

GISLAINE GOMES MARTINS GUETHI

**CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Trichosporon* ISOLADAS DE
TRÊS REGIÕES COSTEIRAS DO ESTADO DE SÃO PAULO**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Doutora em
Ciências.

Área de concentração: Microbiologia.

São Paulo

2009

GISLAINE GOMES MARTINS GUETHI

**CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Trichosporon* ISOLADAS DE
TRÊS REGIÕES COSTEIRAS DO ESTADO DE SÃO PAULO**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Irma Nelly Gutierrez Rivera

São Paulo

2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Gislaine Gomes Martins-Guethi.

Título da Tese: Caracterização de leveduras do gênero *Trichosporon* isoladas de três regiões costeiras do Estado de São Paulo.

Orientador(a): Irma Nelly Gutierrez Rivera.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a) **Reprovado(a)**

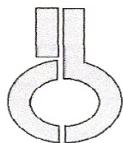
Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:.....
Instituição

Examinador(a): Assinatura:
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:.....
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 132, referente ao projeto intitulado “*Relação entre coliformes fecais, Streptococcus e as leveduras como indicadores de poluição e a frequência de Cândida albicans e Criptococcus neoformans em estuários de São Sebastião*” sob a responsabilidade de **Gislaine Gomes Martins Guethi**, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEP SH - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 23 de março de 2006.

Prof. Dr. MARÍLIA C.L. SEELAENDER
Coordenadora da CEEA - ICB/USP

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da CEP SH - ICB/USP

Aos meus filhos,
Breno Lear e Miguel Arthur,
que em meio a trabalho e estudo,
vejo-os crescer e compartilham todo
carinho e apoio incondicional, dia após dia...
Com todo meu amor, dedico.

Á meu marido
Duvivier,
Por estar ao meu lado com
todo amor, paz,
compreensão, amizade e
incentivo , dedico.

Aos meus pais,
Athayde e Irene (in memorian)
que me dedicaram os melhores anos de suas vidas,
pelo imenso amor, educação e formação moral, dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus, pois tua luz e bênçãos estão presentes em todos os meus dias.

És minha força, És minha rocha,
És meu escudo, Minha cidadela,
És o socorro, minha segurança,
És meu refúgio, minha fortaleza...

Aos meus irmãos:

Denise, Ricardo, Adriana e Sandra

por compartilhar de momentos na vida em que o amor, a bondade, o coração e a sabedoria podem mudar a história de todos os nossos descendentes.

Em especial a quem, além de ter passado uma infância comigo, possa envelhecer e continuar sempre perto pro que de e vier...

*“O amor é a asa que Deus deu à alma para que ela pudesse subir até Ele.
Quem é bom tem olhos de bondade para ver até os erros dos outros,
tem coração para perdoar e tem, sobretudo, coragem para dividir a sabedoria que possui.”*

Aos meus sobrinhos por todo carinho, sorrisos e alegria que me proporcionam...
fazendo a vida ser melhor!

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”.

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

À querida professora e orientadora Dra. Irma Nelly Gutierrez Rivera, agradeço por me abrir a porta, por todo apoio e carinho como me orientou. Obrigada pelos anos de convivência e pela atenção nos momentos difíceis do trabalho.

À profa. Dra Claudete Rodrigues Paula e aos colegas do Laboratório de Micologia, por toda atenção e colaboração.

À profa. Dra. Olga Fischman Gompertz, pelo incentivo e apoio financeiro para na realização desta pesquisa.

À profa Dra Vivian Helena Pellizari e profº. Dr. René P. Schneider e aos seus alunos pela colaboração direta ou indireta na realização desse trabalho e pela disponibilização da infra-estrutura dos laboratórios e apoio técnico.

À todos os funcionários do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação: Alice, Naíde e Aninha pela colaboração. Ao Sr. Celso e Luciana pelo respeito e bom atendimento durante todo o doutorado.

Ao pessoal da biblioteca do Departamento do Instituto de Ciências Biomédicas por toda assistência prestada durante todo o período de doutorado e nas correções da tese, em especial á Ana Paula, Maria José e Eva.

Ao Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo, do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo e Corpo de Bombeiros de Santos, S.P. pelo suporte na realização das coletas de amostras de água do mar e areia no litoral do Estado de São Paulo.

À todos que conviveram comigo nesse período no Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular. Aos colegas Mario, Zé Edu, Keily, Oyama, Franklin, Caroline, Solange e Zelma pela colaboração.

Aos estagiários que por um período conviveram conosco: Renata, Helena, Antonio Carlos, Neilza, Milena, Daniel, Bruna, Roberta, Lívia, Natália, Maurícia, André e Mário, pelo convívio e colaboração.

À Rosa Gamba e Sr. Luis, por toda ajuda, assistência técnica, convivência e bondade.

*Diante de Deus, somos todos igualmente sábios e igualmente tolos.
(Albert Einstein).*

Às amigas do Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular, pela amizade, pelo ambiente dinâmico e por toda ajuda. Em especial:

À Lilian, que compartilhou comigo de momentos de trabalho e estudo, choramos e sorrimos juntas. Me apoiou e dividiu comigo inclusive orações. Li vamos envelhecer e sempre seremos “Amigas”.

À Bianca, que com seu jeito ativo esteve sempre pronta e me mostrou um lado muito prático de ver as coisas.

À Claudiana, que sempre me aconselhou de forma tão sensata e meiga, me ajudou sempre sem medir esforços e sempre me apoiou.

A Mariela que esteve próxima e trouxe alegria, companheirismo e me ensinou muito...

“Dois homens juntos são mais felizes que um isolado. Se um vier a cair o outro o levanta. Mas, aí do homem solitário, se ele cair, não há ninguém para levantá-lo (Ecl 4.1-10)”.

Aos meus poucos, mais sinceros amigos de hoje e sempre.

À minha saudosa mãe Irene (*in memoriam*) e meu pai Athayde, que foram exemplo de vida, força, perseverança, honestidade, coragem e fé. Sempre estando ao meu lado em todos os momentos de minha vida.

À Heleni por me dar suporte no dia-a-dia da casa e por toda dedicação.

Ao Governo do Estado de São Paulo pelo incentivo através da Bolsa do “Projeto Bolsa Mestrado”.

Às supervisoras de ensino da rede Estadual do Governo do Estado de São Paulo (D.E. Osasco): Iaci, Olinda e Edel pela atenção dispensada.

Aos colegas da Escola Deputado Guilherme de Oliveira Gomes, em especial a amiga Alexia pela colaboração, compreensão, companheirismo e amizade da qual não esquecerei, por todos os bons momentos e pelas horas difíceis. Pela inestimável amizade.

Ao meu querido esposo Duvivier, que sempre esteve ao meu lado, me apoiou e me incentivou nos momentos mais difíceis... E por todos os momentos felizes que temos vivido na Rocha.

Aos meus maiores tesouros, meus filhos Breno e Miguel, a razão principal da minha vida!

*“Um pouco de Ciências nos afasta de Deus.
Muito, nos aproxima”*

(Prof. Dr. Louis Pasteur – Diretor Geral do Instituto de Pesquisa Científica da Universidade Nacional da França (1892)).

RESUMO

MARTINS-GUETHI, G. G. **Caracterização de leveduras do gênero *trichosporon* isoladas de três regiões costeiras do estado de São Paulo**. 192 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2009.

A integridade e o equilíbrio ecológico das regiões costeiras têm sido uma grande preocupação, por apresentarem uma exploração desordenada e muitas vezes predatória de seus recursos naturais e por terem se tornado o principal local de lazer, turismo ou moradia de grandes populações urbanas. Frente a essas atividades humanas, os ecossistemas marinhos recebem microrganismos transitórios que podem degradar a qualidade da água e oferecer um grande risco à saúde humana, animal e do ecossistema marinho. A finalidade deste estudo foi quantificar leveduras, isolar e caracterizar leveduras do gênero *Trichosporon*, em amostras de água de mar e areia em três regiões costeiras do estado de São Paulo. A qualidade sanitária dos mesmos foi avaliada. No período de agosto/05 a março/07, foram coletados e analisados um total de 126 amostras de água de mar e areia nas regiões costeiras de Santos, São Sebastião e Ubatuba. A contagem de leveduras variou de < 1 até 1.300 UFC/100mL em amostras de água de mar e <1 até 3.200 UFC/g em areia. Foi verificada maior frequência de isolados suspeitos de *Trichosporon* spp. em amostras de água em São Sebastião, região de média atividade antrópica (MAA) e em Santos, região de alta atividade antrópica (AAA), porém em Ubatuba a incidência foi baixa (BAA). As leveduras isoladas foram identificadas usando a metodologia tradicional e testes genotípicos. Dos 102 isolados suspeitos de *Trichosporon* spp. 30,5% foram identificados pelo API ID 32 C, 40,2% de acordo ao auxanograma e 63,7% pelo PCR. Os isolados PCR positivo foram seqüenciados e caracterizados pelo BOX-PCR. Vinte isolados apresentaram similaridade com *T. debeurummannianum* pelo sequenciamento com o iniciador IGS1 e somente 7 de 33 com *T. debeurummannianum* (5), *T. domesticum* (1) e *T. jirovecii* (1), utilizando o iniciador ITS1.

Palavras-chave: *Trichosporon* spp.; Leveduras; Água de mar; Areia; Antifúngicos; Seqüenciamento.

ABSTRACT

MARTINS-GUETHI, G. G. **Characterization of *Trichosporon* spp. Isolated from three coastal regions of São Paulo State, Brazil.** 192 p. Ph.D. Thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The ecological balance of coastal regions has been the major concern for the exploration and predation of natural resources and due to become the main place of leisure, tourism and housing of large urban populations. These anthropogenic activities generate the contamination of marine ecosystems with transient microorganisms that can compromise the water quality and offer risk to human, animal and marine ecosystem health. The purpose of this study was to quantify yeasts, isolate and characterize *Trichosporon* spp. in seawater and sand samples from three regions of Sao Paulo State, Brazil. The sanitary quality of seawater was evaluated. During August/05 and March/07 were collected and analyzed 126 seawater and sand samples from coastal regions of Santos, São Sebastião and Ubatuba. Yeast counts ranged from <1 to 1,300 CFU/100 mL in seawater samples and <1 to 3,200 CFU/g in sand samples. It was observed more frequency of *Trichosporon* spp. isolates suspicious in water samples from S. Sebastião region, local with medium anthropogenic activities (MAA) and Santos, region with high human activities (HAA), however, in Ubatuba the incidence was low (LAA). The yeasts were identified using the traditional and genotypic methods. From 102 isolates suspicious of *Trichosporon* spp. 30.5% were identified by API ID 32 C, 40.2% by auxanogram test and 63.7% by PCR. The isolates PCR positives were sequenced and characterized by BOX-PCR. Twenty isolates had similarity with *T. debeurmannianum* by sequencing using the IGS1 primer and only 7 from 33 with *T. debeurmannianum* (5), *T. domesticum* (1) and *T. jirovecii* (1), using the ITS1.

Keywords: *Trichosporon* spp.; Yeasts; Sea water; Sand; Antifungal; Sequencing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Localização dos pontos de coleta de amostras nas regiões de Ubatuba, Canal de São Sebastião e Baixada Santista.....	50
Figura 2. Foto da região de São Sebastião – SP.....	51
Figura 3. Foto da Praia de José Menino, Santos, SP.....	52
Figura 4. Foto do Saco da Ribeira, Ubatuba, SP.....	53
Figura 5. Correlação entre a concentração de leveduras e os valores de pH de amostras de areia, São Sebastião-P2.....	77
Figura 6. Correlação entre as concentrações de leveduras e coliformes termotolerantes de amostras de água, São Sebastião–P1.....	77
Figura 7. Variação dos parâmetros microbiológicos e de pH avaliados no Canal de São Sebastião, por tipo de amostra, ponto e data de coleta.....	78
Figura 8. Correlação entre a concentração de leveduras e os valores condutividade ($r = - 0,964$, $p = 0,003$) e salinidade em amostras de areia, Santos - P1.....	79
Figura 9. Correlação entre as concentrações de leveduras e colifagos de amostras de água, Santos - P1.....	80
Figura 10. Correlação entre as concentrações de leveduras e coliformes termotolerantes de amostras de água, Santos–P3.....	81
Figura 11. Variação dos parâmetros microbiológicos e salinidade avaliada na Baixada Santista, por tipo de amostra, ponto e data de coleta.....	81
Figura 12. Correlação entre a concentração de leveduras e os valores de pH de amostras de água, Ubatuba-P1.....	84
Figura 13. Variação dos parâmetros microbiológicos e pH avaliados na região de Ubatuba, por tipo de amostra, ponto e data de coleta.....	85
Figura 14. Características macro e micromorfológicas de isolados de <i>Trichosporon</i> spp. de amostras de água e areia da região costeira do Estado de São Paulo.....	88
Figura 15. Variação de crescimento dos isolados suspeitos de <i>Trichosporon</i> spp., nas três regiões estudadas, por temperatura e tempo de incubação.....	91
Figura 16. Produção de urease por isolados suspeitos de <i>Trichosporon</i> spp. de amostras de água e areia das três regiões estudadas, por temperatura e tempo de incubação.....	93
Figura 17. Percentual de substratos positivos no auxanograma para as leveduras isoladas de acordo com a região e tipo de amostra.....	102
Figura 18. Frequência de isolados que apresentaram tolerância a 0,1% de cicloheximida, por amostra e região estudada.....	103
Figura 19. Comparação da atividade enzimática em isolados de <i>Trichosporon</i> spp., das três regiões costeiras do Estado de São Paulo, por tipo de teste, amostra, local e temperatura de incubação.....	108
Figura 20. Teste de sensibilidade aos antifúngicos de isolado de <i>Trichosporon</i> spp., de amostra de água de mar da Baixada Santista, utilizando fitas E-test®, com as 6 drogas testadas . A: KE, VO, IT e B: CS, FL, AP.....	111

Figura 21. Perfis do teste de susceptibilidade antifúngica em isolados de <i>Trichosporon</i> spp. de amostras de água de mar e areia da região costeira de São Paulo.....	113
Figura 22. Frequência de identificação por PCR de <i>Trichosporon</i> spp. por tipo de amostra e região estudada.....	116
Figura 23. Dendrograma construído com a técnica de BOX-PCR com isolados de <i>Trichosporon</i> spp. provenientes de amostras de água de mar e areia das áreas de São Sebastião, Baixada Santista e Ubatuba.....	119
Figura 24. Árvore filogenética baseada na comparação das sequências da região ITS de leveduras com as sequências disponíveis no GenBank.....	122
Figura 25 – Árvore filogenética baseada na comparação das sequências da região IGS de leveduras com as sequências disponíveis no GenBank.....	123
Figura 26. Espécies de leveduras identificadas, pelo sequenciamento parcial da região ITS utilizando o iniciador ITS1.fwd.....	124
Figura 27. Espécies de leveduras identificadas, pelo sequenciamento parcial da região IGS utilizando o iniciador IGS1.fwd.....	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade enzimática segundo, a avaliação dos resultados da razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia mais a zona de degradação.....	61
Tabela 2. Guia de interpretação para Teste de Susceptibilidade <i>in vitro</i> de <i>Candida</i> spp.....	63
Tabela 3. Parâmetros microbiológicos e físico-químicos determinados na região costeira da Baixada Santista, São Paulo, por ponto de coleta.....	74
Tabela 4. Parâmetros microbiológicos e físico-químicos determinados nas regiões costeiras do Canal de São Sebastião e Ubatuba, São Paulo, por ponto de coleta.....	75
Tabela 5. Isolados suspeitos de <i>Trichosporon</i> spp., por tipos de meio de cultura, amostra e locais de isolamento.....	87
Tabela 6. Produção de urease por isolados suspeitos de <i>Trichosporon</i> spp. de amostras de água e areia de São Sebastião, Santos e Ubatuba, período 2005-2007, por temperatura e tempo de incubação.....	92
Tabela 7. Frequência comparativa da assimilação de substratos de acordo a chave proposta no manual “The Yeasts” (1984).....	95
Tabela 8. Comparação dos substratos e testes empregados nas chaves de identificação de <i>Trichosporon</i> spp., de acordo aos autores.....	96
Tabela 9. Resultados de identificação das cepas controle de <i>Trichosporon</i> spp. utilizando cinco chaves.....	97
Tabela 10. Resultados do auxanograma utilizando chaves distintas para identificação de <i>Trichosporon</i> spp.....	99
Tabela 11. Número de espécies de <i>Trichosporon</i> identificadas de acordo com 5 chaves distintas.....	100
Tabela 12. Isolados identificados pelo teste API ID 32 C, das três regiões costeiras de São Paulo, por tipo de amostra.....	104
Tabela 13. Resultados dos testes de sensibilidade <i>in vitro</i> de isolados de <i>Trichosporon</i> spp., de amostras de água de mar e areia, por região e tipo de antifúngico.....	114
Tabela 14. Espécies de leveduras identificadas, pelo sequenciamento parcial da região ITS utilizando o iniciador ITS1.fwd, por local de coleta.....	123
Tabela 15. Espécies de leveduras identificadas, pelo sequenciamento parcial da região IGS utilizando o iniciador IGS1.fwd, por local de coleta.....	124
Tabela 16. Identificação por seqüenciamento dos isolados de <i>Trichosporon</i> spp. de amostras de água do mar e areia do Canal de São Sebastião, Baixada Santista e Ubatuba.....	126

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	REGIÕES COSTEIRAS	18
2.2	QUALIDADE SANITÁRIA DE AMOSTRAS DE ÁGUA E AREIA DE REGIÃO COSTEIRA	21
2.3	LEVEDURAS	23
2.4	DIVERSIDADE DE LEVEDURAS NO AMBIENTE COSTEIRO	24
2.4.1	Leveduras do gênero <i>Trichosporon</i>	27
2.5	CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Trichosporon</i>	31
2.5.1	Caracterização fenotípica	31
2.5.2	Caracterização Molecular	40
2.6	CARACTERIZAÇÃO DAS ÁREAS DE ESTUDO	44
2.6.1	Canal de São Sebastião	44
2.6.2	Baixada Santista	45
2.6.3	Ubatuba	47
3	OBJETIVOS	49
3.1	OBJETIVO GERAL	49
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
4	MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1	AMOSTRAGEM	50
4.1.1	Período de coleta	50
4.1.2	Canal de São Sebastião	51
4.1.3	Baixada Santista	51
4.1.4	Ubatuba	52
4.1.5	Amostras de água do mar	53
4.1.6	Amostras de areia	53
4.2	DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	53
4.3	DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS	54
4.3.1	Contagem de coliformes termotolerantes (CT) e <i>Escherichia coli</i>	54
4.3.2	Contagem de enterecocos intestinais (EI)	54
4.3.3	Contagem de bactérias marinhas viáveis (BMV)	54
4.3.4	Contagem de colifagos	54
4.4	CONTAGEM DE LEVEDURAS	55
4.4.1	Contagem de leveduras em amostras de água do mar	55
4.4.2	Contagem de leveduras em amostras de areia	55
4.4.3	Purificação dos isolados	56
4.5	CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Trichosporon</i> spp.	56
4.5.1	Cepas controles	56
4.5.2	Testes utilizados na caracterização fenotípica	57
4.5.3	Testes de sensibilidade a antifúngicos	62
4.6	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	64
4.6.1	Extração do DNA cromossômico	64
4.6.2	Identificação de <i>Trichosporon</i> spp. pela reação em cadeia pela polimerase	66
4.6.3	Caracterização molecular utilizando a seqüência BOX-PCR	67

4.6.4 Seqüenciamento	68
4.7 ANÁLISES DOS RESULTADOS	69
4.7.1 Análise estatística	69
4.7.2 Análise dos agrupamentos obtidos usando a metodologia molecular	70
4.7.3 Análises das sequências obtidas pelo sequenciamento parcial da região ITS e/ou IGS	70
5 RESULTADOS	71
5.1 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DAS TRÊS REGIÕES COSTEIRAS ESTUDADAS	71
5.1.1 Canal de São Sebastião	76
5.1.2 Baixada Santista	79
5.1.3 Ubatuba	83
5.2 CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Trichosporon</i> spp.	86
5.2.1 Caracterização fenotípica	86
5.3 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE <i>Trichosporon</i> spp.	115
5.3.1 Extração do DNA cromossômico	115
5.3.2 Identificação de <i>Trichosporon</i> spp. através da reação de PCR	115
5.3.3 Caracterização molecular pela técnica de BOX-PCR	116
5.3.4 Seqüenciamento do fragmento rDNA amplificado	121
6 DISCUSSÃO	128
6.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DAS TRÊS REGIÕES COSTEIRAS DO ESTADO DE SÃO PAULO	128
6.2 LEVEDURAS EM AMOTRAS DE ÁGUA DE MAR E AREIA	133
6.3 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE <i>Trichosporon</i> spp.	138
6.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Trichosporon</i>	146
7 CONCLUSÕES	149
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*	
ANEXOS	

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma linha contínua de costa com aproximadamente oito mil quilômetros de extensão, uma das maiores do mundo. É o segundo em extensão litorânea na América Latina, concentrando cerca de 2/3 da população distribuída em 75% dos principais centros urbanos dispostos ao longo do litoral (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2008). A Zona Costeira do Estado de São Paulo, com extensão de 700 km e área de 27.000 Km² aproximadamente, inclui 36 municípios e abriga a maior parte da Mata Atlântica remanescente no Estado (GEO BRASIL, 2002).

Os ambientes marinhos e costeiros do Brasil vêm sofrendo nos últimos anos um considerável processo de degradação ambiental, gerado pela crescente pressão sobre os recursos naturais marinhos, continentais e pela capacidade limitada desses ecossistemas absorverem os impactos resultantes. A introdução de nutrientes, alteração ou destruição de habitats, alterações na sedimentação, superexploração de recursos pesqueiros, poluição industrial, principalmente de poluentes persistentes, e a introdução de espécies exóticas, constituem-se nos maiores impactos ambientais na zona costeira brasileira (GEO BRASIL, 2002). A contaminação da água é um dos maiores problemas de saúde pública, principalmente em áreas tropicais e subtropicais, cuja variedade e severidade das doenças veiculadas por águas contaminadas são maiores.

A presença de leveduras é comum em água do mar, estuários e água doce, principalmente em ambientes subtropicais (WOOLLETT e HENDRICK, 1970), porém são poucos os relatos da sua prevalência no habitat marinho (HAGLER e AHEARN, 1987). As espécies de leveduras encontradas em ambientes que recebem poluição doméstica estão geralmente associadas com animais de sangue quente e o homem, enquanto outras espécies são associadas com madeira e solo (WOOLLETT e HENDRICK, 1970). As leveduras estão constituídas por 39 gêneros e, aproximadamente 350 espécies, as quais são de grande importância para a saúde humana (LACAZ *et al.*, 1984). No Brasil são poucas publicações sobre leveduras marinhas, entretanto, trabalhos pioneiros foram realizados nos estados do Rio de

Janeiro (HAGLER, 1978) e São Paulo (PAULA, 1978; 1983). Foram isoladas leveduras dos gêneros: *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Pichia* e *Sporobolomyces*, de águas marinhas e de areias das praias de São Vicente, Bertioga e de águas do Córrego de Agrião-Bacia do Rio Jacaré-Pepira, São Paulo (PAULA *et al.*, 1983; MARTINS *et al.*, 1989). Entre as espécies mais importantes para a saúde pública e associadas ao ecossistema marinho destacam-se: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Trichosporon* spp..

O gênero *Trichosporon*, levedura de importância médica, inclui os agentes causadores de infecções profundas e superficiais, denominadas Tricosporonose e são consideradas do grupo emergente e hoje sua incidência tem aumentado muito especialmente em imunocomprometidos.

. Atualmente estão sendo descritas 37 espécies do gênero *Trichosporon* Behrend os quais estão sendo divididas em 4 ramos: *T. gracile*, *T. cutaneum*, *T. porosum* e *T. ovóides* (MIDDELHOVEN *et al.*, 2004). Entretanto somente sete espécies estão associadas a infecções humanas: *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. cutaneum*, *T. inkin*, *T. jirovecii*, *T. mucoides*, e *T. ovóides* (RODRIGUES-TUDELA *et al.*, 2005).

O presente estudo visa quantificar leveduras e caracterizar espécies de *Trichosporon* spp. em amostras de água de mar e areia em três ambientes costeiros do estado de São Paulo contendo diferentes níveis de atividade antropogênica e relacioná-los com os indicadores microbiológicos e parâmetros físico-químicos, constituindo assim uma ferramenta para as análises de perigos com ênfase em *Trichosporon* spp. em ecossistemas costeiros.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 REGIÕES COSTEIRAS

As águas costeiras, incluindo estuários e lagoas, constituem a interface entre os ambientes marinhos e de água doce, e entre o continente e oceanos (UNITED NATIONS - U. N., 2008). Na zona costeira, os sistemas marinhos, terrestres e

atmosféricos interagem. Os processos de produção, consumo e troca ocorrem em altas taxas de intensidade. Esta zona inclui as planícies costeiras, a plataforma continental, os estuários que intercedem, as lagoas, as barreiras costeiras e os deltas (RAY, 1991). As áreas costeiras são uma das áreas mais produtivas e biologicamente diversas no planeta (U. N., 2008). A maior parte da população mundial vive em zonas costeiras, e há uma tendência permanente do aumento da concentração demográfica nessas regiões. Atualmente, mais da metade dessa população vive dentro de uma faixa de 321.870 quilômetros de costa, e a expectativa é que a proporção cresça para 75% no ano de 2030 (BELAUSTEGUIGOITIA, 2004).

