	0.438	0.06	0.002
DNase ³	0.390	0.395	0.08	0.787

1: Abs/cm²; 2: % hidrofobicidade; 3: PZ value ; EPM: Erro Padrão da Média.

3.2 Hidrofobicidade da Superfície Celular e Adesão

Na avaliação da hidrofobicidade da superfície celular os isolados de ambos os ambientes foram classificados como hidrofóbicos, com uma porcentagem semelhante entre os de amostras clínicas (86,70%) e os de água subterrânea com (86,63%). No entanto, *C. tropicalis* de água subterrânea foi hidrofílica e de amostras clínicas, pelo menos um isolado de cada espécie de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* foram classificados como hidrofílicos (Tabela S1). A comparação entre os ambientes dos isolados não mostrou ser significativa ($p=0,994$).

Na adesão a microplacas de poliestireno, os isolados de amostras clínicas apresentaram maior capacidade de adesão (0,407 abs/ cm²) em comparação com os isolados de água subterrânea (0,161 abs/ cm²; $p<0,0001$). Quando comparado com a hidrofobicidade, os isolados que foram hidrofílicos apresentaram capacidade de adesão ao material em estudo.

3.3 Biofilmes

3.3.1 Formação de Biofilmes na presença de AGS

As CNCA foram capazes de formar biofilmes na presença de AGS quando comparado o crescimento com o meio de cultivo SDB (Figura 6; $p=0,001$). Após a quantificação, a formação de biofilmes para o isolado ambiental (08) de *C. parapsilosis* foi maior na presença de AGS (0,409 abs/cm^2) do que em SDB (0,290 abs/cm^2), o contrário aconteceu para *C. parapsilosis* ATCC 22019 esta que quando cultivada em SDB apresentou maior capacidade de formar biofilme na presença de SDB (1,735 abs/cm^2) do que em AGS (0,664 abs/cm^2). A MEV ilustra a formação de biofilmes para o isolado ambiental (08) de *C. parapsilosis* e ATCC 22019 na presença de AGS e em SDB (Figura 7). O cultivo em SDB mostrou-se melhor para formação de biofilmes para os isolados de amostras clínicas e de água subterrânea após 48 h. Não foi verificada interação significativa entre a formação de biofilmes dos isolados de ambos os ambientes (Figura 6; $p=0,674$).

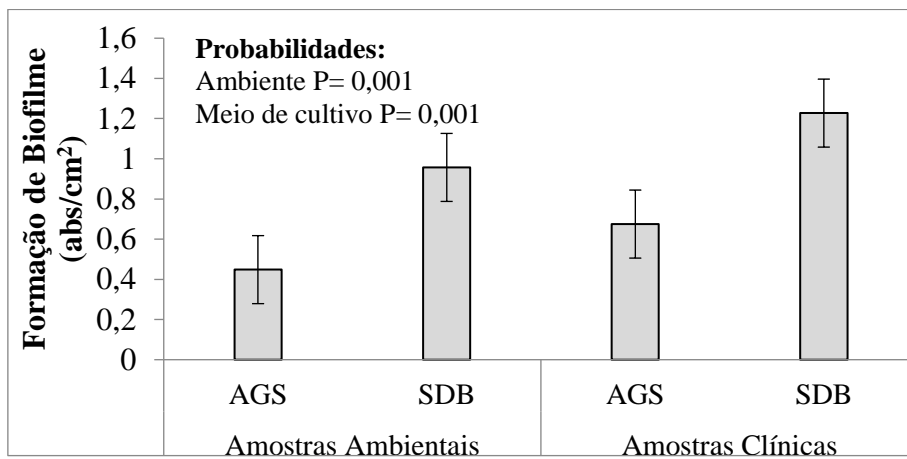
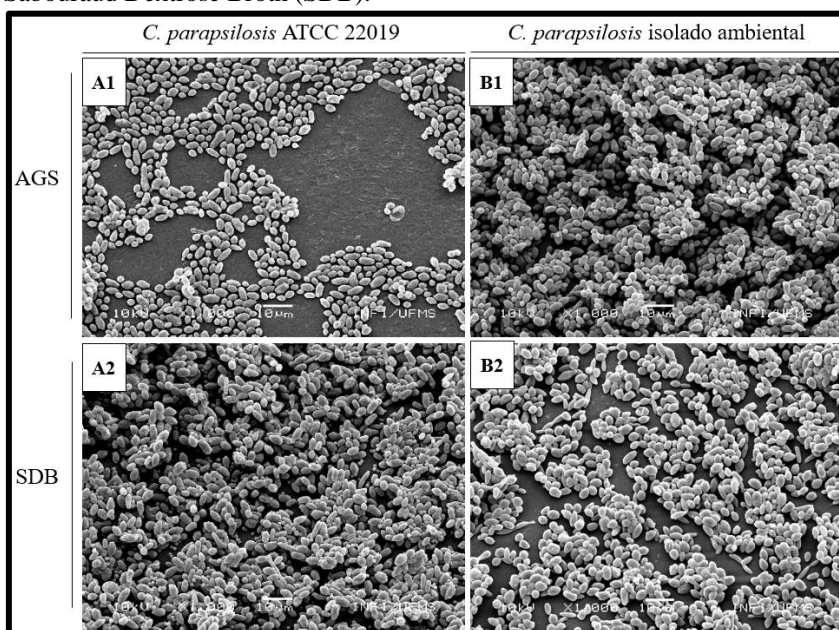