Os ambientes marinhos e costeiros do Brasil vêm sofrendo nos últimos anos um considerável processo de degradação ambiental, gerado pela crescente pressão sobre os recursos naturais marinhos, continentais e pela capacidade limitada desses ecossistemas absorverem os impactos resultantes. A introdução de nutrientes, alteração ou destruição de habitats, alterações na sedimentação, superexploração de recursos pesqueiros, poluição industrial, principalmente de poluentes persistentes, e a introdução de espécies exóticas, constituem-se nos maiores impactos ambientais na zona costeira brasileira (GEO BRASIL, 2002).

As zonas costeiras são regiões altamente dinâmicas devido à transferência de energia e matéria que ocorre entre os sistemas terrestres e marinhos, resultantes de forças naturais, como as marés e o clima (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO, 1998). Os fluxos de nutrientes de que se beneficiam, tanto de origem terrestre, trazidos pela chuva e pelos rios, quanto de origem marinha, fazem dessas zonas, áreas de alta produtividade biológica, que chegam a totalizar cerca de 25% da produtividade primária global (AGARDY e ALDER, 2005), dando assim origem a importantes habitats terrestres e aquáticos (FAO, 1998; JICKELLS, 1998).

O conjunto desses habitats forma ecossistemas costeiros únicos como recifes de corais, estuários, marismas, florestas de manguezais, *kelps* e outras zonas úmidas que, ao servirem igualmente de áreas de berçário e de alimentação para várias espécies de animais, transformam os ecossistemas em enormes centros de biodiversidade (FAO, 1998).

Ademais, os ecossistemas costeiros têm também um papel fundamental na proteção da linha de costa. As suas características físicas e mesmo os componentes biológicos ajudam a mitigar os efeitos de desastres naturais como tempestades, cheias ou o recuo da linha de costa, sendo igualmente essenciais em processos naturais como a acreção de sedimento ou no controle da erosão causada pela ação das ondas e dos ventos (FAO, 1998).

A produtividade biológica dos ecossistemas costeiros faz com que essas áreas sejam os grandes "berçários" naturais, locais de abrigo, alimentação e repouso para muitas espécies. No entanto, as atividades humanas associadas ao intenso desenvolvimento populacional urbano, industrial e agropecuário exercem sobre os ecossistemas alterações físicas, químicas e biológicas, que refletem negativamente na qualidade dos ecossistemas marinhos (HUTCHINSON, 1967; HYNES, 1974; VOLLENWEIDER, 1981; TUNDISI e MATSURA-TUNDISI, 1992).

Esse histórico do uso e ocupação da costa brasileira mostra um crescimento sem planejamento adequado, obedecendo principalmente a aspectos econômicos e soluções imediatistas. A desorganização reflete-se no crescimento de moradias subnormais (favelas), além da utilização de áreas de risco, como penhascos, beira mar e áreas de mangue (ABESSA *et al.*, 2001).

Todas essas atividades humanas, direta e/ou indiretamente, estão causando primariamente, mudanças na biodiversidade dos ambientes marinhos. Além disso, microrganismos patogênicos presentes no esgoto doméstico, hospitalar ou industrial, quando lançados no ambiente marinho sem um tratamento adequado, podem atingir áreas de banhistas ou de cultivo de produtos marinhos que colocam em risco a população humana e animal residente na região portuária e/ou costeira (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 2003).

Em razão da expansão dessas atividades antrópicas, tornou-se imperativa a necessidade de uma avaliação contínua da qualidade das águas litorâneas. A descarga de esgotos não tratados afeta a saúde dos ecossistemas marinhos em duas formas: os poluentes químicos – orgânicos e inorgânicos – que, dependendo do tipo, podem afetar severamente as estruturas das comunidades, e a poluição microbiana pela introdução

de microrganismos patogênicos, os quais podem expor os banhistas a bactérias, fungos, vírus e protozoários e ocasionar doenças ou infecções após o banho em águas contaminadas (RIVERA e MARTINS, 1996; CETESB, 2004).

Assim, devido à necessidade de melhorar as condições sanitárias e a balneabilidade das praias foram criados emissários submarinos. No Estado de São Paulo, existem sete emissários submarinos de esgotos, que lançam seus efluentes no mar após pré-condicionamento. Estes sistemas, embora tragam muitos benefícios para a qualidade das praias à medida que afastam o esgoto delas, também podem trazer prejuízos ambientais se não forem bem dimensionados e operados. Desse modo, o monitoramento ambiental desses lançamentos é muito importante (CETESB, 2004).

Sendo assim, em razão do comprometimento da qualidade e a sustentabilidade dos ecossistemas que resulta diretamente na alteração negativa da qualidade de suporte da vida humana, essas áreas vêm despertando na sociedade a convicção da necessidade de, por meio da pesquisa científica e de ações de gerenciamento, monitoramento e educação ambiental, encontrar uma situação de equilíbrio entre o uso e a preservação dos ecossistemas (MUEHE, 2001).

O desenvolvimento sustentável pressupõe a manutenção dos recursos naturais a longo prazo e, paralelamente, o equilíbrio entre o crescimento econômico e a equidade social (COMISSÃO MUNDIAL SOBRE MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO, 1988).

2.2 QUALIDADE SANITÁRIA DE AMOSTRAS DE ÁGUA E AREIA DE REGIÃO COSTEIRA

O gerenciamento eficiente dos recursos hídricos, frente a uma população em constante crescimento, deve considerar a recuperação da qualidade das águas continentais alteradas e a proteção das não poluídas (BRANCO e ROCHA, 1977; AYRES e WESTCOT, 1991). Essas ações requerem a definição de padrões de qualidade, a fim de classificar os corpos aquáticos e acompanhar sua evolução. Os padrões brasileiros adotados pela Resolução nº 274 (29/11/2000) do Conselho Nacional

do Meio Ambiente (CONAMA, 2000), estabeleceram critérios para a classificação das águas doces – estuarinas e marinhas – destinadas à recreação de contato primário e considerando as densidades de coliformes termotolerantes, enterococos intestinais ou *Escherichia coli*, as quais determinam os padrões de balneabilidade (APHA, 1992). Assim, densidades superiores aos limites estabelecidos para cada indicador, em duas ou mais amostras de um conjunto de cinco semanas consecutivas, ou valores superiores ao valor máximo na última amostragem, caracterizam a praia como “Imprópria para recreação de contato primário”. Essa notificação indica o comprometimento na qualidade sanitária das águas, com conseqüente risco de contaminação do banhista, e desaconselha a utilização da praia para o banho (CONAMA, 2000).

Além da problemática em relação à contaminação das águas, nos últimos anos, tem havido uma grande preocupação com a contaminação das areias das praias, devido ao crescente descarte inadequado de lixo, dejetos de animais trazidos pelas águas de chuvas. Esses que carregam poluição à areia e também às marés, e podem transportar microrganismos e parasitas patogênicos; colocando em risco a saúde da população (SATO *et al.*, 1998; CETESB, 1999).

Foram realizados pela CETESB, dois estudos epidemiológicos para avaliar as condições sanitárias das areias das praias do litoral Paulista, em 1984/85 e em 1998. Neste último, foram coletadas amostras de areia na região seca e úmida da praia, e de forma simultânea, foram feitas coletas de água do mar, cujo principal objetivo foi correlacionar a incidência de doenças gastrointestinais em banhistas e os índices de contaminação fecal das praias. O estudo mostrou também que nas praias mais poluídas, somente o contato com a areia já constitui fator de risco para a manifestação de sintomas de diarreia, bem como ocorrência de náuseas e vômitos. A partir desse estudo, foi possível concluir que: o grupo de banhistas apresentou maior incidência de sintomas em relação aos indivíduos que não entraram na água, e esta foi crescente quanto maior o grau de exposição; as crianças, com idade inferior a sete anos foram o grupo etário que apresentou maior número de banhistas com sintomas; as praias que permaneceram a maior parte do tempo, classificadas como impróprias, apresentaram maior número de banhistas com sintomas. As primeiras semanas de janeiro, época de

férias, foi o período em que se observou maior incidência de sintomas em banhistas. Além disso, o trabalho constatou que a principal fonte de contaminação da areia das praias são os cursos d'água e a contaminação da areia úmida foi atenuada pela "lavagem" da água do mar. Ainda a contaminação das areias é maior nos meses de verão, o que indica que o grande aumento da população flutuante registrada nesta época do ano e, conseqüentemente, a grande freqüência de banhistas nas praias, também influencia de modo direto a contaminação observada na areia (CETESB, 2009).

A poluição das praias tem sido estudada por vários autores (HAGLER *et al.*, 1986; GANOULIS, 1991; MASCARENHAS, 1997; VIEIRA *et al.*, 1999; PINHEIRO-JUNIOR *et al.*, 2002; SCHIFF *et al.*, 2003), cujas pesquisas tiveram por base atividades de monitoramento por meio de indicadores microbiológicos de poluição, tais como índices da ocorrência de coliformes totais, coliformes fecais e *Escherichia coli*. Lima *et al.*, (2001) afirmam que a preservação dos recursos hídricos é de fundamental importância, pois por meio da poluição que introduzem-se substâncias nocivas, tóxicas ou patogênicas que modificam as características físicas, químicas e biológicas do meio ambiente aquático.

2.3 LEVEDURAS

Entre a biodiversidade de microrganismos, as leveduras são classificadas em todas as três classes de fungos superiores: ascomicetos, basidiomicetos e fungos imperfeitos. Estão constituídas por 59 gêneros e, aproximadamente, 500 espécies, e algumas delas são de grande importância para a saúde humana (LACAZ *et al.*, 1984). São microrganismos predominantemente unicelulares, eucarióticos, quimiorganotróficos. Não possuem mecanismos de locomoção e são aclorofilados. Reproduzem-se sexuadamente por ascósporos; e, assexuadamente, por brotamento, cissiparidade ou a combinação desses dois processos. Alguns gêneros caracterizam-se por apresentar apenas clastoconídios, enquanto outros, além de blastoconídios, formam pseudo-hifas e hifas rudimentares. As leveduras são filogeneticamente

heterogêneas, pertencendo às divisões: Deuteromycota (Fungi Imperfect), classe Blastomycetes (reprodução assexuada), Ascomycota e Basidiomycota, cujo mecanismo de reprodução é sexuado (LACAZ *et al.*, 1991). As leveduras podem ser encontradas em saprofitismo; são seres heterótrofos, que necessitam de matéria orgânica elaborada para sua nutrição. A absorção dos nutrientes ocorre pela ação de enzimas que hidrolizam as macromoléculas e permitem sua assimilação por meio dos mecanismos de transporte ativo e passivo. Por isso, os fungos estão entre os principais biodegradadores de matéria orgânica do nosso planeta (LACAZ, 2002). Possuem habilidade em se multiplicar, em diferentes temperaturas e valores de pH, permitindo sua propagação nos mais diversos ambientes.

2.4 DIVERSIDADE DE LEVEDURAS NO AMBIENTE COSTEIRO

As leveduras participam de vários processos ecologicamente significativos no mar, em especial, em estuários: decomposição de substratos, reciclagem de nutrientes, biodegradação de óleo e compostos recalcitrantes e também o parasitismo de animais marinhos (MEYERS e AHEARN, 1974).

Poucos são os estudos de identificação de leveduras em amostras de água e areia de ecossistemas costeiros. As primeiras publicações sobre o estudo das leveduras em ambientes marinhos foram realizadas por Zobell e Feltham (1934) e Zobell (1946), apud Purchio (1988). Foram identificados e relatados vários gêneros de leveduras como *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Sporobolomyces*, *Torulopsis* e *Trichosporon* (FELL, 1960; JOHNSON e SPARROW, 1961; ROTH *et al.*, 1962; MORRIS, 1975 apud RIVERA *et al.*, 2008).

Foram relatadas altas densidades de leveduras em águas costeiras nos E.U.A., constituídas por vários gêneros, entre eles: *Candida*, *Trichosporon*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Hansenula* e *Rhodospiridium*. (MORRIS, 1968, 1975; QUEIROZ, 1972; MEYERS e AHEARN, 1974; PAULA *et al.*, 1983). Assim, também foram estudadas, leveduras em águas do mar no sul da Flórida, altamente

poluídas por resíduos domésticos, indicando a presença de um grande número de espécies de *Candida*, *Trichosporon*, *Torulopsis* e *Rhodotorula* (FELL e VAN UDEN, 1963; MEYERS e AHEARN, 1974).

Considerando que as leveduras são abundantes em águas costeiras (COOKE, 1960; SPENCER *et al.*, 1970; AHEARN, 1973), sua presença pode estar relacionada ao arrasto da terra pelos rios e canais, bem como de resíduos domésticos e industriais que aumentam os nutrientes para água do mar.

Leveduras também foram isoladas de algas marinhas da praia de Piedade, Pernambuco, Brasil, dentre elas, *Candida guilliermondii*, *C. tropicalis*, *Trichosporon* spp., *Torulopsis versatilis* (QUEIROZ, 1972).

Em águas do Oceano Índico, foi realizado estudo sobre leveduras marinhas. De 179 amostras, 65% foram positivas, tendo sido isolados os gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Saccharomyces*, salientando-se o fato de que o autor descreveu um novo gênero, *Sterigmatomyces* (FELL, 1967 *apud* PAULA, 1978).

A distribuição sazonal entre leveduras, coliformes fecais e estreptococos fecais foi avaliada por Martins (1989) em um estudo de autodepuração no Córrego do Agrião, em São Paulo. Estudo semelhante feito na lagoa Olhos de Água, em Minas Gerais apresentou altos valores de leveduras e bactérias nas estações próximas às descargas de esgotos (ROSA *et al.*, 1990). Paula *et al.*, (1983) observaram em praias da Baixada Santista, em São Paulo, que *Candida* spp. acompanhava as flutuações de coliformes fecais.

Dentre os fungos que constituem a microbiota superficial do homem, as leveduras apresentam destacada importância, principalmente em indivíduos neutropênicos (NUCCI *et al.*, 1995). Os fungos leveduriformes mais comumente isolados são: *Candida* spp. (CROCCO *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006), *Rhodotorula* spp. (GARCIA-MARTOS *et al.*, 2004; LUNARDI *et al.*, 2006; RIEDEL *et al.*, 2007), *Malassezia* spp. (SCHOLOTTFELDT *et al.*, 2002; TARAZOOIE *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006), *Cryptococcus* spp., *Debaryomyces* spp. e *Pichia* spp. (MEYERS, 1974; MORRIS, 1968; QUEIROZ, 1972) e *Trichosporon* spp. (HERBRECHT *et al.*, 1993). Os

mesmos são considerados de grande importância à saúde pública por conterem espécies patogênicas para animais e humanos, também pela sua associação aos ecossistemas marinhos.

Adicionalmente, as leveduras foram propostas como indicadores de poluição (SIMARD, 1971), devido a sua associação com a degradação bacteriana de matéria orgânica e a presença de fezes de animais de sangue quente (AHEARN, 1973). Outros pesquisadores, no Brasil, sugeriram o emprego de leveduras como indicadores de poluição orgânica e do nível de eutrofização de águas continentais, estuarinas e marinhas (PAULA, 1978, 1983; PURCHIO *et al.*, 1988). Faraco e Faraco (1976) observaram associação entre maior densidade populacional e freqüências elevadas dos gêneros *Penicilium*, *Candida*, *Rhodotorula* e *Cephalosporium*. Dessa forma, além dos parâmetros tradicionais para caracterizar a qualidade da água, a quantificação das leveduras pode oferecer melhores alternativas para a avaliação da toxicidade e da poluição orgânica.

Hagler *et al.*, (1979) isolaram espécies de leveduras da água do mar poluída com resíduos domésticos no Rio de Janeiro. As espécies mais freqüentemente isoladas foram *Rhodotorula rubra* e *Candida krusei*, enquanto outros gêneros como *Candida*, *Torulopsis*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Hanseniaspora*, menos freqüente, também foram isolados. Os pesquisadores relataram a presença de *Candida*, *Rhodotorula* e *Trichosporon* como gêneros mais freqüentes isolados em águas de estuário poluído no Rio de Janeiro. A ocorrência de *Trichosporon* spp., sobretudo *T. cutaneum*, em sedimento dessas áreas pode estar relacionada com a poluição (HAGLER e MENDONÇA-HAGLER, 1981, 1986, 1987). Porém, espécies desse gênero têm sido encontradas em substratos como madeira, solo, areia de praia e água do mar (HURLEY *et al.*, 1987).

Paula *et al.* (1983) isolaram leveduras de praias da região Sul, do Estado de São Paulo, em um total de 500 colônias de leveduras, distribuídas em 9 gêneros: *Candida*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Pichia* e *Sporobolomyces*.

As leveduras, em águas poluídas do mar de regiões do Brasil, são tipicamente dominadas por espécies que estão associadas com os hospedeiros. As espécies mais importantes são *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. intermédia*, *C. krusei*, *Trichosporon cutaneum*, e *Saccharomyces cerevisiae* (HAGLER *et al.*, 1986).

2.4.1 Leveduras do gênero *Trichosporon*

O gênero *Trichosporon* foi reconhecido em 1890, caracterizando alguns fungos patogênicos causadores de micoses superficiais em humanos, cuja denominação *Trichos* significa pêlos e *sporon*, esporos. O gênero e a espécie *Trichosporon beigelli*, foi descrito originalmente a partir da observação clínica de pacientes com nódulos em cabelos e pêlos. Durante anos, as micoses superficiais foram consideradas pouco importantes na micologia médica. *T. beigelli* era considerado um fungo saprófita ambiental, apenas encontrado como agente de piedra branca, no entanto, a primeira publicação de infecção sistêmica causada por *Trichosporon* spp. foi descrita em 1970 (WATSON E KALLICHURUM, 1970). Piedra branca é uma infecção fúngica crônica, da cutícula do pêlo, rara, descrita originalmente por Beigel, em 1865 (ZAITZ, 1998).

Devido à pouca importância das micoses superficiais, foi estabelecida uma drástica simplificação do gênero para somente duas espécies com relevância clínica, considerados sinônimos e usados rotineiramente: *Trichosporon beigelli*, adotado por clínicos; e *Trichosporon cutaneum*, preferido por micologistas ambientais (GUÉHO, DE HOOG, SMITH, 1992).

Até recentemente, a maioria dos *Trichosporon* isolados em humanos eram classificados como *T. beigellii* ou *T. cutaneum*. O *Trichosporon beigellii* é um fungo raro, que pode ser encontrado colonizando humanos, mas também pode causar infecções superficiais e profundas. Pelas controvérsias da nomenclatura, foi proposta uma revisão taxonômica das espécies de *Trichosporon* (GUÉHO *et al.*, 1992). Subseqüentemente, Sugita *et al.* (1999) expandiram a proposta reconhecendo, a partir de estudos moleculares, seis espécies implicadas em várias infecções em humanos. Destes, *T. asahii* e *T. mucoides* estão envolvidos em infecções profundas enquanto *T. asteróides*,

T. ovóides e *T. cutaneum* são responsáveis por piedra branca e outras infecções superficiais. A espécie, *T. inkin*, é responsável tanto por infecções superficiais como profundas. Recentemente, Moylett e colaboradores, 2003, relataram casos de infecção por *T. pullulans* em pacientes com doenças granulomatosas e revisaram cinco casos adicionais na literatura.

O nome *T. beigeli*, amplamente utilizado na literatura, foi descaracterizado já que não houve descrição adequada ou cultura com identificação precisa dessa espécie. Acredita-se que a maioria dos casos de infecção por *Trichosporon*, atribuídos à priori ao *T. beigeli* e *T. cutaneum*, foram provavelmente causados por *T. asahii* (GUÉHO, 1994).

Por meio de estudos recentes sobre a seqüência do RNAr, subunidade 26-S e reassociações de DNA, pesquisadores do Instituto Pasteur (Paris) reconheceram 19 taxos distintos para o gênero *Trichosporon* (GUÉHO *et al.*, 1992), sendo 13 deles considerados predominantemente saprofíticos (*T. aquatile*, *T. bassicae*, *T. cerebriforme*, *T. dulciturum*, *T. faecale*, *T. gracile*, *T. jiroveci*, *T. laibachi*, *T. loubieri*, *T. moniliforme*, *T. montevideense*, *T. pullulans* e *T. sporotricoides*); e seis espécies mais comuns implicadas em doenças humanas: *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. cutaneum*, *T. inkin*, *T. mucoides* e *T. ovoides* (GUÉHO *et al.*, 1992; GUÉHO *et al.*, 1994). Entretanto, uma nova espécie tem sido associada à infecção humana: *T. jirovecii* (RODRIGUES-TUDELA *et al.*, 2005). Enquanto *T. domesticum* e *T. montevideense* têm sido mais especificamente associada à doença alérgica (Summer-type hypersensitivity pneumonitis) (LI *et al.*, 2005; NISHIURA *et al.*, 1997), infecções por *GUÉHOmyces pullulans*, forma *T. pullulans* (KUNOVÁ *et al.*, 1996; LESTINI *et al.*, 2006; SHIGEHARA *et al.*, 1991) e *T. loubieri* também têm sido reportadas (MARTY *et al.*, 2003; PADHYE *et al.*, 2003).

Atualmente, estão sendo descritas 37 espécies do gênero *Trichosporon* behrend, divididas em 4 grupos: *T. gracile*, *T. cutaneum*, *T. porosum* e *T. ovoides* (MIDDELHOVEN *et al.*, 2004).

2.4.1.1 Patogenicidade do gênero *Trichosporon*

De Hoog (1996) estabeleceu uma classificação para o risco de infecções fúngicas em seres humanos e animais. Assim, *Trichosporon asahii*, *T. cutaneum*, *T. inkin*, *T. mucoides* e *T. ovoides* são consideradas espécies que essencialmente ocupam nichos ecológicos não-vertebrados, possuem habilidade relativamente pronunciada de sobreviver em tecidos de organismos vertebrados, e são capazes de desenvolver micoses: oportunistas, superficiais e profundas (DE HOOG, 1996).

As espécies de *Trichosporon* estão associadas a um amplo espectro de infecções, incluindo, na maioria das vezes, lesões superficiais benignas como piedra branca, predominantemente causada por *T. inkin* (em pêlos pubianos) e por *T. ovoides* (em cabelos) ou infecções cutâneas superficiais, cujas espécies mais isoladas são *T. cutaneum* e *T. asteroides*. Podem causar ainda infecções invasivas em que os agentes mais associados são *T. asahii*, seguido de *T. mucoides*, ressaltando-se a predominância de *T. asahii* (SUGITA *et al.*, 1995).

Quadros graves com alta mortalidade são tradicionalmente descritos em pacientes neutropênicos com câncer, que recebem quimioterapia ou corticosteróides, transplantados ou portadores de neoplasia; com hemocromatose, com próteses valvulares ou dispositivos intravenosos, ou com AIDS (WALSH, 1996; NESS e WOOD, 1989; LEAFH, 1989; SUGITA *et al.*, 2001).

A doença invasiva causada por *Trichosporon* spp., em especial *T. asahii*, é quase exclusivamente encontrada em pacientes imunocomprometidos. Os principais fatores de risco são: neutropenia (geralmente resultado de doenças hematológicas ou uso de quimioterapia em câncer), uso de válvula cardíaca, corticosteróides, cateteres intravenosos, queimaduras (FINKESKSTEIN *et al.*, 1989; MARTINEZ LACASA *et al.*, 1991; WALSH *et al.*, 1993).

No Japão, diversos autores têm documentado que *T. asahii* pode causar quadros de pneumonia alérgica (THÉRIZOL-FERLEY *et al.*, 1994; KATAOKA-NISHIMURA, *et al.*, 1998; NISHIURA, *et al.*, 1997; YOO, *et al.*, 1997; GROLL, WALSH, 2001). Duas espécies emergentes também relacionadas a infecções, habitualmente superficiais em

humanos têm sido descritas na literatura: *Trichosporon pullulans* e *Trichosporon loubieri* (LASCAUX, *et al.*, 1998; KRCMERY, *et al.*, 1999; PADHYE, *et al.*, 2003).

A piedra branca é descrita como uma micose superficial e benigna que se caracteriza pela presença de nódulos irregulares, de cor branca ou marrom, ao longo dos pêlos da barba, bigode, axilas e genitálias e cabelos acometidos (ARÊA LEÃO, 1940; THÉRIZOL – FERLEY *et al.*, 1994; KATAOKA-NISHIMURA, *et al.*, 1998; GROLL, WALSH, 2001).

A piedra branca tem distribuição universal, com predileção por regiões temperadas e tropicais. No Brasil é alta sua freqüência na Região Norte. Afeta indivíduos de ambos os sexos e pode comprometer qualquer faixa etária (ZAITZ, 1998, TALHARI, 1995; GUIDELINES, 1996). Estudos realizados relatam que a piedra branca não está relacionada à falta de higiene ou a baixo padrão socioeconômico e não ocorre por transmissão sexual (ZAITZ *et al.*, 1998; TALHARI *et al.*, 1995; PONTES *et al.*, 2002).

Das 37 espécies descritas, sete espécies foram associadas às infecções humanas: *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. cutaneum*, *T. inkin*, *T. jirovecii*, *T. mucoides*, e *T. ovóides* (RODRIGUES-TUDELA, 2005). Entretanto, são ainda necessários mais estudos clínicos e epidemiológicos para que seja possível melhor caracterizar a epidemiologia desses agentes emergentes de infecção oportunista.

2.4.1.2 Ecologia de *Trichosporon* spp.

Leveduras do gênero *Trichosporon* estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontrados predominantemente em zonas tropicais e temperadas (WOOLLETT E HENDRICK, 1970). O gênero compreende inúmeras espécies que habitam diferentes nichos ecológicos na natureza. *Trichosporon* spp. são leveduras encontradas no solo, água, ar. Algumas espécies fazem parte da microbiota normal humana, do epitélio da boca, pele, especialmente da região perigenital e unhas (ELLNER *et al.*, 1993). Já foi relatado seu isolamento em amostras de estrume de morcegos, obtidas em cavernas

(SUGITA *et al.*, 2005), também já foi encontrado em pelame de alguns mamíferos, como macacos, cavalos (KAPLAN, 1959).

Sugita *et al.* (2000), consideram *T. asahii* como um microrganismo comum na natureza.

2.5 CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Trichosporon*

A classificação e identificação dos fungos estão baseadas principalmente nos caracteres macro e micromorfológicos, assim como no método de reprodução sexual do organismo isolado. O processo de identificação de leveduras inclui testes bioquímicos, fisiológicos e de biologia molecular.

2.5.1 Caracterização fenotípica

2.5.1.1 Pureza dos isolados

As colônias de leveduras, independentemente da amostra, só devem ser identificadas, quando estiverem puras, ou seja, sem contaminação bacteriana ou em mistura de espécies. Para tanto, deve ser realizado o plaqueamento de cada colônia morfológicamente distinta e confirmada sua pureza, por microscopia. De cada colônia deve ser feito um repique em Agar Sabouraud Dextrose para sua identificação (KURTZMAN, 1998).

2.5.1.2 Caracterização micromorfológica

As espécies de *Trichosporon* se caracterizam pela presença de hifas, pseudo-hifas, blastoconídios e artroconídios, com algumas variações. As leveduras se desenvolvem bem em meio de cultivo Agar Sabouraud Dextrose e as colônias variam de cor, bege, às vezes com indulto branco, úmidas ou secas, podendo ser lisas, cerebriformes ou radiadas. Morfotipos de aspecto rugoso ou pulverulento têm sido

descritos (WALSH *et al.*, 1993). O achado de células leveduriformes, hifas apresentando septo, pseudohifas, hifas verdadeiras, artroconídios no material clínico é indicador presuntivo de *Trichosporon* spp., o que deve ser confirmado pela morfologia *in vitro* e testes fisiológicos (LACAZ *et al.*, 2002).

Muitos isolados de infecções disseminadas têm demonstrado morfotipos distintos em ágar Sabouraud dextrose, como, aparência rugosa ou pulverulenta e coloração acinzentada (WALSH *et al.*, 1986).

2.5.1.3 Caracterização macromorfológica em Agar Sabouraud Dextrose e CHROMagar Candida

Os isolados de leveduras são cultivados em placas contendo Agar Sabouraud Dextrose para uma avaliação do crescimento e morfologia das macrocolônias, na busca de uma diferenciação das espécies. São observadas as características macroscópicas como cor, consistência, superfície, bordas, aspecto cerebriforme (SUGITA, 2002).

Nos últimos anos, diferentes meios cromógenos de cultura, com capacidade de diferenciar leveduras de interesse clínico, têm sido comercializados. Esses meios têm como fundamento a alteração na cor desenvolvida pelas colônias por meio de indicadores de pH e fermentação de compostos específicos ou substratos cromógenos (CARRILLO-MUNÓZ, 2001; COOKE, 2002).

O meio de cultura CHROMagar tem sido utilizado para isolar e identificar presuntivamente o gênero *Candida* e outras leveduras (SULLIVAN, 1995; 1998). Este meio se baseia na utilização do substrato β -glicosaminidase (COOKE *et al.*, 2002; QUINDÓS *et al.*, 2001) e diferencia as leveduras, de acordo com a morfologia e a cor das colônias (CARRILLO-MUNÓZ *et al.*, 2001; FOTEDAR *et al.*, 2002). Possui a particularidade de ter uma mistura de substratos cromogêneos, cada um deles dirigido a um sistema enzimático específico de cada espécie, resultando que cada espécie apresentará uma cor típica diferente, conforme descrita: *C. albicans*, verde; *C. glabrata*, rosa/roxo; *C. tropicalis*, azul; *S. cerevisiae*, roxo; *C. neoformans*, creme sujo; *Trichosporon* spp., azul/acinzentado.

2.5.1.4 Urease

Ureases são metaloenzimas que hidrolisam uréia para produzir amônia e dióxido de carbono. Estas enzimas, que são amplamente encontradas em fungos, bactérias e plantas, compartilham de estruturas similares. A presença de urease em várias bactérias patogênicas (*Helicobacter pylori* e *Proteus mirabilis*, p.e) está fortemente correlacionada com a patogênese em doenças humanas. Muitos fungos de importância médica possuem atividade ureásica, entre eles, citam-se: *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii*, e espécies de *Trichosporon* e *Aspergillus*. (CASADEVALL e PERFECT 1998, STEENBERGEN e CASADEVALL, 2003). A literatura científica evidencia que a atividade da urease é um fator de virulência importante em vários patógenos humanos e foi detectada em vários fungos de importância médica, como os gêneros *Aspergillus*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Cryptococcus* e *Coccidioides* (COX *et al.*, 2000).

Essa enzima promove a hidrólise da uréia à amônia e carbamato, mudando o pH do local assim como no interior dos fagolisossomos, favorecendo a sua sobrevivência no organismo do hospedeiro (CASADEVALL e PERFECT, 1998; STEENBERGEN e CASADEVALL, 2003).

2.5.1.5 Teste de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio - Auxanograma

O teste de assimilação de carboidratos indica a habilidade de uma levedura para utilizar um composto na presença de oxigênio. Essas provas são muito sensíveis e úteis para a identificação das leveduras e estão condicionados a fatores de permeabilidade, sistemas enzimáticos que catalisam a degradação dos hidratos de carbono e ao sistema redutase, que intervêm na redução do nitrato (LACAZ, 1984).

Essa técnica baseia-se na capacidade das leveduras utilizarem determinado carboidrato como única fonte de carbono, para sua viabilidade celular. Desta forma utiliza-se, nessa técnica, um meio basal destituído de qualquer fonte de carbono (sem o qual a célula fúngica não pode crescer), pois será semeada a levedura que se deseja

identificar. (LACAZ, 1984). Após a sementeira, adiciona-se ao cultivo um carboidrato e observa-se a capacidade de utilização deste como fonte de carbono. Quando o carboidrato é assimilado pela levedura, percebe-se crescimento desta ao redor da fonte de carbono (LACAZ, 1984).

A assimilação de fonte de nitrogênio é feita de acordo com a técnica, utilizando um meio basal destituído de qualquer fonte de nitrogênio. Assim, quando ocorre a assimilação da fonte de nitrogênio, pode-se observar o crescimento ao redor dela, demonstrando a capacidade que algumas leveduras apresentam de assimilar nitrato de potássio (nitrogênio inorgânico), como única fonte de nitrogênio de sua viabilidade biológica (LACAZ, 1984).

2.5.1.6 Tolerância a cicloheximida

O meio com cicloheximida pode ajudar à identificação, uma vez que permite selecionar as leveduras resistentes a esse composto. Este é um meio bastante utilizado e não se destina apenas a leveduras patogênicas (De HOOG, 2000).

2.5.1.7 Identificação semi-automatizada ID 32C (BioMérieux)

O API ID 32 C é um sistema padronizado para identificação de leveduras, com 32 testes de assimilação de açúcares miniaturizados e uma base de dados. A metodologia não descarta a necessidade de provas adicionais de macro e micromorfologia. É um método que utiliza codificação para as provas bioquímicas, dessa forma, pode-se resultar em identificações inconsistentes (FRICKER-HIDALGO, *et al.*, 1996; RAMANI, *et al.*, 1998).

Na galeria, ID 32 C, cada uma das 32 cúpulas contém os seguintes substratos, sob forma desidratada: D-Galactose, D-Sacarose, N-Acetil-Glucosamina, ácido Lático, L-Arabinose, D-Celobiose, D-Rafinose, D-Maltose, D-Trealose, 2-acetatoGluconato de potássio, α -metil-D-Glucopiranosida, D-Manitol, D-Lactose, Inositol, D-Sorbitol, D-Xilose, D-Ribose, Glicerol, L-Ramonose, Palatinose, Eritritol, D-Melibiose, Glucuronato

de sódio, D-Melezitose, Gluconato de potássio, ácido levulínico, D-Glucose, L-Sorbose, Glucosamina, Esculina, cicloheximida, e uma cúpula com nenhum substrato.

2.5.1.8 Produção de enzimas extracelulares

A capacidade de um fungo causar danos ao seu hospedeiro pode estar relacionada a inúmeros fatores: alguns desses estão diretamente associados com o estado geral de integridade do hospedeiro, enquanto outros, estão mais comumente relacionados às características fisiológicas e bioquímicas dos próprios agentes microbianos (NAGLIK *et al.*, 2004).

Para sobreviver em novos ambientes, os microrganismos precisam resistir a altas temperaturas, às influências hormonais e ao ataque das células do sistema imune. Os fatores associados à virulência auxiliam na aderência, colonização, disseminação e habilidade do fungo para resistir a esses ambientes hostis e escapar dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro (KUROKAWA *et al.*, 1998).

Os fungos possuem amplo repertório enzimático que permite a metabolização das fontes nutricionais primárias existentes no meio ambiente, desde quando esses microrganismos ainda desempenhavam apenas papel saprófito. A evolução proporcionou que esse complexo enzimático contribuísse com os fungos no estabelecimento do parasitismo de hospedeiros, funcionando como importante fator associado à virulência dessas espécies (GÁCSEK *et al.*, 2007).

O estudo da atividade enzimática extracelular contribuiu muito para o esclarecimento de muitos aspectos relacionados com a ecologia e a patogenicidade dos fungos. Esses aspectos foram muito bem estudados no gênero *Candida*, levedura considerada a mais importante em infecções superficiais e invasivas em seres humanos suscetíveis. No entanto, a pesquisa da atividade de exoenzimas com *Basidiomycetes*, como os do gênero *Malassezia* e *Trichosporon*, foi pouco estudada (COUTINHO; PAULA, 2000; NAGLIK *et al.*, 2004; ICHIKAWA *et al.*, 2004).

O termo produção de enzimas é entendido como síntese e atividade da enzima pelos fungos num determinado meio. Assim, algumas leveduras produzem um grande

número de enzimas, enquanto outras produzem poucas, sob as mesmas condições de teste (HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975).

A atividade enzimática pode variar de acordo com a espécie de fungo (MÜHSIN, 2000). As diferentes expressões enzimáticas podem estar relacionadas com o aspecto ecológico (antropofílico, zoofílico e geofílico), uma vez que a adaptação paulatina do solo, para o homem e outros animais, envolveu também adequação nutricional (PHILPOT, 1977; SIMPANYA, 1996; MÜHSIN, 2000).

Muitos são os fatores associados à virulência inerente aos *Trichosporon* spp., tais como: DNAses, Lipases, Queratinases, Fosfolipase, Proteinase, Uréase, Toxinas “Killer” e B-N-Acetilhexosaminidase, podendo ser secretadas para o meio de cultura durante o crescimento no substrato (TRABULSI *et al.*, 2004; ABDEL-RAHMAN, 2000).

Estudos de fatores associados à virulência do microrganismo são fundamentais para o conhecimento da patogênese das infecções, podendo abrir caminhos para novas estratégias no desenvolvimento de fármacos e controle de doenças.

2.5.1.8.1 Proteinase

As proteinases contribuem para a virulência do microrganismo por destruírem proteínas do hospedeiro, que causam dano tecidual ou vasodilatação crescente, e, provavelmente fornecem nutrientes para o patógeno, fazendo com que ocorra a invasão e disseminação dos fungos nos tecidos do hospedeiro. As proteinases atuam por meio da degradação de proteínas, como colágeno, elastina, fibrinogênio e, principalmente, de proteínas imunologicamente importantes, como imunoglobulinas e fatores do complemento. Desta forma podem interferir com os mecanismos de defesa do hospedeiro, por meio da destruição dessas proteínas envolvidas no sistema imune (AOKI *et al.*, 1994; CHEN *et al.*, 1996; CASADEVALL; PERFECT, 1998).

Proteases são bastante estudadas e estão envolvidas em infecções fúngicas (WEITZMAN, 1995; SIMPANYA, 1996; MAIA *et al.*, 2001; ABDEL-RAHMAN, 2002). Entretanto, outros autores não reconhecem a participação dessa enzima no processo de infecções fúngicas, pois alguns fungos não produtores de tais enzimas foram

isolados de dermatomicoses; enquanto outros que a produzem, não causam a doença (ABDEL-GAWAD, 1997; LACAZ *et al.*, 2002; MÜHSIN, 1998).

2.5.1.8.2 Fosfolipase

Fosfolipases são enzimas hidrolíticas produzidas por várias bactérias e fungos que degradam os fosfolípidos em quatro sítios diferentes, dependem da ação da enzima sobre o substrato. São encontradas fazendo parte da estrutura da membrana celular de animais, plantas e células de microrganismos (PRICE e CAWSON, 1977; (ROSE e HARRISON, 1987; LACAZ *et al.*, 1991; KWON-CHUNG e BENNET, 1992; LEHNINGER, 1993; HANEL *et al.*, 1995; IBRAHIM *et al.*, 1995; CHEN *et al.*, 1997; STRYER, 2001).

A fosfolipase é um fator associado à virulência que está relacionado à sua capacidade de desestabilizar as células epiteliais e endoteliais, por meio da hidrólise das ligações – ester em glicerofosfolípidos na bicamada lipídica da membrana celular – permitindo a penetração do microrganismo nos tecidos do hospedeiro. É utilizada para estabelecer biotipos de leveduras. Entretanto, a fosfolipase pode expressar, teoricamente, aspectos relacionados com fatores associados à virulência em espécies de *Trichosporon* (GHANNOUM, 2000).

Várias leveduras de importância médica secretam uma proteinase, que é sugerida como fator de virulência. A enzima fosfolipase parece não atuar como fator de virulência específico; porém, está envolvida com a propagação da levedura no hospedeiro, causando conseqüentemente um processo invasivo, por meio da degradação da pele ou mucoso (SAMARANAYAKE *et al.*, 1984; RUCHEL *et al.*, 1986; HOMMA *et al.*, 1992).

2.5.1.8.3 Lipase

As lípases extracelulares também são citadas pela presença durante a infecção (OGAWA *et al.*, 1998). Acredita-se que as lipases auxiliam os fungos a superar a ação

dos ácidos graxos fungistático, presentes na pele, colaborando para a virulência nesse grupo de microrganismos (PAPINI, 1995; TRABULSI *et al.*, 2004).

2.5.1.8.4 DNase

Baseia-se na degradação do DNA pela ação da enzima DNase, produzida pelo microrganismo. Essa hidrolisa ácido desoxirribonucléico, contido no meio de cultura, após um período de incubação. Posteriormente este meio é acidificado com HCl 1N que, por sua vez, provoca a precipitação do DNA polimerizado, tornando o meio opaco. Os organismos que degradam o DNA produzem uma zona transparente em volta da área de crescimento, o que provoca a revelação da prova (JEFFRIES, 1957).

2.5.1.9 Teste de sensibilidade a antifúngicos (Difusão em Agar por E-test®)

2.5.1.9.1 Teste piloto

2.5.1.9.2 Antifungigrama

Os estudos de sensibilidade a antifúngicos têm despertado grande interesse na comunidade científica principalmente pelo aumento da frequência de infecções fúngicas e a síntese de novas drogas. A elevada taxa de mortalidade tem aumentado a busca por tratamentos cada vez mais eficazes e drogas cada vez mais seguras (GARCIA-MARTOS *et al.*, 2001).

A avaliação da eficácia de um determinado antifúngico pode ser realizada *in vitro*, por meio de testes de sensibilidade que visam identificar amostras resistentes. Os resultados dos testes de sensibilidade a antifúngicos podem ser reportados tanto de modo qualitativo (observando sensibilidade, sensibilidade dose dependente, intermediário, resistente) ou quantitativo (valores da Concentração Inibitória Mínima - CIM). O método quantitativo permite estimativas mais precisas do efeito antifúngico e uma maior flexibilidade na sua aplicação.

A quantidade de fármacos disponíveis para o tratamento das infecções fúngicas é relativamente limitada, o que configura preocupação para clínicos e microbiologistas envolvidos, principalmente, com o controle dos processos micóticos invasivos. Os polienos, em seu maior representante, anfotericina B; e, os azóis, de primeira e segunda geração (cetoconazol, fluconazol e itraconazol), há muitos anos têm sido as drogas de primeira escolha na terapia antifúngica. A anfotericina B é um antibiótico fungicida de largo espectro, mas seus efeitos adversos restringem seu emprego. Já os azóis, são compostos sintéticos de toxicidade reduzida que podem apresentar ação fungicida ou fungistática, mas sua potência é menor do que aquela apresentada pela anfotericina B. O uso freqüente dos azóis na terapia e profilaxia das infecções fúngicas invasivas promoveu o surgimento de resistência em espécies suscetíveis. Para esses casos, o surgimento de novos protocolos terapêuticos que empreguem compostos azólicos modernos como triazólicos (voriconazol, posaconazol e ravuconazol) e as equinocandinas (caspofungina) podem representar uma alternativa eficaz (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004).

O CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), centro de referência mundial em testes de sensibilidade, vem propondo desde a década de 1990 a padronização de novos testes para leveduras na tentativa de proporcionar resultados mais rápidos, reprodutíveis e seguros para portadores de infecções de alto risco. A publicação do documento M27-A, em 1997, confirmou esse empenho, sugerindo testes para alguns agentes fúngicos emergentes (CLSI, 1997). No entanto, é importante considerar que esses testes ainda são submetidos a trabalhos de pesquisa comparativos, uma vez que o estabelecimento da CIM (Concentração inibitória mínima) depende de inúmeras variáveis, tais como quantidade de inóculo e tempo de incubação, por exemplo (MARR *et al.*, 1999).

As técnicas empregadas para os testes *in vitro*, de suscetibilidade a antifúngicos, são bastante variadas e compreendem: diluição em meio líquido (macro e/ou microdiluição); diluição em meio sólido e difusão em meio sólido (discos e fitas), todos submetidos a avaliações criteriosas que tenham o objetivo de obter máxima eficiência nos testes. O E-test® constitui um método prático e rápido que emprega fitas adsorvidas com antifúngico em várias concentrações que se difundem

proporcionalmente, quando colocadas em placas contendo meio sólido. Esse método alternativo proporciona resultados, qualitativos, determinados pela intersecção entre as linhas do halo de inibição e linha indicativa da concentração da droga expressa na fita (ESPINEL-INGROFF *et al.*, 1992).

2.5.2 Caracterização Molecular

O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular tem permitido, na última década, o emprego de marcadores moleculares, gerando grande número de estudos sobre tipagem, identificação, classificação e ecologia de microrganismos. Isso possibilitou o aumento da resolução taxonômica e investigações epidemiológicas, e esclareceu surtos hospitalares, principalmente em nível de linhagem (GUILLAMÓN *et al.*, 1998; MONTROCHER *et al.*, 1998; PEREZ *et al.*, 2001).

Tendo em vista as limitações na acurácia de identificação por métodos fenotípicos para algumas espécies de leveduras emergentes, técnicas moleculares de identificação passam a constituir a ferramenta diagnóstica mais acurada. Como exemplo, há a identificação de *Candida dubliniensis*, *Candida orthopsilosis*, *Candida metapsilosis* e isolados de *Trichosporon* spp., baseados em PCR ou seqüenciamento de região conservada de DNA da levedura, constituem os métodos de eleição para sua confirmação de espécie (COLOMBO, 2007). Vale mencionar que por questões de custo e disponibilidade de pessoal qualificado para a realização desses ensaios; provas moleculares não constituem ferramenta diagnóstica na rotina da maioria absoluta de centros médicos e laboratórios no Brasil (COLOMBO, 2007).

A escolha da técnica mais adequada, ou a sua utilização de maneira combinada, deve levar em conta o poder de tipagem, a reprodutibilidade e discriminação, bem como o tipo de microrganismo, facilidade de interpretação dos resultados, complexidade de execução da metodologia, e ainda, tempo e custo das análises (ALEXANDER, 2002). Os métodos correntemente utilizados na caracterização de leveduras incluem o polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP – “*Restriction Fragment Length Polymorphism*”) com hibridização (Southern Blot) ou amplificação

(AFLP – “*Amplified Fragment Length Polymorphism*”), cariotipagem em gel de eletroforese em campo pulsátil (PFGE – “*Pulsed Field Gel Electrophoresis*”) e técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) (BALAJEE *et al.*, 2007; DASSANAYAKE e SAMARANAYAKE, 2003; GIL-LAMAIGNERE, 2003; TROST *et al.*, 2004). Outras provas moleculares aplicadas à identificação de leveduras são os microarranjos de DNA, tipagem por sequenciamento de *multilocus* (MLST – “*Multi Locus Sequence Typing*”), ensaio de mobilidade de heteroduplex (HMA – “*Heteroduplex Mobility Assay*”), polimorfismo de conformação de fita simples (SSCP-PCR – “*Single Strand Conformation Polymorphism*”) e reação em cadeia pela polimerase usando iniciadores multiplex (*Multiplex-PCR*) (GIL-LAMAIGNERE, 2003; MARKOULATOS *et al.*, 2002; ODDS e JACOBSEN, 2008; RAMOS *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2008; YAN *et al.*, 2008).

O uso de métodos de biologia molecular tem alterado a taxonomia do gênero *Trichosporon*, de forma significativa nesses últimos anos (GUÉHO, *et al.*, 1992; SUGITA, *et al.*, 1994).

2.5.2.1 Identificação do gênero *Trichosporon* spp. pela Reação em Cadeia pela polimerase (PCR)

Os métodos moleculares, baseados em ácidos nucleicos e PCR, têm sido empregados de forma confiável, simples e de baixo custo para identificar e classificar os microrganismos. Essas técnicas consomem menos tempo que as extensas análises fenotípicas e proporcionam resultados mais reprodutíveis (RADEMAKER *et al.*, 2004).

Uma variedade de iniciadores tem sido utilizados para a identificação de microrganismos e envolve a comparação de padrões que refletem um relacionamento molecular e são gerados a partir de alguma forma de eletroforese e interpretados por meio de colorações para DNA (GIL-LAMAIGNERE, 2003). A capacidade de identificar a mesma cepa em diferentes amostras, distinguir cepas não relacionadas geneticamente e demonstrar a distância filogenética entre cepas e espécies são características pontuais (LINTON *et al.*, 2007; PFALLER, 2000).

Sugita, em 1998b, descreve um método rápido PCR, de detecção de todas as espécies do gênero *Trichosporon*, incluindo os agentes causadores de Tricosporonose. O mesmo foi validado testando 68 cepas de leveduras de importância médica, principalmente dos gêneros *Trichosporon*. Assim, descreve, uma árvore filogenética para as espécies do gênero, construídas a partir de nucleotídeos da subunidade menor (“small subunit” – “SSU”) e da subunidade maior (“large subunit” – “LSU”) do rDNA (DNA ribossomal). Para tal, foram alinhadas seqüências da região SSU do rDNA de leveduras patogênicas, obtidas de bibliotecas de DNA. Os oligonucleotídios TRF (5’ – AGA GGC CTA CCA TGG TAT CA – 3’) e TRR (5’ – TAA GAC CCA ATA GAG CCC TA – 3’), que amplificam parte da região SSU do rDNA, foram utilizados para a identificação do gênero *Trichosporon*, já que estes oligonucleotídios não hibridizam em regiões conservadas do gene ribossômico de outras leveduras de importância médica (SUGITA *et al.*, 2002).