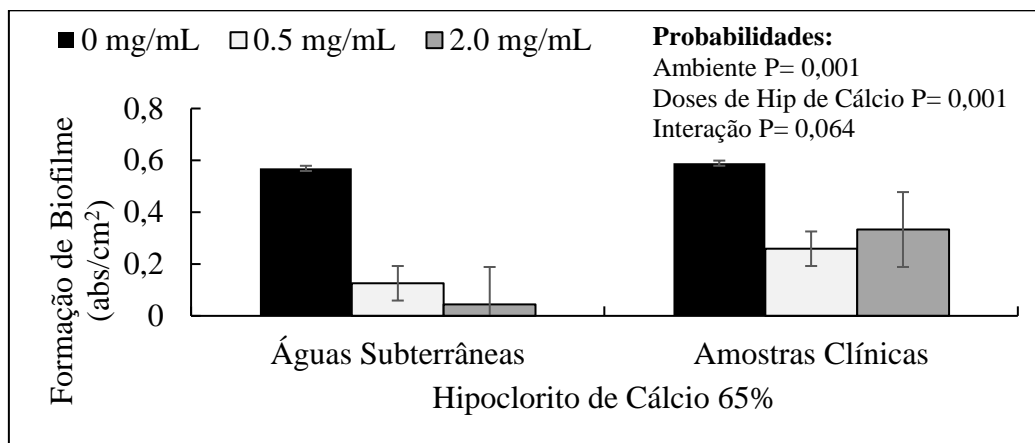
Figura 6. Formação de biofilmes (abs/cm^2) de CNCA na presença de água subterrânea e Sabouraud Dextrose Broth (SDB).



1 **Figura 7.** Microscopia eletrônica de varredura ilustra a formação de biofilmes
 2 de *C. parapsilosis* na presença de água subterrânea (AGS) e em Sabouraud
 3 Dextrose Broth (SDB). **A1 e B1** representa *C. parapsilosis* ATCC 22019 e
 4 isolado ambiental cultivados na presença de AGS. **A1 e B2** representa *C.*
 5 *parapsilosis* ATCC 22019 e isolado ambiental cultivados na presença de SDB.
 6

7 3.3.2 Interferência do Hipoclorito de Cálcio na formação biofilmes

8 Quando se avaliou a formação de biofilmes em AGS na presença de 0,5 e 2 mg/mL
 9 hipoclorito de cálcio a 65% em relação ao controle, observou-se que os isolados de ambos os
 10 ambientes apresentaram capacidade de formar biofilmes (Figura 8). Os isolados de amostras clínicas
 11 apresentaram maior média de biomassa na formação de biofilmes com a presença de hipoclorito de
 12 cálcio a 65% em relação aos de água subterrânea ($p=0,001$). Com a regressão polinomial simples foi
 13 estimado a concentração ideal para a inibição de biofilmes, sendo para os isolados de água subterrânea
 14 de 1,22 mg/mL e os de amostras clínicas de 1,16 mg/mL, mas observamos que os isolados foram
 15 capazes de formar biofilmes na concentração de 2 mg/mL.
 16



17 **Figura 8.** Capacidade de formação de biofilmes de CNCA obtidas de água subterrânea e
 18 amostras clínicas, na presença de 0,5 e 2 mg/mL de Hipoclorito de Cálcio a 65%.
 19
 20
 21

22 4. Discussão

23 O isolamento de microrganismos patogênicos em amostras ambientais e clínicas é
 24 relacionado pela facilidade de adaptação e resistência aos antimicrobianos, e controlar
 25 microrganismos resistentes é um dos objetivos prioritários que envolvem o conceito *One Health* [3,4].
 26 As leveduras do gênero *Candida* são encontradas em amostras clínicas, mas sua presença no meio
 27 ambiente como em água está sendo relatada com frequência, o que necessita de uma abordagem que
 28 envolva o conceito de *One Health* [7, 9, 19, 20, 36]. Estas fazem parte da microbiota humana e
 29 mundialmente, depois de *C. albicans*, causam infecções oportunistas no ser humano [10,11, 37]. No
 30 Brasil, em Mato Grosso do Sul *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* são isoladas em amostras
 31 clínicas e em água subterrânea [7,17,18]. Neste estudo, por apresentarem dose-dependência ou

1 resistência ao azol fluconazol (Tabela S1), o qual é utilizado como tratamento de infecções por
2 *Candida* spp., nós avaliamos os principais fatores de virulências para as *Candida* não-*C. albicans*
3 (CNCA) *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*, provenientes de água subterrânea (potável) e de
4 amostras clínicas.

5 A secreção de enzimas hidrolíticas (fosfolipase, hemolisinas, esterases e DNAses) são
6 considerados fatores importantes para a virulência de *Candida* spp. São produzidas por todas as
7 espécies, expressas decorrente da resposta ao estresse, variando a espécie e o local da infecção, como
8 por exemplo na degradação do tecido do hospedeiro que propicia a invasão fúngica [6, 13, 39]. No
9 estudo, os isolados provenientes de água subterrânea e de amostras clínicas foram capazes de
10 expressar enzimas hidrolíticas, com produção de pelo menos um tipo de enzima, exceto os isolados
11 de *C. glabrata* que não produziram fosfolipase e DNase foi produzida somente nos isolados de *C.*
12 *parapsilosis* (Tabela S1).