2.5.2.2 Caracterização Molecular pela técnica de BOX-PCR

Dentre as sequências repetitivas conhecidas atualmente, três delas têm sido utilizadas com maior frequência para a caracterização genotípica de isolados de origem clínica e ambiental: REP (*Repetitive Extragenic Palindromic Sequence*), ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) e BOX (*Invertedly Repeated Elements*) (BINDE *et al.*, 2009; deBRUIJN, 1992; DOMBEK *et al.*, 2000; ISHII e SADOWSKY, 2009; LUPSKI e WEINSTOCK, 1992; MENNA *et al.*, 2009; RIVERA *et al.*, 1995; SOUZA, 2007; ZO *et al.*, 2002).

As seqüências REP, ERIC e BOX possuem respectivamente, 35-40 pares de bases (pb), 124-127 pb e 154 pb e, ainda permanece desconhecida a função desses elementos dentro do genoma dos microrganismos (de BRUIJN, 1992; KOEUTH *et al.*, 1995; LUPSKI e WEINSTOCK, 1992). Para cada seqüência, são utilizados iniciadores específicos (*primers*) que, após o processo de amplificação pela técnica de PCR, resulta em produtos de amplificação de DNA de variados tamanhos. Esses produtos de PCR são visualizados em gel de agarose e mostram o perfil genômico (*fingerprints*) da

cepa de interesse. O perfil obtido, por essa técnica, pode ser específico para cada cepa, podendo assim diferenciar um microrganismo de outro (LOUWS *et al.*, 1996; KOEUTH *et al.*, 1995; RADEMAKER e De BRUIJN, 1997; VERSALOVIC *et al.*, 1998).

2.5.2.3 Sequenciamento

Alguns autores sugerem que a comparação direta de seqüências de nucleotídeos possa ser um método objetivo para a resolução dos problemas de taxonomia e identificação fenotípica de espécies de *Trichosporon*. Para esse tipo de abordagem as seqüências mais conservadas e espécies-específicas são representadas por genes ribossomais. Estes genes têm regiões muito conservadas, alternadas por regiões variáveis, ideais para comparações intraespecífica e interespecífica (SUGITA *et al.*, 1997, 1998; GUARRO *et al.*, 1999).

Vale ressaltar que o rDNA tem regiões altamente conservadas, que servem de pontos de referência para estudos de divergências evolutivas, alternadas com regiões variáveis. O rDNA é subdividido em pelo menos 3 subunidades (5,8S, 18S e 25S), transcritas com os espaçadores, internos e externos (ITS e ETS), os quais são removidos posteriormente para formar os ribossomos. Além dessas regiões transcritas, espaçadores intergênicos (NTS ou IGS) que separam as cópias em tandem nos cromossomos, que não são transcritas, também podem ser utilizadas. O 18S rDNA (chamado do SSU - small-subunit) tem sido mais utilizado para o estudo taxonômico de fungos filamentosos, enquanto que as regiões variáveis D1 e D2 do 25S rDNA (LSU – large-subunit) tem sido mais usadas para taxonomia de leveduras. Entretanto, essa padronização deve ser utilizada com cautela, pois fungos leveduriformes podem ser observados tanto nos grupos *Ascomycotina* como *Basidiomycotina*. O conteúdo de GC do DNA também tem sido utilizado para o estudo da taxonomia de fungos. Neste caso, embora estudos recentes mostrem que uma diferença de 1%, no conteúdo de GC, possa ser considerado um indicativo de que dois isolados pertençam a espécies diferentes, tem sido aceita 2% de diferença como valor básico (GUÉHO *et al.*, 1992).

Entretanto, em grupos cujas relações filogenéticas ainda não foram resolvidas, têm sido aceitos até 8% de diferença (BOEKHOUT, 1991).

Para a identificação das espécies de *Trichosporon*, Sugita *et al.*, (1999) analisaram as regiões dos genes espaçadores internos de transcrição (internal transcriber spacer – ITS1 e ITS2) de *Trichosporon* spp. por meio de seqüenciamento e classificaram 17 espécies e cinco variedades dentro do gênero *Trichosporon*.

Em 2002, Sugita *et al.*, analisaram a sequência da região espaçadora intergênica (intergenic spacer – IGS1), localizada entre os genes 26S e 5S do rDNA em 25 espécies de *Trichosporon*. A seqüência da região IGS1 variou em comprimento de 195 pares de bases (pb) a 704 pb. A análise comparativa das seqüências de nucleotídeos sugeriu que estas variações eram maiores na região IGS1 que as das regiões de ITS. Outros cinco diferentes genótipos de *T. asahii* foram dessa forma observados em 43 cepas da espécie. Observaram ainda que a maioria dos isolados do Japão fosse pertencentes ao genótipo 1 e as cepas originárias das Américas, incluindo duas cepas brasileiras, pertenciam ao genótipo 3 ou 5, confirmando a importância do método no estudo das relações filogenéticas. A utilização da região do rDNA para seqüenciamento é de grande importância como ferramenta diagnóstica e epidemiológica nas tricosporonoses, além dos estudos sobre filogenia.

2.6 CARACTERIZAÇÃO DAS ÁREAS DE ESTUDO

2.6.1 Canal de São Sebastião

O Canal de São Sebastião abriga inúmeras praias (42) intercaladas por costões rochosos. Está localizado no litoral Norte, do Estado de São Paulo, entre o continente e a Ilha de São Sebastião, sendo os limites Sul e Norte, definidos pela Ponta do Paúba e Ponta de Massaguaçu, no continente, bem como pela Ponta do Frade e Ponta do Pacuíba, na costa da Ilha de São Sebastião (CETESB, 1997). O Canal de São Sebastião possui uma área de 401 Km², ocupada em grande parte pela Mata Atlântica, e com cerca de 25 Km de comprimento e larguras de 7 Km ao Sul e 5,5Km do Norte.

A concentração urbana do município encontra-se voltada para o Canal de São Sebastião, onde se localiza a sede do município e o terminal Petrolífero da Petrobrás, sendo a principal fonte de renda para o município (CETESB, 2008).

A intensidade da movimentação petrolífera no Canal de São Sebastião explica o fato do litoral norte de São Paulo ser uma região com grande histórico de vazamentos de óleo. Os acidentes envolvendo diretamente o transporte marítimo (navios) atingiram a marca de 338 casos, no período de 1978 a 2007 (CETESB, 2007, 2008; POFFO, 2000).

Localizado a 200 Km do município de São Paulo, o porto de São Sebastião tem movimentado cerca de 400mil toneladas por ano, entre produtos de importação, produtos químicos e siderúrgicos, malte e cevada, produtos de exportação, produtos siderúrgicos, máquinas e equipamentos, cargas gerais e veículos (CETESB, 2008).

A população fixa do município é de aproximadamente 57.300 habitantes, com densidade demográfica de 143 hab./Km², incluindo a área do Parque estadual da Serra do Mar. Nos períodos de alta temporada, a população aumenta consideravelmente, podendo chegar a um número de 44.041 a mais (FUNDAÇÃO SISTEMA ESTADUAL DE ANÁLISE DE DADOS, 2004). Dessa maneira, altera a rotina local e a demanda do uso de água, coleta de esgoto e lixo (CETESB, 2008).

Quanto ao saneamento básico, o município de São Sebastião tem cinco estações de tratamento de esgoto e dois emissários submarinos, porém ainda insuficientes quando comparado à cobertura habitacional, que é de 36,5%.

2.6.2 Baixada Santista

A Baixada Santista está localizada na porção central do litoral paulista, ocupando uma área de 36 Km², estendendo de Ponta Grossa a Itaipu (Praia Grande) até o litoral da Ilha Santo Amaro no Guarujá, separada do continente pela Ilha de São Vicente e por larga zona de mangues, onde vários canais drenam as águas doces que se misturam com as águas do oceano (CETESB, 1985; FUNDESPA, 1999).

A região de Santos possui uma planície sedimentar, cuja altitude média de 2 metros acima do nível do mar sofre elevações mais ou menos isoladas, que permitem a sedimentação dos materiais transportados pelos rios advindos da encosta da Serra do Mar, ocorrendo assim a mistura dos materiais marinhos com a dos rios (JOLY, 1957). Os processos de sedimentação e circulação sofrem influência das ondas de maré, que transportam matéria orgânica estuarina em suspensão para as praias (CETESB, 1985), e também dos efeitos de tempestades que provocam aporte de areia.

Santos, destaca-se como um dos grandes centros urbanos brasileiros, ocupando posição central e sendo a maior cidade da zona Costeira. Está entre os dez mais populosos do Estado de São Paulo, com 417.000 mil habitantes e uma população flutuante nos meses de verão em torno de 78.116 pessoas (FUNDAÇÃO SEADE, 2004). Sua densidade demográfica é alta e se concentra na parte insular da região (CETESB, 2008), possuindo grande atividade econômica: pólo industrial em Cubatão, o porto de Santos, potencial turístico e recursos pesqueiros e naturais, provenientes dos mangues (ABESSA, 2005).

Com 7 Km de praias urbanizadas e sem acidentes geográficos, a orla marítima possui um grande jardim, considerado o maior jardim litorâneo do mundo. Assim a cidade se destaca pela infraestrutura urbana, considerada boa, o que difere da maioria das cidades litorâneas.

O grande crescimento populacional resultou em um processo de aglomeração urbana de forma desordenada, produzindo moradias em espaços que submeteram à população a situações de risco ambiental (YOUNG e FUSCO, 2006).

A Região Metropolitana da Baixada Santista foi instituída em 30 de julho de 1996, pela lei complementar nº 815. Em termos populacionais é a terceira maior do estado de São Paulo, com cerca de 1,7 milhões de habitantes (MUEHE, 2001).

Diante do crescimento populacional, resultou num total de 56.021 ligações de esgotos, atendendo perto de 95% dessa população da região. Foi necessária, ainda, a construção de sete canais de drenagem, da cidade para o mar, transformando-se na principal fonte de poluição fecal das praias. O Canal de Santos recebe a drenagem de outros municípios: Cubatão, Guarujá e Bertioga. É uma área intensamente impactada

pela sua atividade do Porto de Santos e parques industriais das regiões adjacentes, pelas indústrias COSIPA, Ultrafertil, Dow Químicas e adicional descarga de esgotos domiciliares (CETESB, 2008).

A baía de Santos recebe águas estuarinas de Santos e de São Vicente, resultando na mistura de água do mar com as águas continentais. Porém, nessa região há ocorrência de poluição causada pelo Porto de Santos e pelas indústrias da região de Cubatão que são carregadas até a baía pelo canal do porto. Além disso, também ocorre o despejo de esgotos domésticos tanto dos estuários como pelos emissários submarinos, localizado na praia José Menino, cuja saída do efluente está localizada a 4 Km da costa e no centro da baía, com capacidade para captar esgotos de uma população de até 1.322.100 pessoas, com vazão máxima de 7.267L/s, encontrado a uma profundidade próxima a 10 metros, tornando a região bastante impactada (CETESB, 2008).

Um agravante encontrado na Serra do Mar são as condições climáticas características da Baixada Santista, que é definida por um clima tropical quente úmido.

Os maiores índices pluviométricos são registrados nas costas mais altas da Serra (médias anuais em torno de 4.000mm), e os menores no sopé da escarpa (médias anuais em torno de 2.500 mm), aumentando a dinâmica dos processos erosivos nessa região (SANTOS, 2004).

2.6.3 Ubatuba

A região de Ubatuba localiza-se no litoral Norte, do Estado de São Paulo, com inúmeras praias e costões rochosos, formando planícies costeiras. (CETESB, 2004). Ubatuba é o maior município do litoral norte, tendo uma área de 711 km².

Possui uma população fixa de 64.778 habitantes e uma flutuante de 85.616 pessoas nos meses de alta temporada. As atividades econômicas estão voltadas ao turismo devido ao grande número de praias (78 praias e extensão de 53 Km) e pelas áreas preservadas de Mata Atlântica (FUNDAÇÃO SEADE, 2004). Ubatuba é a região

do estado de São Paulo que apresenta maior índice pluviométrico, tendo como médias mensais variações entre 88 mm em junho a 300 mm em fevereiro (CETESB, 2008).

A proximidade da Serra do Mar com o Oceano Atlântico faz com que a planície costeira seja estreita e os espigões avancem na costa apresentando pequenas enseadas, que por estar protegida do embate direto das ondas, são intensamente utilizadas como marina estadual, concentrando veleiros de várias partes do mundo, além de embarcações pesqueiras e uma Base do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. A área apresenta o único posto de abastecimento de combustíveis flutuante do Litoral Norte (CETESB, 2008).

O Saco da Ribeira é localizado no interior da Baía do Flamengo, trecho Sul do município de Ubatuba. Possui uma Marina Pier, que é pública e administrada pela Fundação Florestal, apresentando atividades como garagem náutica atracação para carga e descarga, pesca e transporte para o Parque Estadual da Ilha Anchieta, além de postos de abastecimento flutuantes para embarcações.

No Saco da Ribeira, a influência de água doce fica restrita aos riachos, e mesmo durante o período das chuvas, a circulação da água do mar garante rápida mistura de água doce afluyente (LOPES, 1983; SCHAEFFER–NOVELLI, 1976). Assim, a contribuição de elementos de origem terrestre, via influxo de rios, é muito pequena. No entanto, o maior carreamento sedimentar e detrítico ocorrem nas épocas de maior precipitação, dependendo assim da pluviosidade local (SASSI, 1978). Quanto ao saneamento básico, somente 22,8% da população têm rede de esgoto (CETESB, 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Quantificar leveduras, isolar e identificar leveduras do gênero *Trichosporon* de regiões costeiras do estado de São Paulo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar leveduras em amostras de água de mar e areia, coletadas de três regiões costeiras do estado de São Paulo: Canal de São Sebastião, Baixada Santista e Ubatuba, utilizando os meios de cultura agar Sabouroud dextrose e CHROMagar Candida;
- Caracterizar os três ecossistemas marinhos estudados, utilizando indicadores de contaminação fecal;
- Caracterizar fenotípica e genotipicamente leveduras do gênero *Trichosporon* spp. isoladas de amostras da água de mar e areia nas três regiões Costeiras do Estado de São Paulo;
- Caracterizar a diversidade molecular das espécies de *Trichosporon* spp. isoladas de amostras da água de mar e areia nas três regiões Costeiras do Estado de São Paulo, por meio do método BOX-PCR;
- Testar a susceptibilidade aos antifúngicos das leveduras previamente selecionadas que apresentam características similares às cepas clínicas padrões;
- Comparar os sistemas de identificação de *Trichosporon* spp., de isolados ambientais com cepas de origem clínicas.
- Relacionar a concentração e frequência de leveduras com os indicadores de contaminação fecal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAGEM

Dentro de uma área costeira com extensão de cerca de 880 Km, foram selecionadas três regiões no Estado de São Paulo para coleta de amostras de água de mar e areia: A) Canal de São Sebastião, B) Baixada Santista e C) Ubatuba (Figura 1).



Figura 2 Localização dos pontos de coleta de amostras nas regiões de Ubatuba, Canal de São Sebastião e Baixada Santista.

Fonte: Google Earth, adaptado por Almeida, B.

4.1.1 Período de coleta

No período de agosto de 2005 a março de 2007, foram coletadas amostras de água de mar e de areia, na região do Canal de São Sebastião. Na região da Baixada Santista e Ubatuba, foram coletadas amostras de água de mar e areia, mensalmente nos períodos de fevereiro a junho de 2006, e de janeiro a março de 2007.

4.1.2 Canal de São Sebastião

A região escolhida para realizar as coletas foi a porção sul do Canal de São Sebastião, nas proximidades da Ponta de Barequeçaba (Figura 2), tendo dois pontos de coletas de água do mar e dois pontos de coletas de areia.



Figura 2. Foto da região de São Sebastião – SP.

O ponto 1 (SS1 – Latitude $23^{\circ} 49' 50''$ S e Longitude $45^{\circ} 25' 20''$ W) fica próximo ao Cebimar e o Ponto 2 (SS2 – Latitude $23^{\circ} 49' 56''$ S e Longitude $45^{\circ} 25' 51''$ W) fica próximo a Ponta de Barequeçaba.

O ponto de coleta de areia fina fica na Praia do Cabelo Gordo (P1) e de areia grossa fica na Praia do Segredo (P2).

4.1.3 Baixada Santista

Na região da Baixada Santista foram escolhidos três pontos de coletas de água do mar e um ponto de coleta de areia.

O ponto 1 (St1 - Latitude $23^{\circ} 59' 13''$ S e Longitude $46^{\circ} 22' 26''$ W) fica localizado próximo a São Vicente. O ponto 2 (St2 – Latitude $24^{\circ} 02' 25''$ S e Longitude $46^{\circ} 19' 20''$ W) fica próximo à Boca da Barra, após a Ilha das Palmas (ponto controle: “apropriada”

para o cultivo de ostras). O ponto 3 (St3 – Latitude $23^{\circ} 59' 57''$ S e Longitude $46^{\circ} 18' 39''$ W) fica localizado próximo à Marina Astúrias e próximo ao Porto (Figura 3).

As amostras de areia foram coletadas na praia de José Menino (Figura 4), próximo ao ponto (St1 - Latitude $23^{\circ} 59' 13''$ S e Longitude $46^{\circ} 22' 26''$ W); local de entrada da coleta, próximo a São Vicente (Figura 3).



Figura 3. Foto da Praia de José Menino, Santos, SP.

4.1.4 Ubatuba

A região escolhida para realizar as coletas foi o Saco da Ribeira (Figura 4), tendo dois pontos de coletas de água do mar e um ponto de coleta de areia. O ponto 1 (U1 – Latitude $23^{\circ} 30' 02''$ S e Longitude $45^{\circ} 07' 07''$ W) fica localizado na Marina, perto de uma das Bases do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo e o Ponto 2 (U2 – Latitude $23^{\circ} 30' 41''$ S e Longitude $45^{\circ} 06' 04''$ W) fica a mar aberto , ambos no Saco da Ribeira (Figura 5, 6, 7 e 8).

A areia é coletada na praia do Lamberto (Latitude $23^{\circ} 30' 00''$ S e Longitude $45^{\circ} 07' 00''$ W), sendo a praia mais próxima dos pontos de coleta de água de mar.



Figura 4. Foto do Saco da Ribeira, Ubatuba, SP.

4.1.5 Amostras de água do mar

Foram coletados 5L de água do mar, a 30 cm da superfície, armazenadas em frascos estéreis.

4.1.6 Amostras de areia

Depois de retirada, com uma pá esterilizada, 10 cm da camada superficial, foram coletados aproximadamente 100 g de areia úmida (banhada pelo mar), armazenada separadamente em sacos plásticos esterilizados.

As amostras de água do mar e areia foram submetidas à refrigeração e transportadas para o laboratório num período máximo de 24 h.

4.2 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

No momento da coleta foram determinados os parâmetros de salinidade, temperatura, condutividade e pH das amostras de água de mar, utilizando-se o equipamento de multi-parâmetros HACH CO150 (Hach Company). Para a região de São Sebastião, valores mensais de monitoramento foram obtidos da estação CEBIMar - USP (Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo).

4.3 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS

4.3.1 Contagem de coliformes termotolerantes (CT) e *Escherichia coli*

As contagens de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* foram realizadas de acordo com a metodologia proposta pela APHA, 1998, usando a técnica da Membrana Filtrante e membranas de 0,45 µm de porosidade (Millipore).

4.3.2 Contagem de enterococos intestinais (EI)

A contagem de enterococos intestinais foi feita por meio do método de membrana filtrante, proposto pela “Environmental Protection Agency” (EPA, 2000), com membrana de microcelulose de 0,45 µm de porosidade (Millipore).

4.3.3 Contagem de bactérias marinhas viáveis (BMV)

A quantificação de bactérias marinhas viáveis foi feita por meio da inoculação em superfície em placas de Petri contendo o meio agar marinho (Difco). Após o período de incubação de 24h – 48h, a 25 °C, + ou – 2 °C, foram efetuadas as contagens das colônias e os resultados expressos em UFC/mL.

4.3.4 Contagem de colifagos

As amostras de água do mar foram aliqüotadas em tubos nalgene (30 mL em cada) e submetidas à centrifugação de 3000 g por 30 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a quantificação de colifagos somáticos (APHA, 1998). O resultado foi expresso como unidades em UFP/100mL.

4.4 CONTAGEM DE LEVEDURAS

A contagem de leveduras foi feita por meio do método de membrana filtrante.

4.4.1 Contagem de leveduras em amostras de água do mar

As amostras de água do mar foram analisadas empregando-se o método de membrana filtrante, descrita no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, (APHA, 1995). Utilizando membrana de microcelulose de 0,45 μ m de porosidade (Millipore), foram analisados volumes de 10, 50 e 100 mL de cada amostra de água do mar. As membranas foram colocadas sobre a superfície de placas contendo os meios Agar Sabouraud Dextrose (acrescido de cloranfenicol) e CHROMagar Candida (Difco).

4.4.2 Contagem de leveduras em amostras de areia

Amostras de areia úmida e seca (10 g) foram suspensas em 90 mL de água de diluição e, depois, submetidas à agitação por 10 minutos. Uma alíquota de 10 mL foi retirada e, novamente, suspensa em água de diluição – (Anexo I) (90 mL) e submetida aos 10 minutos de agitação. O diluído (10^{-2}) foi filtrado, conforme o método descrito anteriormente. As membranas foram colocadas em placas de meios de cultura contendo Agar Sabouraud Dextrose (ASD, marca Difco), acrescido de cloranfenicol (Anexo I) e em placas contendo CHROMagar Candida (CHROMagar, Microbiology, EUA).

As placas foram incubadas a 25 °C, durante 48h e, posteriormente, as colônias de leveduras foram contadas. As colônias mais representativas, no mínimo três, foram reisoladas e mantidas nos mesmos meios de cultura para uma posterior identificação. Os resultados das contagens foram expressos em unidades formadoras de colônias (UFC) por 100 mL em amostras de água; e, por grama, em amostras de areia.

4.4.3 Purificação dos isolados

No isolamento das leveduras, pode ocorrer a obtenção de isolados associados a bactérias e até mesmo estarem associados a outra espécie de leveduras. Dessa forma, a purificação dos isolados, anteriormente aos testes, é muito importante para a qualidade e confiança dos resultados.

Para a purificação, deve-se preparar um inóculo contendo água destilada autoclavada e o isolado. Uma alçada do inóculo, contendo o isolado, deve ser repicado em placa com meio Agar Sabouraud Dextrose, pelo método de esgotamento na superfície do meio, incubadas a 25 °C por 24h a 72h, obtendo assim colônias isoladas e puras, que devem ser repicadas para tubos de ensaio com o mesmo meio de cultura.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Trichosporon* spp.

4.5.1 Cepas controles

As seguintes cepas de origem clínica foram incluídas no presente estudo como controle dos testes: *T. asahii* (CBS2479), *T. inkin* (CBS5585), *T. mucoides* (CBS7625), *T. ovóides* (CBS7556), (AC-02, AC-57, AC-80, AC 101) *Trichosporon* spp. - Clínico – oral; *Candida albicans* (padrão 12A), *Cryptococcus neoformans* (ICB 162C) e cepas ambientais 75-A, 132-A, 143-A (água de mar), 75-B, 132-B, 143-B (areia). Os isolados clínicos incluídos foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Claudete Rodrigues de Paula, do laboratório de Micologia do ICB, da Universidade de São Paulo. Também colaborando com esse estudo, foram cedidas pelo Instituto Adolfo Lutz as cepas *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *Candida krusei* (ATCC 6258).

4.5.2 Testes utilizados na caracterização fenotípica

4.5.2.1 Micromorfologia

De acordo com a técnica de microcultivo foi verificada a presença de artroconídios, blastoconídios, formação de apressoria, células gigantes apicais e células em forma de barril. (KREGGER-van Rij, 1984; KURTZMAN e FELL, 1998).

A técnica de microcultivo foi realizada com auxílio de alça de platina, cuja colônia de levedura suspeita de *Trichosporon* spp. foi semeada em três estrias paralelas, em uma lâmina de microscopia, contendo o meio ágar fubá adicionado de Tween 80 (INLAB) (Anexo I) e coberta com lamínula. Foram incubadas a 25 °C, durante 48-72 h, em câmara úmida, para estimular a produção de conídios e filamentação. Após o período de incubação, as placas foram observadas ao microscópio óptico (Olympus) em aumentos de 100X e 400X de magnificação sendo realizada a pesquisa de hifas hialinas artrosporadas, artroconídios, blastoconídeos e apressoria (HAZEN, 1995; SIDRIM, ROCHA, 2004).

4.5.2.2 Macromorfologia em meio Agar Sabouraud Dextrose e CHROMagar

Os isolados foram purificados e, após repique de 24h a 72h, foram semeados, em duplicatas, no centro da placa contendo Agar Sabouraud Dextrose – ASD (Anexo A). As placas foram incubadas a duas temperaturas, 25 °C e 37 °C.

Para a avaliação macromorfológica em meio CHROMagar Candida, o procedimento foi igual ao de Agar Sabouraud Dextrose. Porém, foi incubado á temperatura de 25 °C. O meio foi preparado de acordo com as instruções do fabricante.