13 Fosfolipases hidrolisam os fosfolipídios presente na membrana celular do hospedeiro em
14 ácidos graxos solúveis e outros subprodutos, é considerada uma das primeiras e principais enzimas
15 hidrolíticas para *Candida* spp., [40,41]. As hemolisinas, consideradas um dos elementos chaves na
16 virulência, atuam na degradação da hemoglobina presente nos eritrócitos para a obtenção de ferro o
17 que facilita o desenvolvimento de suas pseudohifas [31, 39, 42]. Observamos que *C. tropicalis* e *C.*
18 *parapsilosis* provenientes de água subterrânea e de amostras clínicas são capazes de produzir
19 fosfolipases, no qual os isolados de amostras clínicas possuem maior média na produção desta enzima
20 e todos os isolados são capazes de produzir hemolisinas com média semelhante entre os ambientes,
21 os quais apresentam enzimas que estão relacionadas como fator inicial de virulência no indivíduo e
22 que facilitam o seu desenvolvimento.

23 Esterases fazem parte das enzimas lipofílicas, em que os ácidos graxos liberados se ligam
24 com as moléculas de cálcio na célula do hospedeiro. Para a virulência, sua presença está relacionada
25 com a produção de outras enzimas extracelulares como proteases, fosfolipases e hemolisinas [6,
26 40,43]. Neste estudo, a produção de esterases foi detectada nos isolados que produziram fosfolipases
27 e/ou hemolisinas, onde *C. tropicalis* de ambos os ambientes possuem capacidade de produzir
28 esterases e alguns isolados de *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. Já as DNAses são capazes de degradar o
29 DNA de outros microrganismos presentes na microbiota do indivíduo e inativar células do sistema
30 imune, aumentando a patogenia de CNCA em associação com outras enzimas extracelulares.
31 Primeiramente foi relatado sua produção para isolados ambientais de *Cryptococcus* spp.,
32 posteriormente surgiram estudos mostrando a capacidade de produção de DNAses por *Candida* spp.,
33 [13, 33, 42]. As CNCA de água subterrânea apresentaram capacidade de produzir hemolisinas e

1 DNases iguais aos isolados de amostras clínicas, e estas em sua maioria são hidrofóbicas ao
2 hidrocarboneto testado.

3 Para as leveduras aderirem e formarem biofilmes em uma superfície inerte ou biótica, a
4 hidrofobicidade da superfície celular (CSH) é uma propriedade intrínseca para CNCA se agregar e se
5 desenvolver e células hidrofóbicas podem ser mais virulentas do que células hidrofílicas [14, 27, 34].
6 Neste estudo, os isolados de CNCA provenientes de ambos os ambientes são hidrofóbicos ao *n*-
7 hexadecano, onde um isolado de cada espécie de *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* de água
8 subterrânea e amostras clínicas se mostraram hidrofílicos ao hidrocarboneto. A CSH pode variar entre
9 as espécies e nossos resultados corroboram com os descritos por Amani et al., [6] e Pereira et al.,
10 [14], que observaram padrões diferentes ao avaliarem frente a hidrocarbonetos a CSH de CNCA de
11 amostras ambientais e clínicas.

12 A presença de leveduras hidrofóbicas é um fator preocupante pois, aumenta a capacidade de
13 adesão a superfícies inertes como a rede de distribuição doméstica de água, em tecido vivo como em
14 células da mucosa oral no momento da ingestão da água pelo hospedeiro estas podem se alojar e
15 permanecem ali até o momento propício para patogenia. O que pode ocorrer também com os isolados
16 hidrofílicos que apresentam capacidade de adesão. No entanto, a literatura relata que a CSH e adesão
17 podem ou não estar relacionadas [14, 27, 35]. Neste estudo, concordamos com este fato pois, os
18 isolados hidrofílicos e hidrofóbicos apresentaram capacidade de adesão variada (Tabela S1), assim
19 independente da condição celular, as CNCA podem apresentar uma capacidade intrínseca para se
20 aderir.

21 A adesão é o primeiro processo para que ocorra a formação de biofilmes em superfícies.
22 Isolados de amostras clínicas são mais propensos a se aderirem e formar biofilmes em materiais
23 hospitalares e em tecido vivo, uma vez que se aderem como forma de resistir aos antimicrobianos
24 [10, 14, 16]. No ambiente, a adesão de CNAC tem sido causa de alerta já que, se aderem a superfícies
25 de materiais industriais e residenciais, formam biofilmes, se tornam uma fonte de contaminação
26 constante e pode ocasionar uma patogenia quando em contato com o hospedeiro [20,22,38]. As
27 CNAC utilizadas no presente estudo apresentaram capacidade de se aderir e os isolados de amostras
28 clínicas se aderem melhor ao poliestireno o que comprova com os achados na literatura. No entanto
29 os isolados de amostras ambientais também apresentaram capacidade de adesão, o que é preocupante
30 dado a capacidade de adaptação que CNCA em se aderir independente do local de isolamento,
31 elevando o risco de contato com o indivíduo.

32 Os biofilmes formados por CNAC estão relacionados como um crescente problema na
33 clínica e taxas de mortalidade. Estes auxiliam na sobrevivência das leveduras em superfícies, no
34 contato prolongado com o hospedeiro, no aumento da resistência ao sistema imune e as drogas

1 antifúngicas [10,12,13]. No meio ambiente, CNAC estão sendo encontradas com frequência em água
2 potável, se tornando um problema na rede de distribuição doméstica de água, em superfícies
3 industriais e resistindo aos métodos de desinfecção [7, 9, 15, 19].

4 Neste estudo, CNAC foram expostas em superfície abiótica somente com água ou SDB e
5 todos os isolados formaram biofilmes na presença de ambos os meios. Ao utilizar saliva artificial e
6 urina como meio condicionante, estudos relatam que estes podem auxiliar na adesão e formação de
7 biofilmes de *Candida* spp., [14, 44]. Recentemente, nosso grupo de pesquisa relatou a formação de
8 biofilmes de isolados de *Candida* spp., obtidos de amostras de água subterrânea [7, 23]. Agora,
9 mostramos a capacidade de adesão e formação de biofilmes em superfície abiótica na presença
10 somente de água subterrânea. Água não é um meio estritamente nutritivo quando comparada com o
11 meio de cultura (SDB) utilizado neste estudo, meio este comum para o cultivo de leveduras.
12 Evidenciando a ubiquidade de CNCA em sobreviver em um ambiente restrito, dado que os isolados
13 ambientais foram obtidos a partir de água subterrânea [7,23]. Como também outros estudos
14 demonstram o aumento no isolamento de *Candida* spp. em água e na rede de distribuição doméstica e
15 alertam para o seu isolamento [9, 19, 20,22, 36].

16 Uma das alternativas indicadas pela OMS para o tratamento de água é o uso de hipoclorito
17 de cálcio a 65%, por sua propriedade antibacteriana, com teor máximo permitido de 2 mg/L [45]. No
18 entanto, para leveduras, nosso grupo de pesquisa relatou que *Candida* spp., são capazes de tolerar
19 este agente químico [23]. Neste estudo, a média de formação de biofilmes por isolados de amostras
20 clínicas foi maior que de água subterrânea e de acordo com a análise de regressão polinomial a dose
21 ideal estimada para o controle de biofilmes de isolados de água subterrânea foi maior que de amostras
22 clínicas. No entanto na concentração de 2 mg/mL os isolados de CNCA foram capazes de formar
23 biofilmes, concentração máxima indicada pela OMS, o que desperta interesse na busca por
24 alternativas antimicrobianas eficaz contra leveduras. A presença de CNCA em água pode ocasionar
25 em alterações organolépticas da água, a degradação da tubulação e a resistência aos métodos de
26 desinfecção como também o constante contato com o ser humano e/ou animais [5,9,19,20].

27 O meio ambiente está sujeito a interferências decorrentes de atividades antrópicas como o
28 descarte de materiais hospitalares, resíduos agrícolas e antimicrobianos (antibióticos, antifúngicos e
29 fungicidas) ou atividades naturais. [3, 5, 6]. O campo da medicina veterinária, agrícola e médico, são
30 os que mais fazem o uso indiscriminado de antimicrobianos e o descarte de seus resíduos de forma
31 incorreta. Quando lixiviados, contaminam os recursos hídricos, como água subterrânea, o que
32 compromete não só o meio ambiente como também o ser humano e ocasiona na seleção de
33 microrganismos ali presentes [5,8 47]. A transmissão de CNCA de água subterrânea com capacidade
34 de virulência é preocupante principalmente para indivíduos imunocomprometidos mas também para

1 imunocompetentes, pois as CNCA podem se estabelecer na microbiota normal e ali permanecer até
 2 momento propício para patogenia, o que torna necessário envolver estratégias do conceito de *One*
 3 *Health* que englobem também o meio ambiente na tentativa de combater a virulência de CNCA.

4

5 **5. Conclusão**

6 Nossos resultados demonstram que CNCA de água subterrânea são capazes de secretar
 7 enzimas hidrolíticas, apresentar perfis variados de CSH, adesão ao poliestireno e formação de
 8 biofilmes tanto na presença de água subterrânea quando na presença de hipoclorito de cálcio a 65%
 9 iguais aos isolados de amostras clínicas. Vale ressaltar que, as CNCA utilizadas neste estudo
 10 apresentam resistência ou dose-dependência a um antifúngico comumente utilizado. Portanto, a
 11 aplicação de medidas que envolvam o conceito de *One Health* para o controle de CNCA é importante
 12 pois, a presença destas leveduras com capacidade de virulência no meio ambiente, pode contribuir
 13 para o aumento na resistência antimicrobiana, conseqüentemente na disseminação aos seres humanos
 14 e animais.