Para leitura de CHROMagar, devem-se observar as cores e respectivo indicativo das colônias semeadas: azul – *C. tropicalis*, verde – *C. albicans*, branca – *C. parapsiloses*, rosa – *C. glabrata*, lilás – *C. krusei*, bege – outras leveduras.

As características e medidas para ambos os meios foram observadas no período de 24h até 15 dias, para avaliação do comportamento e crescimento dos isolados de *Trichosporon spp.*

4.5.2.3 Crescimento a duas temperaturas em meio Agar Sabouraud Dextrose

As amostras foram semeadas em placas contendo ágar Sabouraud dextrose (Anexo A), em duplicata para cada condição de crescimento, tendo sido duas placas incubadas a 37 °C e duas mantidas à temperatura de 25 °C, + ou – 1 °C, como controle. O crescimento das culturas foi observado e a leitura feita entre 48h e 72h. Usou-se o mesmo padrão de estriamento e a mesma quantidade de inóculo, para ser possível a comparação entre as mesmas quanto ao crescimento.

4.5.2.4 Urease

O teste da urease foi realizado utilizando-se a prova de hidrólise da uréia de Christensen (CHRISTENSEN, 1946) (Anexo A). Os isolados foram semeados no meio com o objetivo de observar a produção de urease. Os tubos foram incubados a 25 °C e 37 °C e observados por meio de leituras de 24h até 15 dias. Assim, a hidrólise da uréia foi observada por meio da mudança da coloração do agar, do amarelo para róseo intenso, indicado pelo vermelho de fenol (indicador de pH) devido à alcalinização do meio de cultura. (LACAZ, *et al.*, 2002; SIDRIM, ROCHA, 2004).

4.5.2.5 Auxanograma

Para o teste auxanograma (KREGGER-van Rij, 1984), foram empregados quinze açúcares: adonitol (Merck), celobiose (Merck), dulcitol (Merck), glicose (Difco), inositol (Merck), L-arabinose (Merck), lactose (Merck), maltose (Merck), melibiose (Merck), rhamnose (Merck), rafinose (Merck), sacarose (Merck), sorbitol (Merck), xylitol (Merck), trealose (Merck) e dois compostos nitrogenados: peptona (Difco) e KNO₃ (Merck).

Na assimilação de carboidratos, foi utilizado meio de prova de assimilação de carbono (Anexo A), isento de qualquer fonte de carbono, ao qual na temperatura de 44 – 46 °C foi adicionada suspensão da levedura a ser testada, com turbidez previamente ajustada à escala nº 0,5 de McFarland. Após a solidificação do meio, alíquotas de diferentes açúcares foram distribuídas de forma eqüidistante sobre o agar.

Para controle positivo do teste, utilizou-se de dextrose. As placas de Petri foram incubadas a 30 °C por 72h, por um período de até 15 dias. De forma complementar, foram realizadas as provas de assimilação de nitrogênio e aminoácidos, utilizando-se a mesma metodologia previamente descrita para o teste de assimilação de carboidratos. Utilizou-se o meio de prova de assimilação de nitrogênio (Anexo A), adicionado de alíquotas de compostos nitrogenados - KNO₃ (Merck), e assim foram realizadas leituras seqüenciais a cada 24h por um período de até 15 dias. Para controle positivo do teste usou-se peptona (Difco, Becton, Dickinson and Company, EUA). A positividade para ambos os testes foi avaliada pelo surgimento de halo de turbidez na área correspondente a cada substrato adicionado (LACAZ, *et al.*, 2002; SIDRIM, ROCHA, 2004).

4.5.2.6 Tolerância à cicloheximida (De HOOG *et al.*, 2000)

Os isolados foram semeados em placa de Petri contendo Agar Sabouraud Dextrose (Difco) suplementado com 0,1% de cicloheximida (Sigma), incubados a 25 °C. O crescimento da colônia e a tolerância à cicloheximida foram observados num período de 24h a 15 dias.

4.5.2.7 Identificação semi-automatizada ID 32 C® (Biomerieux®)

Os isolados foram semeados em Agar Sabouraud Dextrose (Difco) com repiques de 24h ou 48h. Uma alçada do isolado em ASD foi inoculada em 2 mL, de água destilada, autoclavada e ajustada a escala 2 de McFarland. Transferiu-se 250 µL da suspensão anterior para uma ampola API C Médium.

Após homogeneizar a ampola de API C Medium semeada, foi inoculado 135L da suspensão em cada cupula da galeria. Depois de tampada, a galeria  colocada em uma caixa hermética com uma pequena quantidade de água em um recipiente, para evitar a desidratao do teste, e incubada a 29 C + ou – 2 C durante 24h - 48h.

Foram comparados os testes ao controle (0) e anotados qualquer cupula, mais turva, como positiva.

Após leitura visual, as reaoes obtidas foram codificadas em um perfil numérico. Na ficha de resultados, os testes foram separados por grupos de três cupulas; e, um valor 1,2 ou 4 foi indicado para cada um de acordo com a turvao da cupula. Foram indicados entre os grupos valores correspondentes às reaoes positivas. Os números anotados foram consultados numa base de dados do sistema de identificao, indicando o gênero e espécie da levedura testada. Foi utilizada, como controle positivo, a cepa ATCC CBS 2479, de *Trichosporon asahii*.

4.5.2.8 Enzimas extracelulares

Os testes da atividade enzimática foram avaliados em duas diferentes temperaturas (25 C e 37 C). Dessa forma, todos os isolados ambientais e cepas clínicas controles foram feitos em duplicatas, para análise quanto  variao do crescimento nas temperaturas e da atividade enzimática, cujos testes serão descritos a seguir.

4.5.2.8.1 Proteinase (RÜCHEL *et al.*, 1982)

Os isolados de leveduras foram repicados com alça de platina, no centro da placa de Petri, contendo o meio agar-proteinase (Anexo A), bem como o controle positivo (cepa padrão de *Candida albicans*, ICB-12A). As placas feitas em duplicidade foram, então, incubadas  25 C e 37 C, seguindo com leituras de quatro a quinze dias. A presença da enzima foi observada pela formao de um halo translúcido de

degradação da proteína ao redor da colônia da levedura. A atividade enzimática (Pz) foi medida segundo Price *et al.* (1982), utilizando-se a razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro da colônia mais a zona de degradação (ddc), ou seja, $Pz=dc/ddc$ (Tabela 1).

Tabela1. Atividade enzimática segundo, a avaliação dos resultados da razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia mais a zona de degradação.

Pz	Atividade enzimática	Código
=1,0	Negativa	1
$\geq 0,64 \leq$	Positiva	2
<0,64	Fortemente positiva	3

4.5.2.8.2 Fosfolipase (PRICE *et al.*, 1982)

Os isolados de leveduras foram repicados com alça de platina, no centro da placa de Petri, contendo o meio de agar-fosfolipase (Anexo A), bem como, também a cepa padrão de *Candida albicans*, (ICB-12A) empregada como controle positivo. As placas feitas em duplicidade foram, então, incubadas à 25 °C e 37 °C e as leituras feitas no período de quatro a quinze dias. A presença da enzima foi observada pela formação de uma zona opaca de precipitação ao redor da colônia da levedura. A atividade foi medida da mesma forma que para a proteinase, conforme descrito anteriormente.

4.5.2.8.3 Lipase (MÜHSIN *et al.*, 1997)

Os isolados foram semeados em meio para detecção de Lipase (Anexo A). As placas feitas em duplicidade foram mantidas em estufa à 25 °C e 37 °C durante 15 dias. O teste foi considerado positivo, após visualização de um halo de precipitação, ao redor da colônia.

4.5.2.8.4 DNase (LOPEZ-MARTINEZ, 1994)

Os isolados foram semeados em placas de Petri contendo DNase-test®-Agar modificado (Anexo A) e incubadas por 15 dias à temperatura de 25 °C e 37 °C. A leitura foi feita mediante visualização de halo de precipitação formado pela adição de HCl (Merck) 5N.

4.5.3 Testes de sensibilidade a antifúngicos

4.5.3.1 Teste Piloto

Para um teste piloto, cinco isolados foram submetidos ao método de difusão em agar por E-test® e incubados em duas diferentes temperaturas de incubação, 25 °C e 35 °C, para avaliar o crescimento das leveduras.

4.5.3.2 Antifungigrama

A avaliação da sensibilidade aos antifúngicos foi realizada pelo método de difusão em agar por E-test®.

Foram utilizadas fitas E-test® (AB BIODISK®, Solna, Sweden), contendo os antifúngicos: caspofungina (CS), anfotericina-B (AP), cetoconazol (KE), fluconazol (FL), itraconazol (IT) e voriconazol (VO) (Probac, São Paulo, Brasil).

Os gradientes de concentração para anfotericina B, itraconazol e voriconazol, variaram, em uma escala de 0,002 a 32 µg/mL e para fluconazol, de 0,016 a 256 µg/mL. As fitas foram armazenadas a -20 °C até serem utilizadas, respeitando o prazo de validade informado pelo fabricante (AB BIODISK, Solna, Suécia).

Os valores de Concentrações Inibitórias Mínimas (MICs) para as drogas testadas são mostrados na Tabela 2. Para as drogas cetoconazol e anfotericina-B o NCCLS (M27-A2), não se especificam valores de sensibilidade e resistência. Entretanto, indicam que valores de MIC para a droga cetoconazol variam de 0,03 a 16µg/mL,

sendo que para anfotericina-B apresentam-se agrupados em pequeno intervalo, entre 0,25 a 1.0µg/mL, para leveduras (ESPINEL-INGROFF, 2007a, 2007b).

Tabela 2. Guia de interpretação para Teste de Susceptibilidade *in vitro* de *Candida* spp. Documento M27-S3, Volume 28 N° 15 NCCLS, 2008.

Antifúngicos	Sensível (S)	Sensibilidade Dose Dependente (S-DD)	Intermediário (I)	Resistente (R)	Não susceptível (NS)
Caspofungina	≤2	-	-	-	>2
Fluconazol	≤8	16-32	-	≥64	-
Itraconazol	≤0,125	0,25-0,5	-	≥1	-
Voriconazol	≤1	2	-	≥4	-

As leveduras selecionadas foram cultivadas em Agar Sabouraud Dextrose (Difco Laboratories, Detroit, MI), com um repique de 24h (48h para cepas com crescimento mais lento), realizados previamente ao experimento. Para E-test®, 100 µL do inóculo foram plaqueados, objetivando concentração final de 0,5 a 2,5 x 10³ UFC/mL para cada amostra.

Os isolados foram semeados em placas com meio de cultivo (RPMI-1640 - Probac® do Brasil, São Paulo, SP), composto por meio RPMI 1640, sem bicarbonato, adicionado de tampão MOPs e 2% de glicose (Anexo A), mantidas à temperatura ambiente por 30 minutos antes do início do ensaio. Foram utilizadas placas de 150 mm de diâmetro, contendo agar na espessura de 4mm. Um volume de 100µL, referente a cada inoculo, foi dispensado sobre a superfície do ágar e distribuído de forma homogênea, em quatro direções diferentes, com auxílio de “swab” atóxico. Após o excesso de umidade ter sido adsorvido na superfície do agar, e esta se mostrar completamente seca, as fitas foram aplicadas cuidadosamente sobre o agar, em número de 3 por placa. As placas foram incubadas em estufa nas temperaturas testadas (25 °C e/ou 35 °C) por 72h e as leituras das CIMs feitas nos períodos de 24h, 48h e 72 h.

A interpretação dos resultados foi realizada conforme critérios estabelecidos pelo fabricante (E-test®, AB BIODISK). As leituras (CIMs) para azóis foram estabelecidas como as menores concentrações, nas quais as bordas elípticas de inibição interceptaram as escalas das fitas e na presença de crescimento residual no interior da zona de inibição. O valor de CIM foi estabelecido como o ponto onde houve aproximadamente inibição de 80% do crescimento (PFALLER *et al.*, 2000). A CIM para anfotericina B foi lida no ponto em que uma zona de inibição completa interceptou a fita (LOZANO-CHIU *et al.*, 1998).

Como controles de qualidade, foram incluídos no estudo isolados padrões: *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *Candida krusei* (ATCC 6258), cujo CIM e resultado de disco difusão já é padronizado pelo CLSI (NCCLS) e para controle de crescimento de leveduras.

4.6 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

4.6.1 Extração do DNA cromossômico

A extração do DNA dos isolados suspeitos de *Trichosporon* spp. foi realizada, segundo o método descrito por GANDRA *et al.*, (2006), com modificações. O isolado foi semeado em placa de Petri, contendo meio Agar Sabouraud Dextrose e incubado à 25 °C durante 24h a 48h. Após incubação, os isolados foram inoculados em meio YPD - “Yeast Peptone Dextrose” (glicose 2%, extrato de levedura 1%, peptona 2% Difco) (Anexo I) por 48 horas a 37° C. Após o crescimento no tubo, foi centrifugado por 10 min/ 20°C/ 10.000 rpm, lavado com água ultrapura (T.E 1M 1mL) e transferido para um tubo Eppendorf (1,5mL). Após nova centrifugação, por 5 minutos adicionou-se 1,0 mL de Tampão SET (Tris 20mM, EDTA 25mM, NaCl 75mM, pH 8,0). Após homogeneização, transferiram-se 500µL para dois novos tubos. Centrifugou-se por 10 minutos e descartamos o sobrenadante. As leveduras foram, então, rompidas e homogeneizadas com 500µL de lisozima (SIGMA), em uma concentração de 10,0 mg/mL, em tampão SET. Os tubos foram incubados a 37°C, durante 2h. A seguir, adicionamos 6µL de RNase (Promega) a 10,0 mg/mL e a mistura foi incubada a 37 °C por 1 hora. Foram

acrescentados 150 μ L de SDS (“Sodium dodecyl sulphate” – Sigma) a 10% e 25 μ L de proteinase K a 10,0 mg/mL (Promega) e a mistura homogeneizada. Após incubação a 37 °C, por 1h, foram acrescentados 75 μ L de acetato de sódio (Merck) 3M, e a mistura mantida em banho de gelo, durante 10 minutos. Uma mistura de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (250 μ L), na proporção 25:24:1 (Merck) foi adicionada, homogeneizada por inversão, cerca de cinquenta vezes e centrifugada a 3000Xg (30x100g) por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para outro tubo Eppendorf de 1,5 μ L. Então, foram acrescentados 250 μ L de uma mistura de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), misturados por inversão, cerca de cinquenta vezes e centrifugados a 3.000 Xg (30x100g) por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para outro tubo Eppendorf de 1,5 μ L e adicionado igual volume de álcool isopropílico (Merck). O tubo foi invertido quatro vezes e deixado por 3h à temperatura de -20 °C. Os tubos foram assim centrifugados, durante 30 minutos a 3.000 Xg, e o sobrenadante foi descartado. Foram acrescentados 500 μ L de etanol (Merck) a 70% e os tubos foram centrifugados a 3.000 Xg durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o tubo secado à temperatura ambiente. O DNA presente no sedimento foi ressuscitado em 50 μ L de tampão TE 1X (Tris 0,01M, EDTA 1 mM, pH 7,5).

A quantificação e pureza do DNA extraído de cada amostra foi realizada por dosagem espectrofotométrica, em aparelho NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific).

Géis de agarose (Invitrogen) a 1% foram preparados em tampão TBE 1X (Tris 0,09; Ácido bórico 0,09M; EDTA 2 mM , pH 8,0). O gel foi colocado em cuba de eletroforese horizontal (Loccus), contendo TBE 1X. Foram aplicados nos poços do gel 5 μ L de DNA e 1,5 μ L de corante azul de bromofenol (Bio-Rad), e em um outro poço, 5 μ L do marcador de peso molecular (DNA do fago λ digerido com *Hind* III - Promega). A corrida foi realizada a 85 V por 1h e 45 minutos. A seguir, o gel foi corado com Brometo de Etídio (0,5 μ g/mL). A visualização da banda de DNA foi realizada com auxílio do equipamento GEL DOC 1000 (Bio-Rad), sob iluminação de luz ultravioleta.

4.6.2 Identificação de *Trichosporon* spp. pela reação em cadeia pela polimerase

Para a identificação das leveduras do gênero *Trichosporon* spp., utilizamos a técnica molecular de PCR “Polimerase Chain Reaction”, com as seqüências dos iniciadores “primers” TRF (5'-AGA GGC CTA CCA TGG TAT CA-3') e TRR (5'-TAA GAC CCA ATA GAG CCC TA-3') seguindo a metodologia de Sugita *et al.*, 1998a.

Os primers de oligonucleotídeos usados amplificaram um fragmento de 170 bp. As reações de amplificações foram feitas contendo 50 mM KCL, 10 mM Tris-HCL (pH 8,3), 1,0 mM MgCl₂, 2,5 uM (cada) dATP, dCTP, DGTP e dTTP, 2mM cada primer oligonucleotídeo, e 0,5 Unidade de Taq DNA polimerase (Promega). Cada reação foi realizada com um volume final de 25µL. As reações para amplificação foram feitas, segundo as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C, por 3 min, seguido por 30 ciclos de amplificação consistindo de desnaturação a 94 °C, por 30 segundos, anelamento a 56° C por 15 segundos e extensão a 72° C por 15 segundos, com um período final de extensão até 72 °C por 10 minutos. O termociclador utilizado para o procedimento foi o modelo EP gradiente S (Eppendorf).

A qualidade de DNA foi observada por eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) a 1,5% (Peso/vol), preparado em tampão TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8,0) e coberto com tampão de corrida (TAE 1X). Em cada poço do gel foram colocados 25ul do produto amplificado, e 5,0 µL de corante azul de bromofenol (Bio-Rad). Foram aplicados 5µL do marcador de peso molecular (DNA do fago λ digerido com *Hind* III - Promega). A corrida foi realizada a 85V por 1 h. A seguir, o gel foi corado com solução de Brometo de Etídio (0,5 µg/mL - Sigma). A visualização da banda de DNA foi realizada com auxílio do equipamento GEL DOC 1000, sob iluminação de luz ultravioleta, com o programa “Molecular Analyst™” (versão 1.4.1, Bio-Rad, EUA). Para as reações de PCR foram utilizadas cepas ATCCs controles positivos de *Trichosporon* spp. (*T. asahii* - CBS2479, *T. inkin*- CBS5585, *T. mucoides* - CBS7625 e *T. ovoides* - CBS7556) e água ultrapura como controle negativo.

4.6.3 Caracterização molecular utilizando a seqüência BOX-PCR

Foi realizada a reação em cadeia pela polimerase, de acordo com as recomendações de Versalovic *et al.* (1991), utilizando como único iniciador a seqüência (5' CTA CGG CAA GGC GAC GAC G 3'), com ciclos de amplificação 94 °C-5'/35 ciclos (94°C-1'/55°C-1'/72°C-3') e uma extensão a 72 °C-15'.

As reações de BOX-PCR foram realizadas em um volume final de 25µL, sendo 5µL de solução tampão de reação 1X (1,5 mM MgCL₂) (*Colorless Go TaqTM Reaction Buffer* - Promega), 2,0µL de solução *mix* de dNTPs a 2,5 mM (Promega), 2 µL do iniciador (primer BOX A1) a 20µM (IDT - Integrated DNA Technologies), 0,125 µL da enzima GoTaqTM Polimerase (PROMEGA), 14,88 µL de água milli-Q e 1 µL do DNA, extraído e padronizado para concentração final de 100 ng/µL.

Adicionalmente, em todas as reações foram utilizadas cepas padrões da coleção de cultura do Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular do ICB/USP: RC11 (*V. cholerae* O1), RC230 (*V. cholerae* O1), 569B (*V. cholerae* O1) e a ATCC CBS-2479 (*Trichosporon asahii*), como controles positivos e água milli-Q, substituindo o DNA, como controle negativo das reações.

A reação de amplificação foi realizada em termociclador (Mastercycler EP Gradient S–Eppendorf) com as seguintes condições de amplificação: denaturação inicial a 94 °C, por 5 minutos, seguindo-se 35 ciclos de amplificação consistindo de denaturação a 94 °C, por 1 min, anelamento a 55 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 3 min, e uma extensão final a 72 °C, por 15 min.

Após a amplificação da reação de PCR, 15 µL do produto foram avaliados por eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) a 1% (p/v), em tampão TAE (1X) a 80 V, por 90 minutos. O DNA digerido do fago Lambda *Hind* III (Promega) foi utilizado como marcador de peso molecular. O gel foi corado em solução de Brometo de Etídio (0,5 µg/mL- Sigma), e o resultado do gel foi documentado e fotografado sob luz ultravioleta em fotodocumentador, modelo GEL DOC XR System (Bio-Rad).

4.6.4 Seqüenciamento

4.6.4.1 Amplificação da região rDNA pelo PCR

A amplificação foi realizada utilizando os iniciadores ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') (WHITE *et al.*, 1990).

As reações foram feitas em um volume final de 50 µL, sendo 5 µL de solução tampão 10X (Invitrogen), 1,5 µL de MgCl₂ a 50 mM (Invitrogen), 0,2 µL de solução *mix* de dNTPs a 2,0 mM (Invitrogen), 1 µL da solução de cada iniciador a 20 µM (Invitrogen), 0,4 µL da enzima *Taq* polimerase (Invitrogen), 38,9 µL de água milli-Q e 2 µL de DNA a 25 ng/µL. Foram utilizados nas reações os controles negativo, cujo DNA foi substituído por água milli-Q e o controle positivo (ATCC CBS-2479 – *Trichosporon asahii*).

A reação de amplificação foi realizada em termociclador (Mastercycler ep Gradient S – Eppendorf), com as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 94 °C, por 2 min, seguindo-se 35 ciclos de amplificação consistindo de desnaturação a 94 °C, por 30 s, anelamento a 56 °C por 45 s, extensão a 72 °C, por 2 min; e uma extensão final a 72 °C, por 5 minutos.

O fragmento de DNA amplificado de aproximadamente 180 pb, foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v), utilizando o marcador de peso molecular Lambda DNA *Hind* III (Promega). O gel foi corado em solução de Brometo de etídio (Sigma) 0,5 µg/mL, por 10 min, e fotografado no sistema de fotodocumentação *Eagle Eye* II (Stratagene).

4.6.4.2 Purificação e seqüenciamento do fragmento rDNA amplificado

Os produtos das reações de PCR, com rDNA dos isolados de leveduras, foram purificados usando o *Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit* (28-9034-70, GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante.

Após a purificação, 1,0 µL da reação de PCR purificada, juntamente com o marcador de peso molecular Ladder 1 Kb (Promega), foram submetidos à eletroforese horizontal em gel, de agarose (Invitrogen) 1,0% (p/v), em tampão TAE 1X a 85 V por 60 min. O gel foi corado em solução de Brometo de Etídio (0,5 µg/mL - Sigma) e fotografado sob luz ultravioleta, em fotodocumentador, modelo GEL DOC XR System (Bio-Rad). A qualidade do DNA foi verificada e a concentração do DNA foi determinada por espectrofotometria em aparelho NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific).

Posteriormente, os produtos de PCR foram seqüenciados, utilizando iniciadores específicos para a região ITS1 (WHITE *et al.*, 1990) e para a região IGS1-26SS (5' ATC CTT TGC AGA CGA CTT GA-3') (SUGITA *et al.*, 2002).

As reações de seqüenciamento foram realizadas com 3-5 µL (150 ng) do produto, seguindo o protocolo do kit *DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* para MegaBace™ (US81090, GE Healthcare), conforme instruções do fabricante. Os produtos foram enviados ao Centro do Genoma Humano/USP e seqüenciados no seqüenciador automático, *MegaBace 1000 DNA Analysis System* (Amersham Biosciences).

4.7 ANÁLISES DOS RESULTADOS

4.7.1 Análise estatística

As contagens de leveduras obtidas em amostras de água e areia foram correlacionadas com os parâmetros físico-químicos (temperatura, condutividade, salinidade, pH) e microbiológicos estudados (colifagos, coliformes termotolerantes, enterococos intestinais, *Escherichia coli*, e bactérias marinhas viáveis - BMV), nos diferentes pontos de coletas das três regiões, utilizando-se dos parâmetros de correlação de Pearson ou Spearman, com $p \leq 0,05$ e r entre 0 e 1. Foram também realizados testes de análises de Variância para comparar as contagens de leveduras, aplicando-se diferentes volumes de filtração (10mL, 50mL e 100mL).

4.7.2 Análise dos agrupamentos obtidos usando a metodologia molecular

Os resultados do BOX-PCR foram analisados utilizando-se o software *BioNumerics* (Applied Maths), versão 5,10. As análises dos agrupamentos foram realizadas usando os coeficientes de similaridade simples, de Dice e de Jaccard, seguindo o limite de tolerância de 1%.

A matriz de similaridade genética entre os isolados foi construída aplicando-se o coeficiente de Dice. Os agrupamentos foram feitos de acordo com o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean). A posição de tolerância de bandas utilizada foi de 1% (band position tolerance) para comparação dos fragmentos.