15

16 **6. Referências**

- 17 [1] B. R. Evans, F.A. Leighton, A history of One Health. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 33 (2) (2014) 413-420.
- 18 [2] S.Y. Essack, Environment: the neglected component of the One Health triad. The Lancet Planetary Health, 2 (6) (2018) 238-239.
- 19 [3] WHO- World Health Organization. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. Geneva, 2015.
- 20 [4] A. George, Antimicrobial resistance, trade, food safety and security. One Health, 5 (2018) 6–8.
- 21 [5] K. Myung, Can agricultural fungicides accelerate the discovery of human antifungal drugs? Drug Discov. Today. 20 (1) (2015) 710
- 22 [6] D. Amani, N. Emira, T. Ismail, E. Jamel, S. Dominique, D. C. Rosa, S. Mejdí, Extracellular enzymes and adhesive properties of
 23 medically importante *Candida* spp. strains from landfill leachate. Microbial Pathogenesis, 116 (2018) 328–334.
- 24 [7] N. H. Maran, B.A. Crispim, S. R. Iahnn, R.P. Araújo, A. B. Grisolia, K.M.P. Oliveira, Depth and Well Type Related to Groundwater
 25 Microbiological Contamination. Int. J. Environ. Res. Public Health, 13 (10) (2016) 1036.
- 26 [8] A. Gogoi, P. Mazumder, V.K. Tyagi, G.G. Tushara Chaminda, A.K. An, M. Kumar, Occurrence and fate of emerging contaminants
 27 in water environment: A review. Groundwater for Sustainable Development, 6 (2018) 169–180.
- 28 [9] M. N. Babič, N. Gunde-Cinerman, M. Vargha, Z. Tischner, D. Magyar, C. Veríssimo, R. Sabino, C. Viegas, W. Meyer, J. Brandão.
 29 Fungal Contaminants in Drinking Water Regulation? A Tale of Ecology, Exposure, Purificação and Clinical Relevance. Int J Environ
 30 Res Public Health. 14(6) (2017): 636.
- 31 [10] S. Silva, M. Negri, M. Henriques, R. Oliveira, D.W. Williams, J. Azeredo, Adherence and biofilm formation of non-*Candida*
 32 *albicans* *Candida* species. Trends Microbiol, 19 (5) (2011).
- 33 [11] R. S.N. Brilhante, J. S. Oliveira, A. J. J. Evangelista, R. Serpa, A. L. Silva, F. R. M. Aguiar, V. S. Pereira, D. S. C. M. Castelo-
 34 Branco, W. A. Pereira-Neto, R. A. Cordeiro, J. J. C. Sidrim, M. F. G. Rocha, *Candida tropicalis* from veterinary and human sources
 35 shows similar in vitro hemolytic activity, antifungal biofilm susceptibility and pathogenesis against *Caenorhabditis elegans*. Veterinary
 36 Microbiology. 192 (2016) 213–219.
- 37 [12] D. Araújo, M. Henriques, S. Silva, Portrait of *Candida* Species Biofilm Regulatory Network Genes. Trends in Microbiology, 25
 38 (1) (2017).
- 39 [13] R. J. Treviño-Rangel, C. D. Peña-Lopez, P.A. Hernández-Rodrigues, D. Beltrán-Santiago, G. M. González, Association between
 40 *Candida* biofilm-forming bloodstream isolates and the clinical evolution in patients with candidemia: An observational nine-year single
 41 center study in Mexico. Rev Iberoam Micol, 35 (1) (2018) 11–16.

- 1 [14] C. A. Pereira, N. Domingues, M. I. D. S. A. Araújo, J. C. Junqueira, G. N. Back-Brito, A. O. C. Jorge, Production of virulence
2 factors in *Candida* strains isolated from patients with denture stomatitis and control individuals. *Diagnostic Microbiology and Infectious*
3 *Disease*, 85 (2016) 66–72.
- 4 [15] J. Wingender, H.C. Flemming, Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *International Journal of*
5 *Hygiene and Environmental Health*, 214 (2011) 417-423.
- 6 [16] D. Estivill, A. Arias, A.Torres-Lana, A.J Carrillo-Muñoz, M.P. Arévalo. Biofilm formation by five species of *Candida* on three
7 clinical materials. *J. Microbiol. Methods*. 86(2) (2011) 238-242.
- 8 [17] A.A. Almeida, C.S.S Mesquita, T.I.E.Svidzinski, K.M.P. Oliveira, Antifungal susceptibility and distribution of *Candida* spp.
9 isolates from the University Hospital in the municipality of Dourados, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Tro.*
10 46 (3) (2013) 335-339.
- 11 [18] K. Mattos, L.C. Rodrigues, K.M.P. Oliveira, P.F. Diniz, L.I. Marques, A.A. Araujo, M.R.Chang, Variability in the clinical
12 distributions of *Candida* species and the emergence of azole-resistant non-*Candida albicans* species in public hospitals in the Midwest
13 region of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*.50 (6) (2017) 843-847.
- 14 [19] V.J. Pereira, M.C. Basílio, D. Fernandes, M. Domingues, J.M. Paiva, M.J. Benoliel, M.T. Crespo, M.V. Romão, San. Occurrence
15 of filamentous fungi and yeasts in three diferente drinking water sources. *Water Research*, 48 (2009) 3813-3819.
- 16 [20] M.N. Babič, P. Zalar, B. Ženkob, S. Džeroskib, N. Gunde-Cimerman, Yeast and yeast-like fungi in tap water and groundwater,
17 and their transmission to household appliances. *Fungal Ecology*, 20 (2016) 30-39.
- 18 [21] K. Ishida, M. Ueda-Yamaguchi, T. Ueda-Nakamura, B. P. Dias Filho, S. F. Yamada-Ogatta, C. V. Nakamura. Performance of
19 methods for identification of yeast isolated from blotted water: High prevalence of *Candida parapsilosis*. *Semina: Ciências Biológicas*
20 *e da Saúde*, v. 34, n. 2, p. 205-214, 2013.
- 21 [22] J. Zupančič, M. N. Babič, N. Gunde-Cimerman. High Incidence of an Emerging Opportunistic Pathogen *Candida parapsilosis* in
22 Water-Related Domestic Environments. *Fungal Infection* (2018) 1-13
- 23 [23] M. H. Sasaki. Caracterização de leveduras isoladas de água subterrânea para consumo humano. Dissertação (Mestrado em Ciências
24 da Saúde). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), 2017.
- 25 [24] C. Savastano; E.O. Silva, L. L.Gonçalves, J. M. Nery, N. C. Silva, A. L. T. Dias, . *Candida glabrata* among *Candida* spp. from
26 environmental health practitioners of a Brazilian Hospital. *Brazilian journal of microbiology*, v. 47, n. 2, p.367–372, 2016.
- 27 [25] STORTI, L. R. Storti, G. Pasquale, R. Scomparim, A. L. Galastri, F. Alterthum, W. Gambale, C. R. Paula. *Candida* spp. Isolated
28 from inpatients, the environment, and health practitioners in the Pediatric Unit at the University Hospital of the Jundiaí Medical
29 College, State of São Paulo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. v.45, n.2, p. 225-231, 2012.
- 30 [26] Rodrigues, L. M. C. Caracterização fenotípica e molecular de leveduras isoladas em um hospital do Mato Grosso do Sul.
31 Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD),
32 2015.
- 33 [27] J. Raut, V. Rathod, S.M. Karuppayil, Cell surface Hidrofobicity and adhesion: a study on fifty clinical isolates of *Candida albicans*
34 *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*, 51 (3) (2010) 131 136.
- 35 [28] S. Silva, M. Negri, M. Henriques, R. Oliveira, D. Williams, J. Azeredo, Silicone colonization by non-*Candida albicans* *Candida*
36 species in the presence of urine. *J Med Microbiol*, 59 (2010) 747e54.
- 37 [29] L. P. Samaranayake, J. M. Raeside, T. W. Macfarlane, Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro.
38 *Sabouraudia*, 22 (1984) 201-207.
- 39 [30] M. F .Price, I. D. Wilkinson, L.O. Gentry, Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*, *Sabouraudia*.
40 20(1), 7–14, 1982.
- 41 [31] G. Luo, L.P. Samaranayake, J. Y. Y. Yau, *Candida* species exhibit diferencial in vitro hemolytic activities. *J Clin Microbiol*. 39
42 (2001) 2971-2974.
- 43 [32] M. SLIFKIN, Tween 80 Opacity Test Responses of Various *Candida* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (12) (2000)
44 4626-4628.
- 45 [33] M. Sánchez, F. Colom, Extracellular DNase activity of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Rev Iberoam Micol*.
46 27 (1) (2010) 10–13.
- 47 [34] T. Muadcheing, P. Tantivitayakul, Distribution of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species in oral candidiasis
48 patients: Correlation between cell surface Hidrofóbitoity and biofilm forming activities - *Archiv of oral biol*, 60 (2015) 894 – 901.
- 49 [35] S. Silva, M. Negri, M. Henriques, R. Oliveira, R. D. Williams, J. Azeredo, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* *Candida*
50 *tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*. 36 (2012) 288–30.

- 1 [36] G. Hageskal, N. Lima, I. Skaar, The study of fungi in drinking water. *Mycological Research*, 113 (2) (2009)165-172
- 2 [37] R. A. Cordeiro, J. A. Sales, D. S. C. M. Castelo-Branco, R. S. N. Brilhante, Y. B. Ponte, G. S. Araújo, P. B. L. Mendes, V. S.
3 Pereira, L P. Alencar, A. Q. Pinheiro, J. J. C. Sidrim, M. F. G. Rocha, *Candida parapsilosis* complex in veterinary practice: A historical
4 overview, biology, virulence attributes and antifungal susceptibility traits. *Veterinary Microbiology*, 212 (2017), 22-30.
- 5 [38] R. Tomičić, Z. Tomičić, P. Raspor, Adhesion of *Candida* spp. and *Pichia* spp. to Wooden Surface. *Food Technology &*
6 *Biotechnology*, 55 (1) (2017) 138-142.
- 7 [39] M. Fatahinia, M. Halvaezadeh, A. Rezaei-Mathkolaei, Comparison of enzymatic activities in different *Candida* species isolated
8 from women with vulvovaginitis. *Journal de Mycologie Médicale*. 28 (2017) 188-194.
- 9 [40] K. Pakshir, K. Zomorodian, M. Karamitalab, M. Jafari, H. Taraz, H. Ebrahimi, Phospholipase, esterase and hemolytic activities
10 of *Candida* spp. isolated from onychomycosis and oral lichen planus lesions. *Journal de Mycologie Médicale*, 23 (2013) 113—118.
- 11 [41] A. Barman, D. Gohain, U. Bora, R. Tamuli, Phospholipases play multiple cellular roles including growth, stress tolerance, sexual
12 development, and virulence in fungi. *Microbiological Research*, 209 (2018) 55–69.
- 13 [42] É. B. M. Riceto, R. P. Menezes, M. P. A. Penatti, R. S. Pedroso, Enzymatic and hemolytic activity in different *Candida* species.
14 *Rev Iberoam Micol*, 32 (2) (2015) 79–82.
- 15 [43] C. P. G. Kumar, T.;Menon, T. Sundararajan, S. Nalini, M. A. Thuruarayan, Esterase activity of *Candida* species isolated from
16 immunocompromised hosts. *Rev Iberoam Micol*, 23 (2006) 101-103.
- 17 [44] P.A. Queiroz, J. S. R. Godoy, P. S. B. Mendonça, R. B. Pedroso, T. I. E. Svidzinski, M. Negri, Adhesion and biofilm formation
18 in artificial saliva and susceptibility of yeasts isolated from chronic kidney patients undergoing haemodialysis. *Journal of Medical*
19 *Microbiology*, 64 (2015) 960-966.
- 20 [45] WHO - World Health Organization. *Water Quality and Health Strategy: 2013 -2020*. Geneva, 2013.
- 21 [46] I.B. Gomes, M. Simões, L.C. Simões. An overview on the reactors to study drinking water biofilms. *Water research*, v. 62, p.
22 63-87, 2014.
- 23 [47] M. P. Rocha, P. L. R. Dourado, M. S. Rodrigues, J. L. Raposo Jr, A. B. Grisolia, K. M. P. Oliveira, The influence of industrial
24 and agricultural waste on water quality in the Água Boa stream (Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil). *Environ Monit Assess*, 187
25 (2015) 442.