4.7.3 Análises das sequências obtidas pelo sequenciamento parcial da região ITS e/ou IGS

As sequências nucleotídicas tiveram seus cromatogramas analisados e posteriormente foram editadas e alinhadas no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (version 7.0.9.0) (HALL, 1999). Após a edição, as sequências obtidas (aproximadamente 500 pb) foram comparadas com sequências disponibilizadas no GenBank do Centro Nacional de Informação Biotecnológica - NCBI (*National Center for Biotechnology Information – NCBI*), utilizando o algoritmo BlastN (ALTSCHUL *et al.*, 1990). Em seguida, as sequências foram alinhadas utilizando o programa *BioEdit* e quando os isolados apresentaram > 99% de identidade (*Sequence Identity Matrix*) entre si, apenas um isolado foi selecionado como representante para a construção da árvore filogenética.

Após o alinhamento múltiplo das sequências obtidas e das sequências referências selecionadas no GenBank, as árvores filogenéticas foram construída com a utilização do programa MEGA 4 (TAMURA *et al.*, 2007) utilizando o método *Neighbor-Joining* (SAITOU e NEI, 1987), o algoritmo *Jukes-Cantor* (JUKES e CANTOR, 1969), e um valor de “*bootstrap*” de 1000 repetições. A cepa *Rhodotorula glutinis* (AF070430) foi utilizada como grupo externo na construção das árvores filogenéticas.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DAS TRÊS REGIÕES COSTEIRAS ESTUDADAS

No período de agosto de 2005 até março de 2007, foram coletadas e analisadas um total de 126 amostras, sendo 73 de água do mar e 53 de areia, nas regiões costeiras do estado de São Paulo: Santos (21 de água e 7 de areia), São Sebastião (40 de água e 40 de areia) e Ubatuba (12 de água e 6 de areia).

As contagens de leveduras em amostras de água de mar variaram de < 1 até $1,3 \times 10^3$ UFC/100 mL; e, em amostras de areia, entre <1 e $3,2 \times 10^3$ UFC/g, tendo sido cultivada em meio Agar Sabouraud Dextrose (ASD). As contagem feitas em meio CHROMagar foram $1,0 \times 10^0$ UFC/100 mL a $1,6 \times 10^3$ UFC/100 mL e <1 a $3,6 \times 10^3$ UFC/100 mL para amostras de água de mar e areia, respectivamente. As leveduras apresentaram uma frequência de 89,0% em amostras de água de mar, e 88,7% em amostras de areia nas três regiões estudadas (Tabelas 3 e 4).

Os resultados obtidos, utilizando-se de três volumes para análise de cada amostra, não apresentaram diferenças significativas pelo Teste de variância, e as médias aritméticas foram calculadas.

As maiores contagens de leveduras em amostras de água de mar foram observadas no Ponto 1, de São Sebastião, quando o meio ASD foi usado, porém, utilizando o meio CHROMagar, o maior valor ocorreu no Ponto 1 de Ubatuba (Tabelas 3 e 4).

Em relação às amostras de areia, as maiores contagens de leveduras foram observadas no Ponto 1 da Baixada Santista, utilizando o meio ASD, enquanto que para o meio CA, a maior contagem observada foi igualmente nos Pontos 1 e 2, de São Sebastião (Tabelas 3 e 4).

Também pôde-se observar uma alta concentração de bactérias marinhas viáveis em todas as regiões de estudo, (100% das amostras), variando de $2,0 \times 10^1$ a $3,4 \times 10^3$ UFC/mL, no Canal de São Sebastião; de $7,6 \times 10^2$ a $4,4 \times 10^3$ UFC/mL, na Baixada Santista; de $2,0 \times 10^1$ a $9,2 \times 10^2$ UFC/mL em Ubatuba. A presença de bactérias marinhas viáveis foi correlacionada moderadamente com os indicadores de poluição

fecal, coliformes termotolerantes ($r=0,689$, $p= 0,0001$), *E.coli* ($r=0,450$, $p= 0,0001$) e enterococos intestinais ($r= 0,370$, $p= 04,0001$), (ALMEIDA, 2008).

Os valores mínimo, máximo e média aritmética dos parâmetros microbiológicos (leveduras, bactérias marinhas viáveis, coliformes termotolerantes, enterococos intestinais, *Escherichia coli* e colifagos) e dos parâmetros físico-químicos (Condutividade, pH, salinidade e temperatura) pesquisados nas três regiões estudadas estão sendo apresentados nas tabelas 3 e 4.

As concentrações das leveduras em amostras de água de mar e areia foram relacionadas estatisticamente com os parâmetros físico-químicos e microbiológicos, estudados por área e ponto de coleta, sendo apresentados a seguir.

Foram obtidas altas concentrações de leveduras em amostras de água (frequência 89,0% ASD, 100% CA) variando de <1 a $1,3 \times 10^3$ UFC/100 mL, no Canal de São Sebastião; de $2,0 \times 10^0$ a $6,0 \times 10^2$ UFC/100 mL, na Baixada Santista; de <1 a $1,6 \times 10^3$ UFC/100 mL, em Ubatuba. A presença de leveduras foi correlacionada com os indicadores de poluição fecal. As leveduras de amostras de água de mar de São Sebastião correlacionaram-se com os coliformes termotolerantes ($r=0,512$, $p= 0,021$); e em Santos, com colifagos ($r=0,791$, $p= 0,048$) e com coliformes termotolerantes ($r=0,893$, $p=0,012$) (Tabelas 3 e 4).

Para contagens de leveduras em amostras de areia (frequência 88,7% ASD e 95,3% CA), foram obtidas concentrações mais altas de leveduras variando de <1 a $3,6 \times 10^3$ UFC/g, no Canal de São Sebastião; de $6,0 \times 10^0$ a $3,2 \times 10^3$ UFC/g, na Baixada Santista; de $2,0 \times 10^3$ a $1,6 \times 10^3$ UFC/g, em Ubatuba. A presença de leveduras em amostras de água de mar, foi correlacionada com os indicadores de poluição fecal: em São Sebastião, as leveduras correlacionaram-se com coliformes termotolerantes ($r=0,512$, $p= 0,021$); na Baixada Santista com colifagos ($r=0,791$, $p= 0,048$) e com coliformes termotolerantes ($r=0,893$, $p=0,012$) (Tabelas 3 e 4). Entretanto, não houve correlação entre as contagens de leveduras de amostras de areia e os indicadores de contaminação fecal.

Quanto aos parâmetros físico-químicos, apenas um ponto (Ponto 1, de Ubatuba) demonstrou correlação entre as concentrações de leveduras em amostras de água.

Houve correlação entre as contagens de leveduras e os valores de pH ($r=0,926$, $p=0,017$).

Todavia, as contagens de leveduras em amostras de areia não evidenciaram correlação com os parâmetros microbiológicos, apresentando correlação apenas com os parâmetros físico-químicos: em São Sebastião, as leveduras foram correlacionadas com o pH ($r=0,530$, $p=0,016$). Na Baixada Santista, com a condutividade ($r= -0,964$, $p=0,003$) e a salinidade ($r= -0,964$, $p=0,003$) (Tabelas 3 e 4) .

Tabela 3. Parâmetros microbiológicos e físico-químicos determinados na região costeira da Baixada Santista, São Paulo, por ponto de coleta.

Parâmetros			Cond.	pH	Salin.	Temp.	Leveduras Água (ASD)	Leveduras Água (CA)	Colifagos	CT	<i>E. coli</i>	EF	BMV	Leveduras Areia (ASD)	Leveduras Areia (CA)
Área	Ponto	Valores	(m/S)		(%)	(o C)	UFC/100mL	UFC/100mL	UFC/100mL	UFC /100mL	UFC /100mL	UFC /100mL	UFC /100mL	UFC/g	UFC/g
Santos 21/	P1	m	31,8	7,0	19,7	16,3	4,0x10 ¹	1,2x10 ¹	5,0x10 ⁰	2,0x10 ¹	<1	<1	9,1x10 ⁴	1,0x10 ¹	6,0x10 ⁰
		M	48,0	7,5	31,3	28,5	2,8x10 ²	3,5x10 ²	4,1x10 ³	3,6x10 ³	7,2x10 ²	3,8x10 ¹	2,2x10 ⁵	3,2x10 ³	4,5x10 ²
		Média	38,8	7,2	24,6	23,7	1,3x10 ²	7,1x10 ¹	6,0x10 ²	8,6x10 ²	1,9x10 ²	8x10 ¹	1,3x10 ⁵	7,2x10 ²	1,9x10 ²
		Freq.	n=7	n=7	n=7	n=7	7/7	7/7	7/7	7/7	5/7	3/7	7/7	7/7	7/7
	P2	m	31,8	7,0	19,7	15,9	2,0x10 ⁰	2,0x10 ⁰	<1	<1	<1	<1	7,6x10 ⁴	-	-
		M	48,8	8,0	31,8	28,0	5,6x10 ²	7,6x10 ¹	3,0x10 ¹	3,8x10 ²	1,2x10 ²	1,2x10 ¹	3,2x10 ⁵	-	-
		Média	42,5	7,4	26,8	23,5	8,1x10 ¹	3,2x10 ¹	1,2x10 ¹	1,1x10 ²	1x9x10 ¹	2,0x10 ⁰	1,9x10 ⁵	-	-
		Freq.	n=7	n=7	n=7	n=7	7/7	7/7	4/7	6/7	3/7	3/7	7/7	-	-
	P3	m	35,5	6,5	22,0	15,2	4,5x10 ¹	1,6x10 ¹	<1	9,8x10 ¹	<1	<1	1,3x10 ⁵	-	-
		M	45,3	8,0	29,1	28,0	6,0x10 ²	2,0x10 ²	3,4x10 ³	8,4x10 ³	9,1x10 ²	4,9x10 ¹	4,4x10 ⁵	-	-
		Média	40,4	7,2	25,5	23,3	1,6x10 ²	6,9x10 ¹	5,5x10 ²	1,9x10 ³	2,5x10 ²	1,5x10 ¹	1,9x10 ⁵	-	-
		Freq./n	n=7	n=7	n=7	n=7	7/7	7/7	5/7	7/7	5/7	4/7	7/7	-	-
Freq.			21	21	21	21	21/21	21/21	16/21	20/21	13/21	10/21	21/21	7/7	7/7

Legenda – BMV: Bactérias Marinhas Viáveis; CT: Coliformes termotolerantes; EF: Enterococos intestinais; CA: meio CHROMagar; ASD: Agar Sabouraud Dextrose; M: valor máximo, m: valor mínimo, Freq.: frequência, n: número de amostras, * número de amostras de água/número de amostras de areia, Cond.:Condutividade; Salin.: Salinidade; Temp.: Temperatura.

Tabela 4. Parâmetros microbiológicos e físico-químicos determinados nas regiões costeiras do Canal de São Sebastião e Ubatuba, São Paulo, por ponto de coleta.

Parâmetros			Cond.	pH	Salin.	Temp.	Leveduras Água (ASD)	Leveduras Água (CA)	Colifagos	CT	<i>E. coli</i>	EF	BVM	Leveduras Areia (ASD)	Leveduras Areia (CA)
Área	Ponto	Valores	(m/S)		(%)	(o C)	UFC/100m L	UFC/100m L	UFC/100m L	UFC /100mL	UFC /100mL	UFC /100mL	UFC /100mL	UFC/g	UFC/g
São Sebastião 40/40*	P1	m	33,2	6,5	24,1	22,2	<1	4,0x10 ⁰	<1	<1	<1	<1	2,6x10 ³	<1	<1
		M	51,7	8,0	35,0	32,7	1,3x10 ³	2,1x10 ²	5x10 ⁰	2,9x10 ²	8,6x10 ¹	5,1x10 ¹	3,4x10 ⁵	3,1x10 ³	3,6x10 ³
		Média	44,4	7,2	29,5	25,4	2,6x10 ²	3,3x10 ¹	1,4x10 ⁰	2,1x10 ¹	9,7x10 ⁰	4,5x10 ⁰	3,5x10 ⁴	6,6x10 ²	7,1x10 ²
		Freq.	n=20	n=20	n=20	n=20	16/20	15/15	2/20	11/20	8/20	3/20	20/20	19/20	14/15
	P2	m	39,3	6,5	24,9	22,3	<1	1,0x10 ⁰	<1	<1	<1	<1	2,0x10 ³	<1	<1
		M	51,9	8,0	35,0	30,8	5,6x10 ²	5,0x10 ²	1,5x10 ¹	7,3x10 ¹	7,3x10 ¹	2,8x10 ¹	1,9x10 ⁵	3,0x10 ³	3,6x10 ³
		Média	45,9	7,2	29,9	28	6,5x10 ¹	4,5x10 ¹	2,2x10 ⁰	9,3x10 ⁰	6,0x10 ⁰	2,5x10 ⁰	2,7x10 ⁴	6,3x10 ²	4,8x10 ²
		Freq.	n=20	n=20	n=20	n=20	17/20	15/15	2/20	9/20	3/20	2/20	20/20	15/20	14/15
Freq.		20	20	20	20	33/40	30/30	4/40	20/40	11/40	5/40	40/40	34/40	28/30	
Ubatuba 12/6*	P1	m	41,0	7,0	26,4	25,3	4,0x10 ⁰	3,0x10 ⁰	<1	<1	<1	<1	2,0x10 ³	6,0x10 ⁰	2,0x10 ⁰
		M	47,6	8,0	30,3	31,8	8,0x10 ¹	5,0x10 ¹	<1	1,0x10 ⁰	1,0x10 ¹	<1	9,2x10 ⁴	1,6x10 ³	4,6x10 ²
		Média	44,0	7,3	28,5	28,7	3,2x10 ¹	2,3x10 ¹	<1	<1	<1	<1	3,0x10 ⁴	5,7x10 ²	1,9x10 ²
		Freq.	n=6	n=6	n=6	n=6	6/6	6/6	0/6	1/6	1/6	0/6	6/6	6/6	6/6
	P2	m	41,9	7,0	26,9	25,9	<1	1,0x10 ⁰	<1	<1	<1	<1	2,8x10 ³	-	-
		M	49,9	7,5	31,7	31,9	6,3x10 ²	1,6x10 ³	<1	<1	<1	<1	4,7x10 ⁴	-	-
		Média	45,4	7,4	29,4	28,0	1,3x10 ²	2,9x10 ²	<1	<1	<1	<1	1,7x10 ⁴	-	-
		Freq.	n=6	n=6	n=6	n=6	5/6	6/6	0/6	0/6	0	0/6	6	-	-
Freq.		12	12	12	12	11/12	12/12	0/12	1/12	1/12	0/12	12/12	6/6	6/6	
Total		73	73	73	73	65/73	63/63	20/73	41/73	25/73	15/73	73/73	47/53	41/43	
232		-	-	-	-	89,0%	100%	27,4%	56,2%	34,2%	20,5%	100%	88,7%	95,3%	

Legenda – **BMV**: Bactérias Marinhas Viáveis; **CT**: Coliformes termotolerantes; **EF**: Enterococos intestinais; **CA**: meio CHROMagar; **ASD**: Agar Sabouraud Dextrose; **M**: valor máximo, **m**: valor mínimo, **Freq.**: frequência, **n**: número de amostras, * número de amostras de água/número de amostras de areia, **Cond.**: Condutividade; **Salin.**: Salinidade; **Temp.**: Temperatura.

5.1.1 Canal de São Sebastião

Durante o período de coleta no Canal de São Sebastião, os parâmetros físico-químicos obtidos apresentaram as seguintes faixas: condutividade entre 33,2 a 51,9 mS, pH entre 6,5 a 8,0, salinidade 24,1 a 35 ‰ e a temperatura entre 22,2 °C a 32,7 °C.

Os resultados foram analisados e não mostraram diferenças significativas entre as concentrações de leveduras em amostra de água de mar nos dois pontos de coletas. No entanto, observou-se a correlação entre o pH e as concentrações de leveduras, coletadas em areia do Ponto 2, ($r = 0,530$ e $p = 0,016$), (Figura 5).

As contagens de leveduras, em meio Agar Sabouraud Dextrose (ASD), variaram de < 1 a $1,3 \times 10^3$ UFC/100 mL, com uma frequência de 82,5% em amostras de água de mar, e foi < 1 até $3,1 \times 10^3$ UFC/g em 85% das amostras de areia. No isolamento em meio CHROMagar, obtivemos maior frequência que no meio ASD, e as concentrações de leveduras foram de $1,0 \times 10^0$ UFC/100mL a $5,0 \times 10^2$ UFC/100mL, em 100% de amostras de água de mar, e < 1 a $3,6 \times 10^3$ UFC/g, em 93,3% de amostras de areia.

Houve uma pequena diferença para amostras de água de mar do Ponto 1: Em meio ASD, variou de < 1 a $1,3 \times 10^3$ UFC/100mL, e no meio CHROMagar, entre $4,0 \times 10^0$ a $2,1 \times 10^2$ UFC/100mL.

A variação de coliformes termotolerantes foi de < 1 a $2,9 \times 10^2$ UFC/ 100mL (em 50% das amostras), *Escherichia coli* (com frequência em 27,5%), e bactérias viáveis marinhas (com frequência de 100%) com valores de < 1 a $8,6 \times 10^1$ UFC/mL e $2,0 \times 10^1$ a $3,4 \times 10^3$ UFC/mL, respectivamente (Tabelas 3 e 4). Quando a análise dos resultados de amostras de água de mar foi realizada por ponto de coleta, notou-se que no Ponto 1: as contagens de leveduras (presentes em 40%), apresentaram correlação com as concentrações de coliformes termotolerantes ($r = 0,512$ e $p = 0,021$) (Figura 7) e *E. coli* ($r = 0,548$ e $p = 0,012$), caracterizando uma relação entre a concentração de leveduras e a contaminação fecal (Figura 6). Entretanto, essas concentrações de leveduras isoladas de amostras de água de mar não apresentaram correlação com os parâmetros físico-químicos.

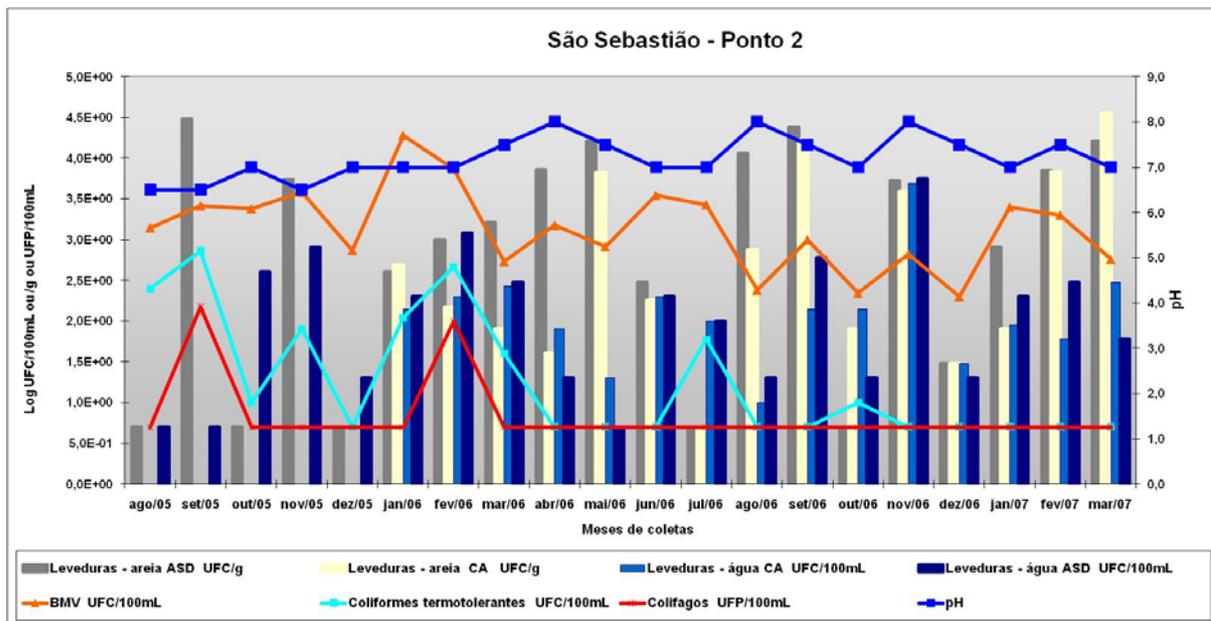
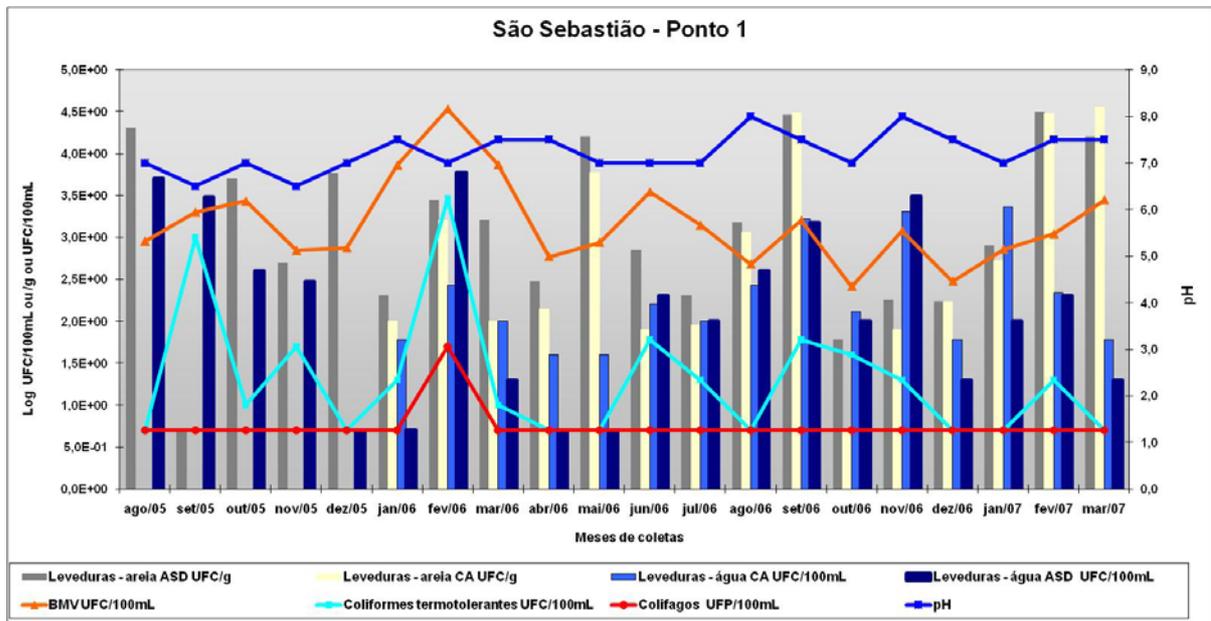


Figura 7. Variação dos parâmetros microbiológicos e de pH avaliados no Canal de São Sebastião, por tipo de amostra, ponto e data de coleta.

5.1.2 Baixada Santista

As leveduras estiveram presentes em 100% das amostras de água de mar variando, de $2,0 \times 10^0$ até $6,0 \times 10^2$ UFC/100 mL. Em 100% das amostras de areia, que variaram de $1,0 \times 10^1$ e $3,2 \times 10^3$ UFC/g, para as contagens feitas em meio ASD. Quando analisadas em meio CHROMagar, quantificaram-se $2,0 \times 10^0$ a $3,5 \times 10^2$ UFC/mL em amostras de água de mar; e $6,0 \times 10^0$ a $4,5 \times 10^2$ UFC/g, em amostras de areia (Tabela 3).

As contagens de leveduras feitas em meio ASD apresentaram maior concentração de leveduras do que em meio CHROMagar, tanto em amostras de água de mar, como em amostras de areia para a região de Santos.

As concentrações de leveduras em amostras de areia apresentaram correlação com os parâmetros físico-químicos: condutividade e salinidade (Figura 8).

Quando analisados por ponto de coleta, as concentrações de leveduras, em amostras de água de mar, no Ponto 1, apresentaram correlação com colifagos ($r = 0,791$ e $p = 0,048$) (Figura 9) e coliformes termotolerantes. As contagens de colifagos variaram de <1 a $3,4 \times 10^3$ UFC/100 mL; e coliformes termotolerantes variaram entre <1 e $4,1 \times 10^3$ UFC/100 mL, com freqüências entre 76,2% e 95,3%, respectivamente. As contagens de BMV variaram de $7,6 \times 10^4$ a $4,4 \times 10^5$ UFC/100 mL (100% das amostras) (Tabela 3).