7. ANEXOS

Tabela S1. Produção de enzimas hidrolíticas (Fosfolipase, Esterase, Hemolisinas e DNase), Hidrofobicidade da superfície celular, Adesão ao poliestireno, capacidade de formação de biofilmes e susceptibilidade antifúngica de *Candida* spp., isoladas de água subterrânea e clínica.

Nº	Amostras	Fosfolipase		Esterase		DNase		Fator Hemolítico		CSH	Adesão (Abs/cm ²)	Biofilme (Abs/cm ²)		MIC
		Pz ± SD	I	Pz ± SD	I	Pz ± SD	I	Pz ± SD	I	I	AGS	SDB	FLU	
Amostras Ambientais														
2	<i>C. parapsilosis</i> (DRI)	-	-	-	-	-	-	0,24±0,04	V.H	HB	0,127±0,01	0,407±0,06	1,313±0,12	4
3	<i>C. parapsilosis</i> (DUG)	0,46±0,03	V.H	-	-	0,37±0,008	V.H	0,27±0,05	V.H	HB	0,127±0,00	0,221±0,01	0,482±0,01	2
4	<i>C. parapsilosis</i> (DRI)	0,46±0,02	V.H	0,45±0,01	V.H	0,38±0,009	V.H	0,27±0,01	V.H	HB	0,235±0,04	0,254±0,03	1,667±0,10	4
5	<i>C. parapsilosis</i> (DUG)	-	-	0,43±0,02	V.H	-	-	0,29±0,04	V.H	HB	0,213±0,03	0,658 ±0,08	0,890±0,00	8
6	<i>C. parapsilosis</i> (DRI)	0,33±0,005	V.H	0,40±0,03	V.H	0,44±0,005	V.H	0,37±0,02	V.H	HB	0,143±0,01	0,581±0,04	0,424±0,07	4
7	<i>C. parapsilosis</i> (DRI)	-	-	-	-	-	-	0,31±0,02	V.H	HB	0,142±0,03	0,212±0,02	0,385±0,05	0,5
8	<i>C. parapsilosis</i> (DUG)	0,46±0,01	V.H	-	-	0,41±0,005	V.H	0,38±0,02	V.H	HB	0,190±0,02	0,409±0,02	0,290±0,07	1
9	<i>C. parapsilosis</i> (DUG)	-	-	-	-	0,44±0,005	V.H	0,40±0,03	V.H	HB	0,080±0,00	0,291±0,01	0,634±0,05	4
10	<i>C. glabrata</i> (DUG)	-	-	-	-	-	-	0,39±0,03	V.H	HB	0,122±0,00	0,409±0,03	1,245±0,13	1
11	<i>C. glabrata</i> (DUG)	-	-	-	-	-	-	0,41±0,03	V.H	HB	0,097±0,03	0,389±0,03	1,362±0,05	2
12	<i>C. glabrata</i> (DUG)	-	-	-	-	-	-	0,39±0,02	V.H	HB	0,144±0,00	0,353±0,01	1,127±0,05	1
13	<i>C. glabrata</i> (DUG)	-	-	-	-	-	-	0,37±0,06	V.H	HB	0,186±0,01	0,485±0,02	0,520±0,05	2
14	<i>C. glabrata</i> (DUG)	-	-	-	-	-	-	0,37±0,06	V.H	HB	0,175±0,01	0,938±0,06	1,726±0,10	1
15	<i>C. tropicalis</i> (DUG)	0,43±0,01	V.H	0,44±0,01	V.H	-	-	0,27±0,00	V.H	HL	0,313±0,02	0,880±0,03	0,874±0,06	16
Amostras Clínicas														
16	<i>C. parapsilosis</i> (BLO)	-	-	0,45±0,01	V.H	0,34±0,005	V.H	0,31±0,03	V.H	HL	0,117±0,01	0,784±0,06	1,385±0,10	0,25
17	<i>C. parapsilosis</i> (CAT)	0,41±0,005	V.H	0,45±0,01	V.H	0,45±0,005	V.H	0,29±0,05	V.H	HB	0,622±0,00	0,819±0,06	1,389±0,03	0,25
18	<i>C. parapsilosis</i> (URI)	-	-	0,38±0,06	V.H	-	-	0,31±0,00	V.H	HB	0,489±0,08	0,809±0,14	1,511±0,10	0,25
19	<i>C. glabrata</i> (URI)	-	-	0,33±0,01	V.H	-	-	0,38±0,04	V.H	HB	0,463±0,09	0,788±0,01	0,874±0,02	16**
20	<i>C. glabrata</i> (URI)	-	-	0,34±0,00	V.H	-	-	0,34±0,01	V.H	HB	0,426±0,04	0,660±0,08	1,281±0,12	16**
21	<i>C. glabrata</i> (URI)	-	-	-	-	-	-	0,34±0,04	V.H	HL	0,298±0,00	0,603±0,04	1,280±0,16	16**
22	<i>C. glabrata</i> (URI)	-	-	-	-	-	-	0,33±0,05	V.H	HB	0,291±0,01	0,998±0,05	1,96±0,06	16**
23	<i>C. glabrata</i> (URI)	-	-	-	-	-	-	0,34±0,07	V.H	HB	0,419±0,09	0,897±0,07	1,297±0,05	2
24	<i>C. glabrata</i> (URI)	-	-	-	-	-	-	0,34±0,01	V.H	HB	0,311±0,08	0,901±0,05	0,982±0,00	0,25*
25	<i>C. glabrata</i> (URI)	-	-	0,28±0,01	V.H	-	-	0,36±0,03	V.H	HB	0,353±0,03	0,397±0,02	1,133±0,00	0,25
26	<i>C. tropicalis</i> (URI)	0,46±0,02	V.H	0,36±0,01	V.H	-	-	0,32±0,01	V.H	HB	0,449±0,07	0,315±0,01	0,430±0,02	1
27	<i>C. tropicalis</i> (URI)	-	-	0,40±0,05	V.H	-	-	0,35±0,04	V.H	HB	0,535±0,06	0,769±0,04	0,847±0,03	1
28	<i>C. tropicalis</i> (SET)	0,46±0,01	V.H	0,29±0,02	V.H	-	-	0,33±0,07	V.H	HL	0,416±0,04	0,768±0,02	1,348±0,01	0,25
29	<i>C. tropicalis</i> (URI)	-	-	0,42±0,02	V.H	-	-	0,34±0,04	V.H	HL	0,455±0,00	0,788±0,07	1,083±0,04	0,5
30	<i>C. tropicalis</i> (URI)	-	-	0,37±0,01	V.H	-	-	0,40±0,03	V.H	HB	0,493±0,07	0,836±0,05	1,227±0,08	1