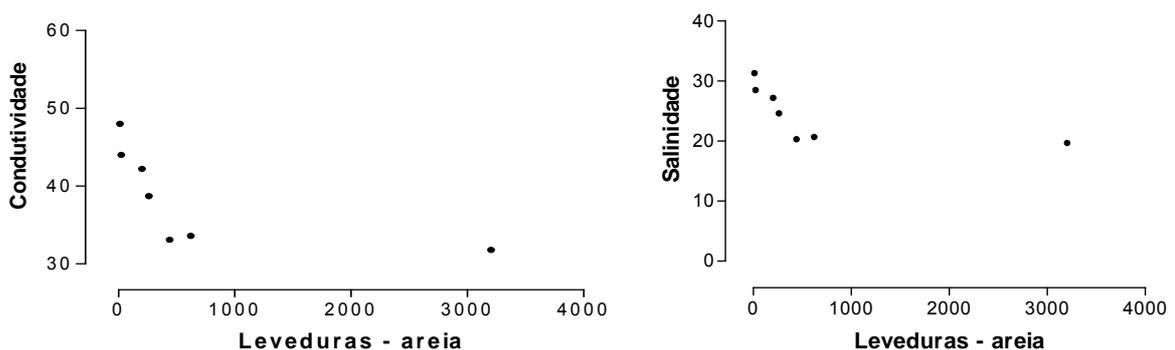


Figura 8. Correlação entre a concentração de leveduras e os valores condutividade ($r = - 0,964$, $p = 0,003$) e salinidade em amostras de areia, Santos - P1. ($r = - 0,964$, $p = 0,003$)

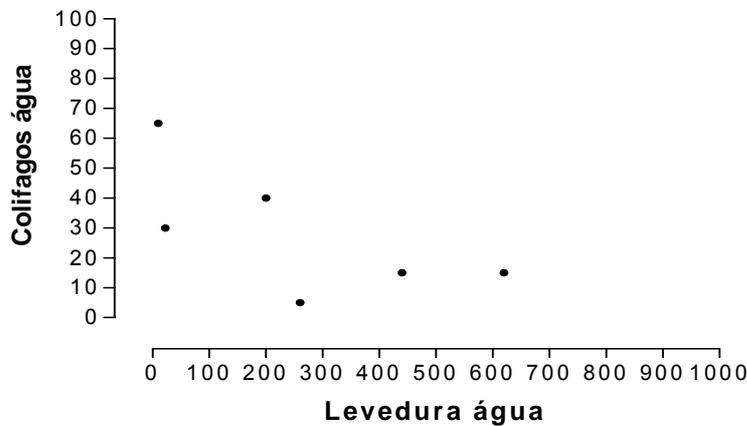


Figura 9. Correlação entre as concentrações de leveduras e colifagos de amostras de água, Santos - P1. ($r = 0,791$, $p = 0,048$)

Analisando as amostras por ponto de coleta, apontou-se que, no ponto 1 da Baixada Santista, as contagens de leveduras nas amostras de areia não apresentavam correlação significativa com os parâmetros microbiológicos; porém, notou-se correlação inversa, com os valores de condutividade (31,3 e 48,0) ($r = -0,964$ e $p = 0,003$) e os valores de salinidade (19,7 e 31,3) ($r = -0,964$ e $p = 0,003$) (Figura 8). Como os parâmetros condutividade e salinidade estão relacionados entre si nos gráficos de comparação, com os parâmetros microbiológicos, demonstrou-se apenas a salinidade (Figura 11).

O Ponto 2 foi considerado estatisticamente diferente do Ponto 1 ($p = 0,025$) e do Ponto 3 ($p = 0,002$). A frequência de leveduras foi 100%, porém a média da concentração foi de $3,2 \times 10^1$ UFC/100 mL, em meio CHROMagar; e $8,1 \times 10^1$ UFC/100 mL, em meio Agar Sabouraud Dextrose. Em todas as amostras de água ($n=7$) coletadas no Ponto 2 da Baixada Santista, os valores encontrados para os indicadores de contaminação fecal analisados ficaram abaixo dos valores estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 274/2000, indicando que esse local apresenta menores índices de impacto antropogênico.

No Ponto 3, em amostras de água de mar, houve correlação entre as concentrações de leveduras e coliformes termotolerantes ($r = 0,893$ e $p = 0,012$) (Figuras 10 e 11). Dessa forma, o ponto 3 foi considerado impróprio para banho, de

acordo com os critérios de balneabilidade (CONAMA, 2000), pois o valor foi superior a 2500 coliformes termotolerantes, por 100 mililitros.

Assim, verificadas as concentrações dos indicadores de contaminação fecal em amostras de água de mar, a Baixada Santista pode ser caracterizada como uma região de alta atividade antrópica (AAA).

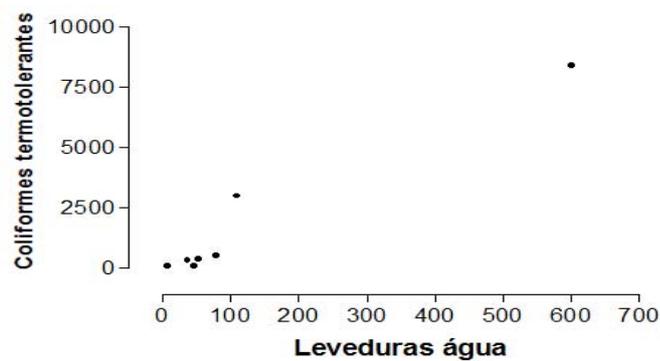


Figura 10. Correlação entre as concentrações de leveduras e coliformes termotolerantes de amostras de água, Santos–P3. ($r = 0,893$, $p = 0,012$)

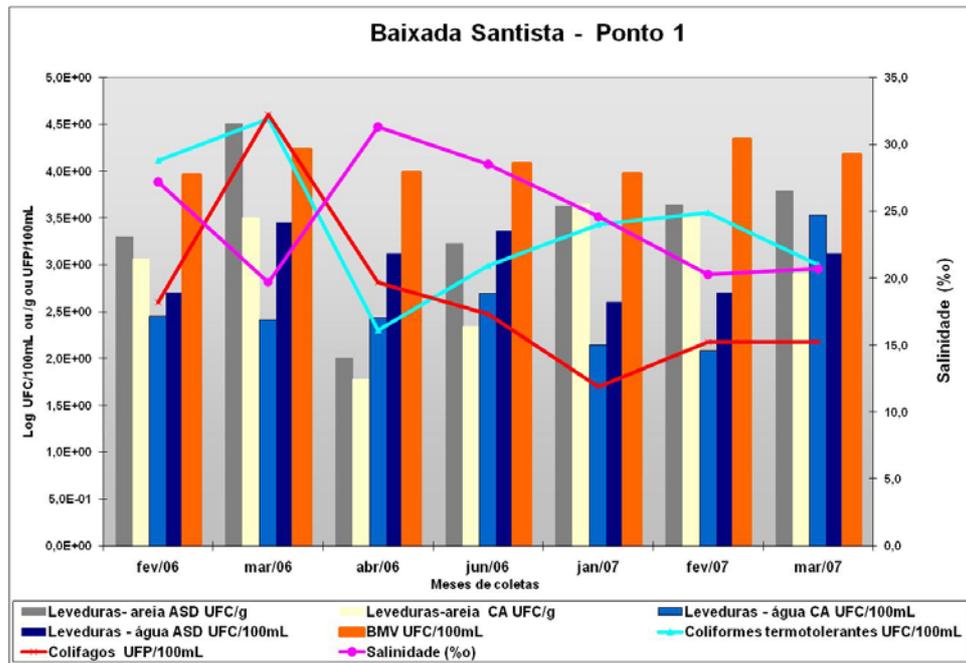


Figura 11. Variação dos parâmetros microbiológicos e salinidade avaliada na Baixada Santista, por tipo de amostra, ponto e data de coleta.

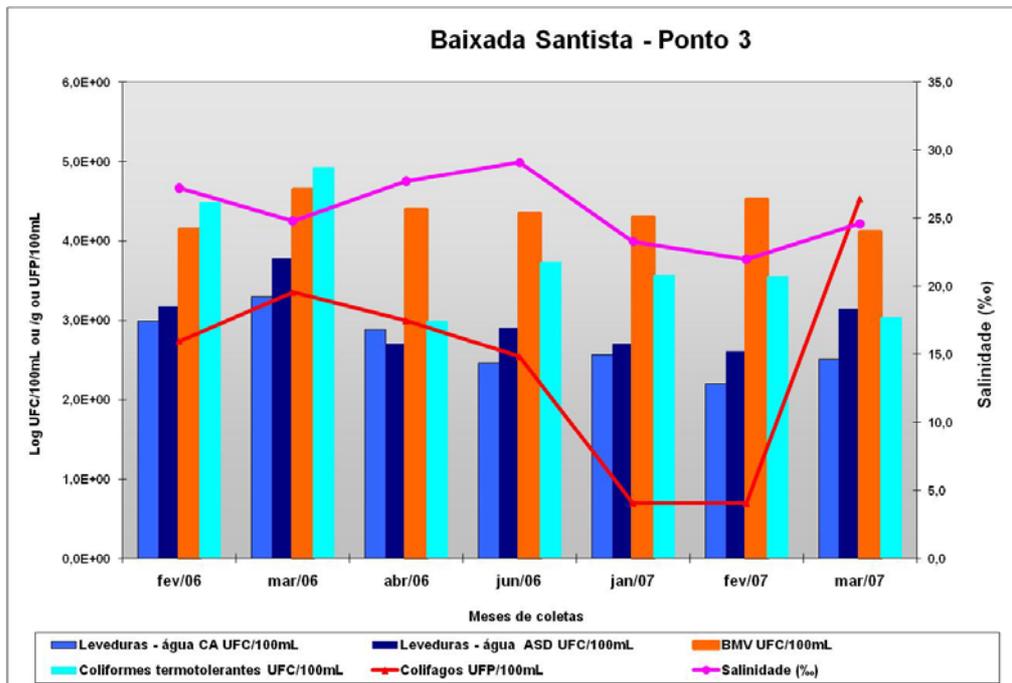
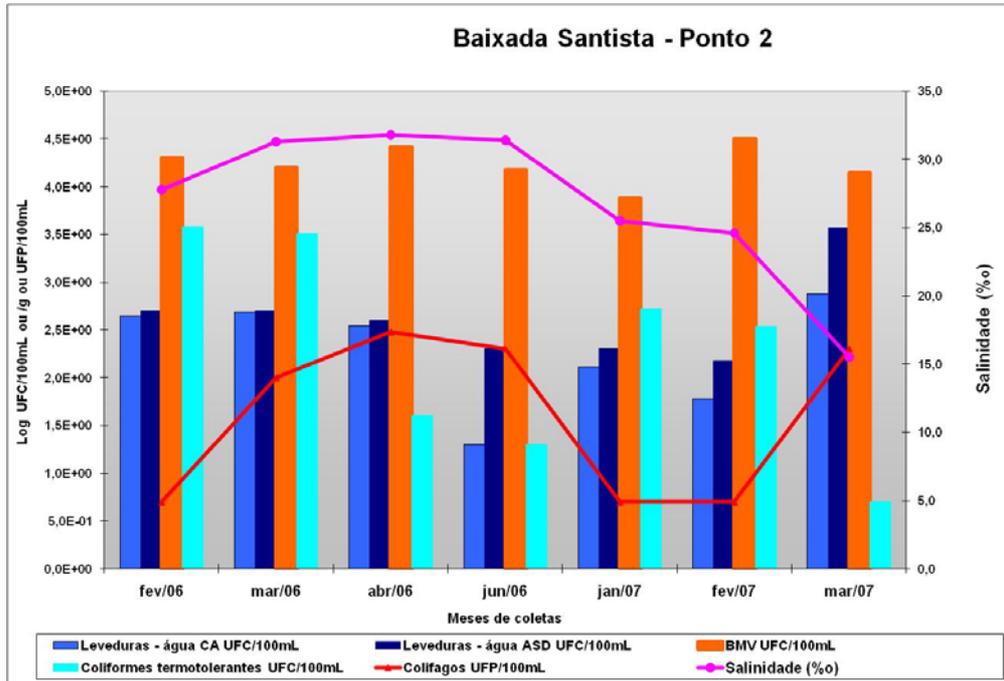


Figura 11. Variação dos parâmetros microbiológicos e salinidade avaliada na Baixada Santista, por tipo de amostra, ponto e data de coleta.

5.1.3 Ubatuba

Na região de Ubatuba, análises em amostras de água de mar mostraram os seguintes resultados para os parâmetros físico-químicos: condutividade entre 41,0 a 49,9 mS, pH entre 7,0 a 8,0, salinidade 26,4 a 31,7% e a temperatura entre 25,3 a 31,9°C. A análise estatística dos resultados mostram que não houve diferença estatística significativa entre os dois pontos de coletas, assim as médias foram utilizadas para análises e apresentação dos resultados (Tabela 4 e Figura 13).

Para as amostras de água do mar de Ubatuba, analisadas no período de 2006 e 2007, obtiveram-se contagens de leveduras, variando de <1 a $6,3 \times 10^2$ UFC/100 mL, em 91,7% das amostras, quando o meio ASD foi utilizado e com uma concentração pouco mais elevada de $1,0 \times 10^0$ UFC/100 mL, a $1,6 \times 10^3$ UFC/100 mL, com frequência de 100% no meio CHROMagar.

Não foram detectados enterococos intestinais e colifagos, sendo que coliformes termotolerantes e *E. coli* estiveram presentes apenas em 8,4% das amostras de água do mar (Tabela 4 e Figura 13).

Presentes em 100% das amostras de areia, as leveduras tiveram uma concentração de $6,0 \times 10^0$ a $1,6 \times 10^3$ UFC/g, no meio ASD e de $2,0 \times 10^0$ UFC/g a $4,6 \times 10^2$ UFC/g, no meio CHROMagar.

Em Ubatuba, as contagens de leveduras em amostras água de mar apresentaram correlação entre as contagens de leveduras e os valores de pH; entretanto, nas amostras de areia não evidenciaram correlação com nenhum parâmetro pesquisado.

Nas amostras de água de mar, coletadas no ponto 1, localizado na Marina, verificou-se correlação entre a concentração de leveduras e os valores de pH ($r = 0,926$ e $p = 0,017$), observando que nos meses de fevereiro/2006, fevereiro/2007 e março/07, meses de alta temporada, as concentrações de leveduras aumentaram, de acordo com o aumento do pH (Figuras 12 e 13).

No entanto, nas amostras de água no Ponto 2, localizado a mar aberto, não houve correlação com os outros fatores físico-químicos ou microbiológicos (Figura 13).

As baixas concentrações dos indicadores de contaminação fecal em amostras de água de mar analisadas, permite classificar Ubatuba como a região de baixa atividade antrópica (BAA).

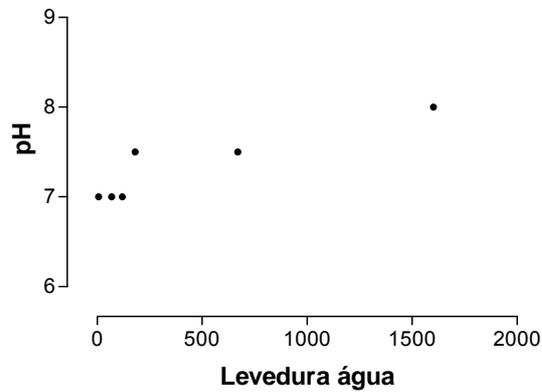


Figura 12. Correlação entre a concentração de leveduras e os valores de pH de amostras de água, Ubatuba-P1. ($r = 0,926$, $p = 0,017$)

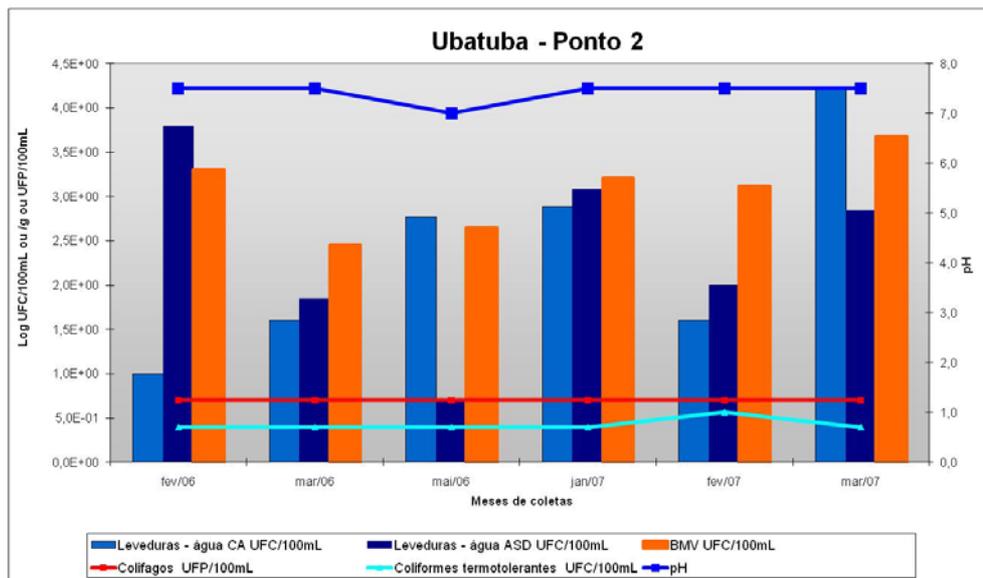
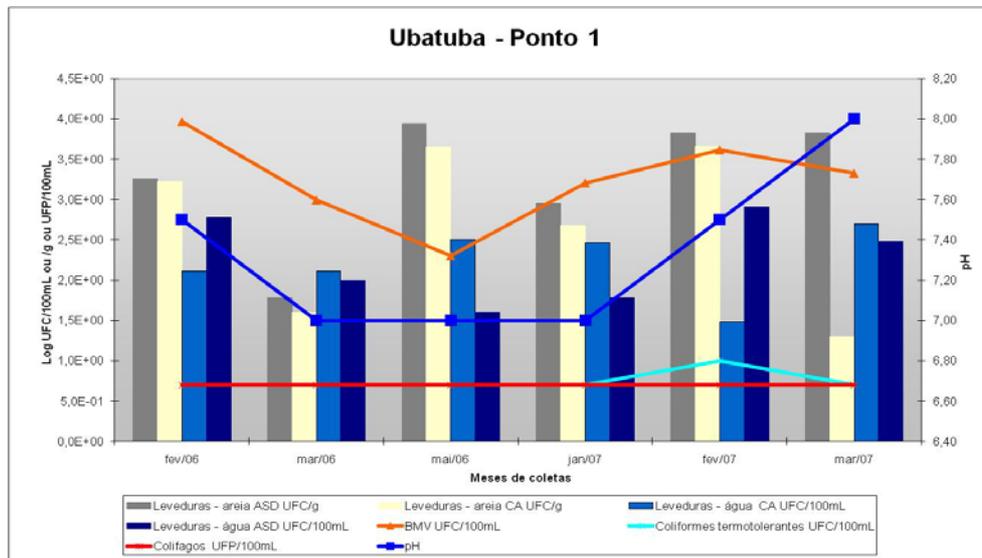


Figura 13. Variação dos parâmetros microbiológicos e pH avaliados na região de Ubatuba, por tipo de amostra, ponto e data de coleta.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Trichosporon* spp.

5.2.1 Caracterização fenotípica

Foram analisadas 73 amostras de água e 53 amostras de areia, coletadas em três regiões costeiras de São Paulo. Após a contagem de leveduras, utilizando-se dois meios de culturas, as colônias, que apresentavam cor e aspecto característicos de *Trichosporon* spp., foram transferidas para crescimento em placa, respeitando-se os respectivos meios, aos quais foram isolados. Foram assim selecionados 210 isolados morfológicamente suspeitos de *Trichosporon* spp., nos meios Agar Sabouraud Dextrose (102) e CHROMagar Candida (108) (Tabela 4).

5.2.1.1 Micromorfologia

Todos os 210 isolados de leveduras foram submetidos à caracterização micromorfológica.

Pelas características variáveis e freqüentes de *Trichosporon* spp., como a presença de artroconídios regulares de arestas arredondadas, ovais e em forma de barril; artroconídios cilíndricos; conídios alongados e cilíndricos; formação de hifas e pseudohifas com ramos laterais e conídios retangulares, foram selecionados 102 isolados suspeitos de *Trichosporon* spp., distribuindo-se: 59 isolados, em São Sebastião (Média Atividade Antrópica, MAA); 29, isolados, em Santos (Alta Atividade antrópica, AAA); e 14 isolados em Ubatuba (Baixa Atividade Antrópica, BAA).

Desses isolados obtidos de amostras de água de mar e areia, 46,1% foram isolados em ágar Sabouraud Dextrose - ASD (47); e 53,9%, em CHROMagar - CA (55) (Tabela 5).

5.2.1.2 Macromorfologia em meio Agar Sabouraud Dextrose e CHROMagar

Foram observadas as macrocolônias em meio Agar Sabouraud Dextrose e apresentaram expressões macromorfológicas variáveis entre si, de cor bege, às vezes, com induto branco, úmidas ou secas, lisas, cerebriformes ou radiadas, às vezes com aspecto rugoso ou pulverulento (Figura 14).

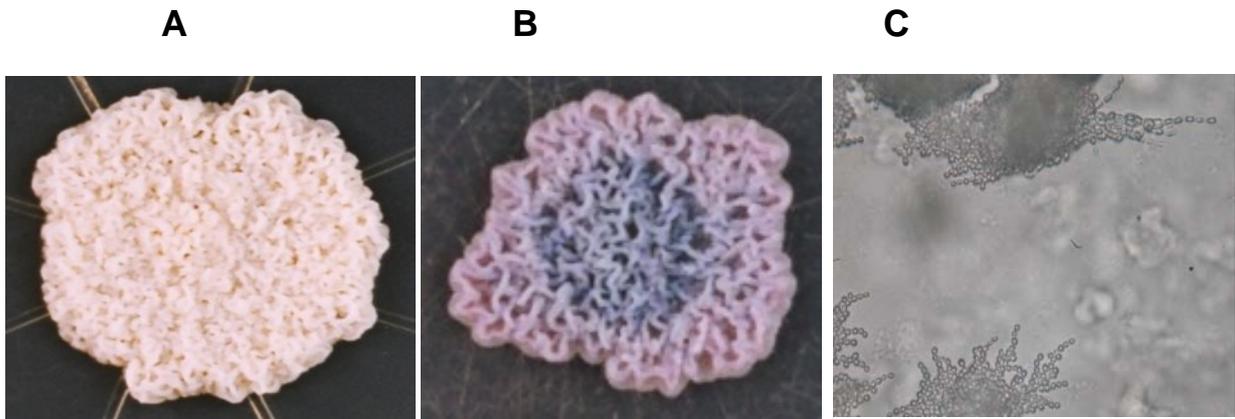
A morfologia apresentada, pelos isolados ambientais de amostras de água de mar e areia, foi comparada com cepas-controle. Houve uma variação entre as morfologias dos próprios isolados, porém alguns isolados apresentaram características morfológicas similares às cepas controles: cor bege, crescimento cerebriforme e aspecto rugoso.

Na avaliação em meio CHROMagar Candida, após 48 horas de incubação, foi observado o crescimento de colônias azuis, com centro lilás; e colônias lilás com centro verde. Algumas apresentaram zona marginal não pigmentada; e colônias, com centro, que variaram entre azul, rosa e lilás (Figura 14).

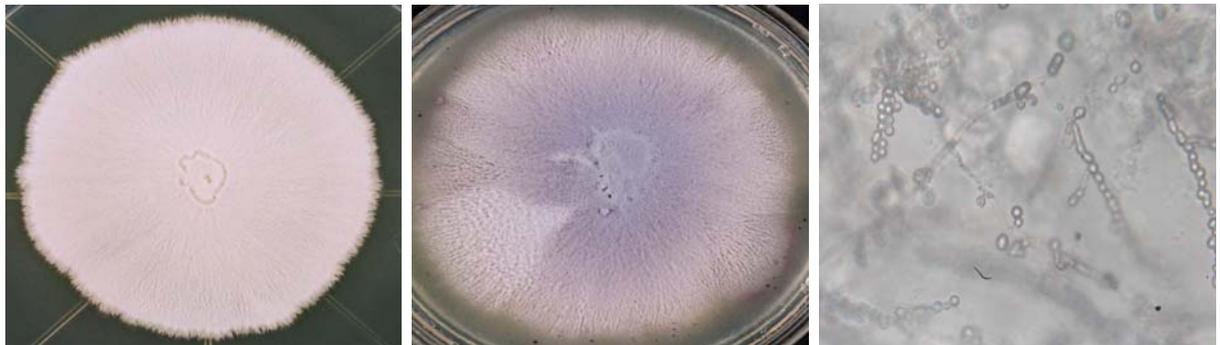
Tabela 5. Isolados suspeitos de *Trichosporon* spp., por tipos de meio de cultura, amostra e locais de isolamento

Área estudada	Tipo de amostra	Número de amostras		Isolados suspeitos de <i>Trichosporon</i> spp. Meio de Cultura*		Total de Isolados suspeitos de <i>Trichosporon</i> spp.
		ASD	CA	ASD	CA	
São Sebastião	Água	40	30	20	24	44
	Areia	40	30	08	07	15
Santos	Água	21	21	09	13	22
	Areia	07	07	04	03	07
Ubatuba	Água	12	12	05	05	10
	Areia	06	06	02	02	04
Total		126	106	48	54	102

* ASD= Ágar Sabouraud Dextrose, CA= CHROMagar Candida



ST 161 (Isolado de Santos – P2, amostra de água do mar)



ST 119 (Isolado de Santos – P3, amostra de água do mar)



ST 82 (Isolado de Santos – P3, amostra de água do mar)

Figura 14. Características macro e micromorfológicas de isolados de *Trichosporon* spp. de amostras de água e areia da região costeira do Estado de São Paulo.