31	<i>C. tropicalis</i> (URI)	0,45±0,01	V.H	0,36±0,02	V.H	-	-	0,30±0,05	V.H	HB	0,465±0,02	0,415±0,08	1,371±0,10	1
32	<i>C. tropicalis</i> (URI)	0,48±0,01	V.H	0,38±0,01	V.H	-	-	0,34±0,03	V.H	HB	0,440±0,00	0,368±0,01	0,973±0,01	1
33	<i>C. tropicalis</i> (URI)	0,47±0,01	V.H	0,41±0,01	V.H	-	-	0,30±0,03	V.H	HL	0,384±0,00	0,515±0,04	2,113±0,03	1
35	<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	0,44±0,02	V.H	0,410,02	V.H	-	-	0,40±0,02	V.H	HB	0,118±0,00	0,715±0,004	2,037±0,02	Un
36	<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	-	-	0,39±0,02	V.H	-	-	0,43±0,01	V.H	HL	0,053±0,01	0,317±0,03	0,556±0,03	Un
37	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	-	-	0,35±0,0	V.H	-	-	0,39±0,01	V.H	HL	0,104±0,01	0,664±0,05	1,735±0,06	2
38	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	0,40±0,04	V.H	0,34	V.H	Un		Un		Un	Un	Un	Un	Un
39	<i>C. krusei</i> ATCC 6558	Un		Un		Un		Un		Un	Un	Un	Un	16
40	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Un		Un		0,20±0,01	V.H	Un		Un	Un	Un	Un	Un

Nº: Número correspondente para cada isolado utilizado em todos os ensaios biológicos ; **DUG**: Poços Cavados; **DRI**: Poços artesianos; **URI**: Urina; **BLO**: Hemocultura; **SET**: Secreção Traqueal; **CAT**: Cateter; **I** Interpretação; **Un** Não realizado; **-** Não produção da enzima hidrolítica;. **V.H**: Muito Alto; **CSH**: Hidrofobicidade da Superfície Celular; **HB**: Hidrofóbico; **HL**: Hidrofílico; **AGS**:Água Subterrânea; **SDB**: Sabouraud Dextrose Broth; **Abs/cm²**: Absorbância por cm²; **MIC**: Concentração Inibitória Mínima; **FLU**: Fluconazol; ** Resistente; * Dose-Dependente.