ST 179 (Isolado de Santos, amostra de areia)



SS 588 (Isolado de São Sebastião – P1, amostra de água)

Figura 14. Características macro e micromorfológicas de isolados de *Trichosporon* spp. de amostras de água e areia da região costeira do Estado de São Paulo.

Legenda: **A.** colônias em meio Agar Sabouraud Dextrose, **B.** colônias em meio CHROMagar Candida e **C.** Micromorfologia em Agar Fubá-Tween 80.

5.2.1.3 Crescimento á duas temperaturas em meio Agar Sabouraud Dextrose e CHROMagar Candida

Após a caracterização preliminar das técnicas de micro e macrocultivo, os 102 isolados suspeitos de *Trichosporon* spp. foram submetidos ao crescimento à 25 °C e 37 °C.

As cepas controles do gênero *Trichosporon* (ATCC CBS 2479 – *T. asahii* e os padrões clínicos AC-57, AC-80 e AC-101 – *Trichosporon* spp.) foram incluídos.

Foram feitas medições do crescimento da colônia, nos períodos de 2, 3, 5, 7, 9, 12 e 15 dias. Após uma avaliação do crescimento das 5 cepas clínicas controles, obteve-se uma média do crescimento, que indicou 9 mm, num período de 9 dias à 37 °C. Dessa forma, utilizou-se dessa média para avaliar quanto tempo os isolados ambientais precisariam para atingir o mesmo crescimento.

Foi observado que os isolados de amostras de água de mar e areia comparados aos clínicos padrões, de maneira geral, apresentaram crescimento às duas temperaturas. Porém, quando comparados quanto às temperaturas de incubação, observou-se um maior número de isolados, com crescimento da colônia ≥ 9 mm, em menor tempo, quando incubados à 25 °C.

Na região de São Sebastião, obtiveram-se o crescimento da colônia ≥ 9 mm em 36,4% de isolados, incubados a 25 °C (em 5 dias); e 31,8% dos isolados à 37 °C (em 7 dias). Das amostras de água de mar e de amostras de areia, 40% (3 dias) e 26,7% (5 dias) dos isolados incubados, respectivamente à 25 °C e 37 °C tiveram o seu crescimento ≥ 9 mm.

A análise de crescimento da colônia (≥ 9 mm), dos isolados de Santos mostrou que em 5 dias, 45,5% atingiram a média de crescimento (a 25 °C) e em 3 dias, 36,4% (a 37 °C) dos isolados de água de mar. Em amostras de areia, à 25 °C, houve 42,8% dos isolados que atingiram o tamanho ≥ 9 mm em 3 dias; e à 37 °C, obteve-se 28,6%, da média estabelecida, em 7 dias de incubação.

Os isolados de Ubatuba, 30% e 40% de amostras de água de mar incubados, à 25 °C e 37 °C, respectivamente, mostraram um crescimento médio em 9 dias, mais tardio que dos isolados de Santos e São Sebastião, os quais, em 5 dias atingiram a média de crescimento. Quanto às amostras de areia de Ubatuba, 50% dos isolados cresceram em 3 dias, à 25 °C e 50% cresceram, em 7 dias, a 37 °C atingindo a média estabelecida, bem como os isolados de areia de Santos e São Sebastião que tiveram seu crescimento médio, em menor tempo, à 25 °C. (Figura 15, Tabela – Anexo B).

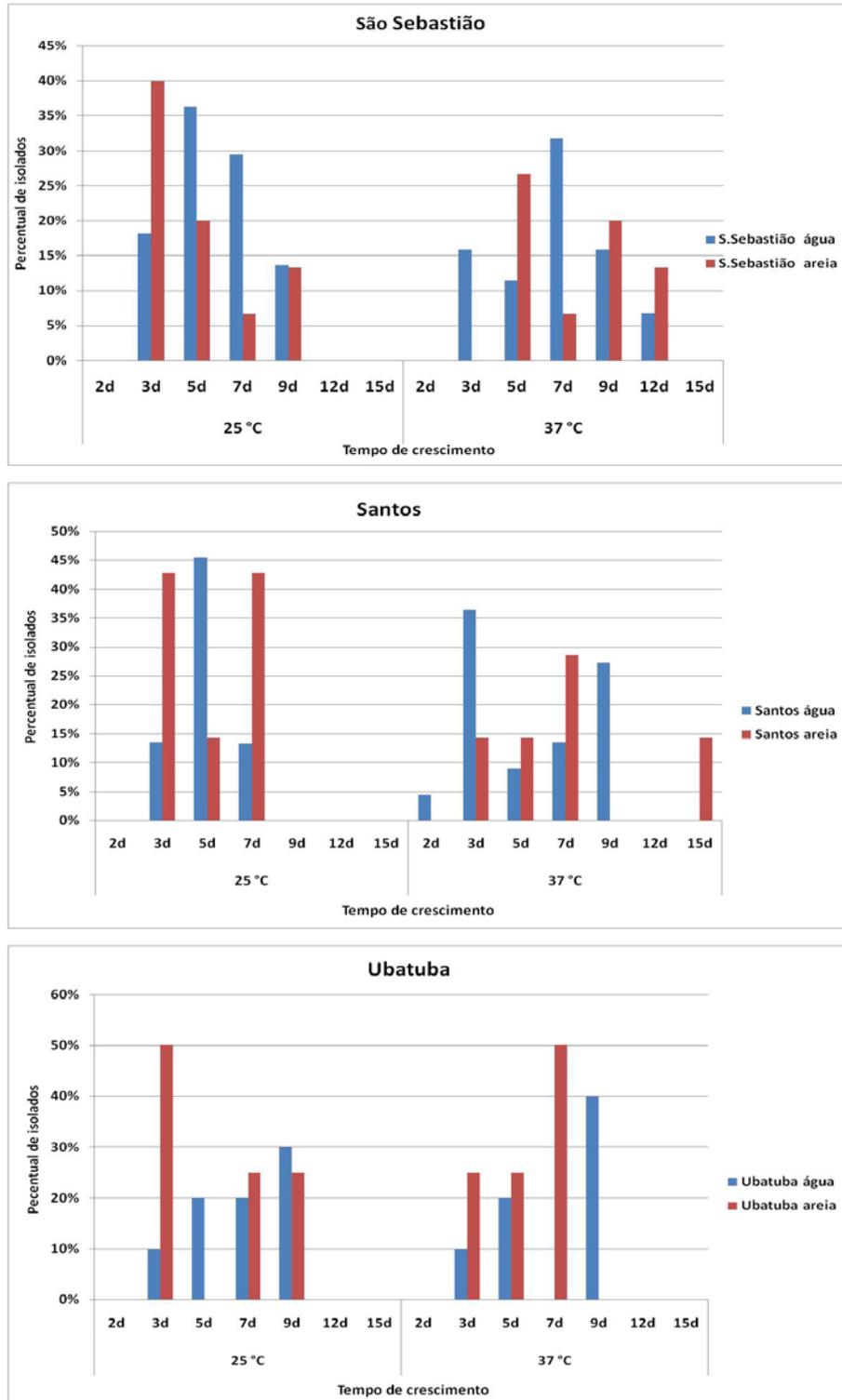


Figura 15. Variação de crescimento dos isolados suspeitos de *Trichosporon* spp., nas três regiões estudadas, por temperatura e tempo de incubação.

5.2.1.4 Produção de urease

Todos os isolados foram submetidos ao teste de produção de urease a duas temperaturas (25 °C e 37 °C). Dos 102 isolados de amostras de água (76) e areia (26) testados para produção de urease, 50% (51/102) foram positivos (Tabela 6). As amostras-padrão *T. asahii* (CBS 2479), *T. inkin* (CBS 5585), *T. mucoides* (CBS 7625) e *T. ovoides* (CBS 7556), empregadas como controles, também apresentaram positividade para produção de urease.

Tabela 6. Produção de urease por isolados suspeitos de *Trichosporon* spp. de amostras de água e areia de São Sebastião, Santos e Ubatuba, período 2005-2007, por temperatura e tempo de incubação.

São Sebastião	Isolados testados	Incubação 25 °C			Incubação 37 °C		
		Positivo 24 h	Positivo 48h	Negativo 48 h	Positivo 24h	Positivo 48 h	Negativo 48h
Água	44	12	08	24	10	05	29
		27,2%	18,2%	54,6%	22,8%	11,4%	65%
Areia	15	06	03	06	05	03	07
		40%	20%	40%	33,3%	20%	46,7%

Santos	Isolados testados	Incubação 25 °C			Incubação 37 °C		
		Positivo 24 h	Positivo 48h	Negativo 48 h	Positivo 24h	Positivo 48 h	Negativo 48 h
Água	22	04	07	11	08	03	11
		18%	31,8%	50%	36,3%	13,6%	50%
Areia	07	01	05	01	03	02	02
		14,3%	71,4%	14,3%	42,8%	28,6%	28,6%

Ubatuba	Isolados testados	Incubação 25 °C			Incubação 37 °C		
		Positivo 24 h	Positivo 48h	Negativo 48 h	Positivo 24h	Positivo 48 h	Negativo 48 h
Água	10	03	01	06	02	02	06
		30%	10%	60%	20%	20%	60%
Areia	04	1	02	01	2	2	0
		25%	50%	25%	50%	50%	0%
TOTAL	102	27	26	49	30	17	55
		26,5%	25,5%	48%	29,4%	16,7%	53,9%

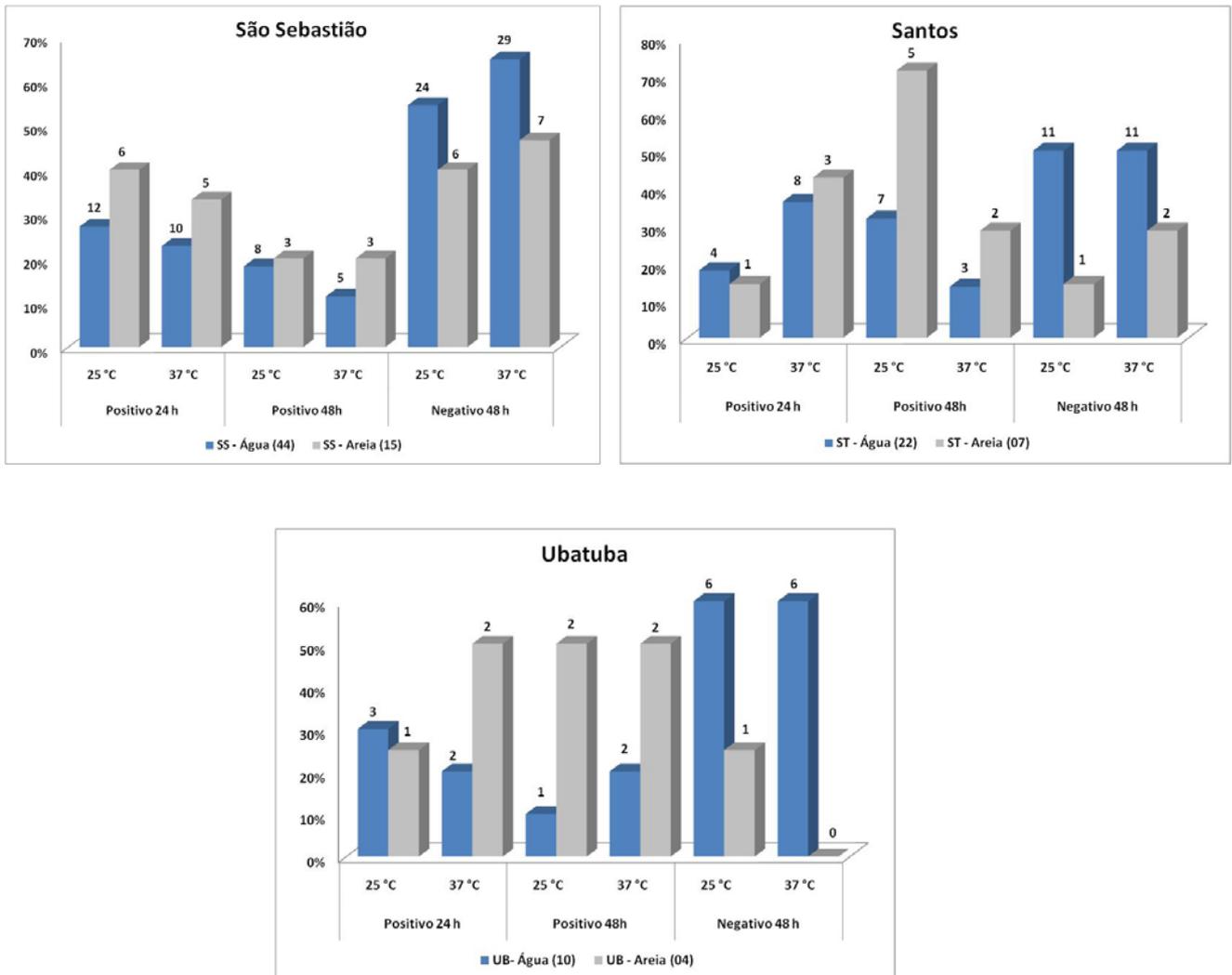


Figura 16. Produção de urease por isolados suspeitos de *Trichosporon* spp. de amostras de água e areia das três regiões estudadas, por temperatura e tempo de incubação.

De forma geral, para os isolados de amostras de água de mar e areia das três regiões estudadas, resultados mostram que a positividade para o teste de urease foi maior num período de 24 horas, quando incubados à 37 °C (29,4%). Para os isolados de amostras de água de mar, incubados por 24 h das regiões de São Sebastião (27,2%) e de Ubatuba (30%), tiveram melhor comportamento da enzima uréase à 25 °C. Entretanto, foi observado que as leveduras isoladas de amostras de água, na região de Santos, apresentaram um melhor comportamento da enzima uréase, quando incubadas à temperatura de 37 °C (36,3%) que à 25 °C (18%), no período de 24 horas

de incubação (Figura 16). Esse fato poderia estar relacionado à atividade antrópica e contaminação fecal presente na área.

Os resultados do teste de uréia foram avaliados estatisticamente para verificar o comportamento da uréase a duas temperaturas, e não houve diferença significativa nem por tipo de amostra, nem por local de coleta, nas amostras incubadas à 25 ° C, considerando o valor $\alpha < 0.05$. Porém, no teste realizado a 37 °C, houve diferença significativa para os isolados de São Sebastião, nas amostras de água e areia ($p=0.0108$).

5.2.1.5 Teste de assimilação de fontes de Carbono e Nitrogênio - Auxanograma

Pela técnica auxanograma, foi testada a assimilação de quinze fontes de carbono (adonitol, celobiose, dulcitol, melibiose, glicose, inositol, L-arabinose, lactose, maltose, rhamnose, rafinose, sacarose, sorbitol, xylitol, trealose) e uma fonte de nitrogênio (KNO_3) e peptona. O comportamento dos isolados no teste auxanograma foram observados diariamente, por 15 dias, verificando-se que 60% das amostras evidenciaram resultados positivos, em 96 horas, e o restante em até nove dias. A velocidade de crescimento, que pode ser rápida (< 7 dias), intermediária (8 a 14 dias) ou lenta (> 15 dias) é fundamental para a identificação pressuposta da levedura. Nos nossos isolados de *Trichosporon* spp., a velocidade de crescimento poderia ser considerada de rápida a intermediária, entretanto é recomendável realizar leituras até 15 dias.

No manual “*The Yeasts*” (1984), a chave de identificação para *Trichosporon* behend (basidiomicetos), é proposta utilizando os seguintes compostos de carbono: maltose, lactose, melibiose, celobiose, D-xilose, eritrol, ribitol e inositol; e de nitrogênio: nitrato. Entretanto, ela identifica entre os basidiomicetos somente 6 espécies de *Trichosporon*: *T. aquatile*, *T. brassicae*, *T. cutaneum*, *T. figueirae*, *T. inkin* e *T. pullulans*. (KREGGER-VAN RIJ, 1984). Na tabela 7 podemos observar os resultados obtidos com os 102 isolados de leveduras testados, onde apenas cinco açúcares foram avaliados e mostraram índices baixos para maltose, lactose, celobiose e xilose.

Tabela 7. Frequência comparativa da assimilação de substratos de acordo a chave proposta no manual “The Yeasts” (1984).

Compostos	Ma	La	Me	Ce	X	Er	Rib	I	NO ₃
“The Yeasts”	100%	83,3%	NU	100,0%	83,3%	66,7%	16,7%	33,3%	16,7%
Isolados	96,1%	50,0%	62%	54,9%	61,7%	NU	NU	47,0%	3,9%

Legenda – **Ma**: maltose; **La**: lactose; **Me**: melibiose; **Ce**: Celobiose; **X**: D-xilose; **ER**: eritritol; **Rib**: ribitol; **I**: Inositol; **NO₃**: nitrato, NU: não utilizado.

Para a identificação de leveduras do gênero *Trichosporon* utilizamos cinco chaves de assimilação de substratos de carbono e nitrogênio: 1) Ahearn, 1970 o qual utiliza 11 substratos e identifica 2 espécies *Trichosporon cutaneum* e *Trichosporon pullulans*; 2) Koneman, 1987, que utilizou 10 substratos para identificar apenas a espécie *Trichosporon beigeli*; 3) Kurtzman e Fell, 1998, que usaram 9 substratos e caracterizam apenas o gênero *Trichosporon*; 4) De Hoog, 2000, usando 4 substratos contemplou cinco espécies (*T. asahii*, *T. cutaneum*, *T. inkin*, *T. mucoides* e *T. ovoides*) e 5) Rodriguez-Tudela *et al.*, 2005, que identifica 12 espécies (*T. asahii*, *T. asteróides*, *T. coremiiforme*, *T. cutaneum*, *T. dermatis*, *T. faecale*, *T. inkin*, *T. japonicum*, *T. jirovecii*, *T. montevidense*, *T. mucoides* e *T. ovoides*), utilizando 8 substratos. Os dois últimos (De Hoog e Rodriguez-Tudela), além dos açúcares, também utilizam outros três testes que fazem parte da chave de identificação: termotolerância a 37 °C, tolerância a 0,1% de cicloheximida e a presença ou não de apresorio (Tabela 8).

Tabela 8. Comparação dos substratos e testes empregados nas chaves de identificação de *Trichosporon* spp., de acordo aos autores.

Autores	Ahearn, 1970	Koneman, 1987	Kurtzman e De Fell, 1998	De 2000	Hoog,	Rodrigues-Tudela, 2005
Nº de <i>Trichosporon</i>	2	1(a)	1(b)		5	12
Nº Carboidratos	11	10	9	4 e (37 °C, 0,1% e app)		8 e (37 °C, 0,1% e app)
Substratos e outros testes empregados	dextrose	-			-	-
	celbiose	celbiose	celbiose		-	-
	-	dulcitol	-		-	galactitol (dulcitol)
	inositol	-	inositol		mio-inositol	inositol
	lactose	lactose	lactose			
					l-arabinose	l-arabinitol
	maltose	maltose	maltose		-	-
	melbiose	melbiose	-		melbiose	melbiose
	-	nitrato	nitrato		-	-
	rafinoose	rafinoose	rafinoose		-	rafinoose
	rhamnoso	-	-		-	rhamnoso
	-	-	-		-	ribitol (Adonitol)
	sacaroso	sacaroso	sacaroso		-	-
	-	-	-		sorbitol	-
	trealoso	trealoso	trealoso		-	-
	xiloso	xiloso	xiloso		-	xylitol
-	-	-		-	-	
-	-	-		0,1% CH	0,1% CH	
-	-	-		37 °C	37 °C	
-	-	-		apressório	apressório	

Legenda: 37 °C - Teste de crescimento a 37 °C, 0,1% - Teste de crescimento a 0,1% de cicloheximida, app – presença de apressorio, Número de *Trichosporon* – 1(a). (Koneman) identifica apenas a espécie *Trichosporon beigeli*; 2. (Ahearn, 1970) identifica *Trichosporon cutaneum* e *Trichosporon pullulans*; 1(b). (Kurtzman, 1998) caracteriza apenas o gênero *Trichosporon*, 5. (De Hoog, 2000) identifica as espécies *T. asahii*, *T. cutaneum*, *T. inkin*, *T. mucoides* e *T. ovóides* e 12. (Rodrigues-Tudela, 2005) identifica as espécies *T. asahii*, *T. asteróides*, *T. coremiiforme*, *T. cutaneum*, *T. dermatis*, *T. faecale*, *T. inkin*, *T. japonicum*, *T. jirovecii*, *T. montevideense*, *T. mucoides* e *T. ovoides*.

Inicialmente, fizemos a avaliação do teste de auxanograma dos controles (ambientais e clínicos) utilizados e pudemos observar que houve diferenças na identificação de acordo com cada chave utilizada. Entre eles, o controle CBS 2479 de *Trichosporon asahii* foi identificado em nível de espécie utilizando as chaves de De Hoog e Rodrigues-Tudela, porém, para as chaves de Ahearn, Koneman e Kurtzman, foi respectivamente identificado como *T. beigelli*, *T. cutaneum* e *Trichosporon* spp.. O controle clínico AC-80 e o controle ambiental 143-B, pertencentes ao gênero *Trichosporon* foram identificados com diferentes espécies para cada chave. Um dos controles utilizados para o gênero *Trichosporon*, 75-B não foi identificado utilizando as chaves de De Hoog e Rodrigues Tudela. Podemos assim considerar, que para esse controle, bem como para os isolados, não identificados pelas duas chaves mais atuais, que não contemplam a espécie a ser identificada, uma vez que a chave de De Hoog identifica apenas 5 espécies de *Trichosporon* e a de Rodrigues-Tudela pode identificar até 8 (Tabela 9).

Tabela 9. Resultados de identificação das cepas controle de *Trichosporon* spp. utilizando cinco chaves.

Origem do isolado	(AHEARN, 1970)	(KONEMAN, 1987)	(KURTZMAN, 1998)	(De HOOG, 2000)	(RODRIGUES-TUDELA, 2005)
Controle Clínico					
<i>Trichosporon asahii</i> (CBS 479)	<i>T. cutaneum</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T. spp.</i>	<i>T. asahii</i>	<i>T. asahii</i>
<i>Trichosporon</i> spp. (AC-80)	<i>T. cutaneum</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T. spp.</i>	<i>T. mucoides</i>	<i>T. mucoides</i>
Controle Ambiental					
<i>Trichosporon</i> spp. (75-B)	<i>T. cutaneum</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T. spp.</i>	-	-
<i>Trichosporon</i> spp. (143-B)	<i>T. cutaneum</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T. spp.</i>	<i>T. mucoides</i>	<i>T. mucoides</i>

Posteriormente, analisamos os 102 isolados testados quanto à assimilação de carboidratos, com cinco diferentes chaves de identificação. Utilizando a chave Ahearn, 1970, (11 substratos) que contempla as espécies *T. cutaneum* e *T. pullulans*, pudemos identificar 26 isolados (14 de São Sebastião, nove de Santos e três de Ubatuba). Quando optamos pela chave de Koneman, 1987, (10 substratos) que contempla a espécie *T. beigelli*, foi identificado 20 isolados (11 de São Sebastião, sete de Santos,

dois de Ubatuba). Com a chave de Kurtzman, 1998, 27 isolados foram identificados quanto ao gênero *Trichosporon* spp (13 de São Sebastião, 10 de Santos e 4 de Ubatuba). Para a chave de identificação de De Hoog, 2000, (quatro substratos e três testes complementares) cinco espécies podem ser observadas (*T. asahii*, *T. cutaneum*, *T. inkin*, *T. mucoides* e *T. ovóides*), assim, nós obtivemos 16 isolados identificados (10 de São Sebastião, quatro de Santos e dois de Ubatuba). Verificando a chave de Rodrigues-Tudela, 2005, (oito substratos e três testes complementares) para 12 espécies de *Trichosporon* (*T. asahii*, *T. asteróides*, *T. coremiiforme*, *T. cutaneum*, *T. dermatis*, *T. faecale*, *T. inkin*, *T. japonicum*, *T. jirovecii*, *T. montevidense*, *T. mucoides* e *T.ovoides*), nos identificamos 15 isolados (cinco de São Sebastião, oito de Santos e dois de Ubatuba) (Tabelas 10 e 11).

Tabela 10. Resultados do auxanograma utilizando chaves distintas para identificação de *Trichosporon* spp.

Origem do isolado	Amostra	Ponto	Nº Isolado	(AHEARN, 1970)	(KONEMAN, 1987)	(KURTZMAN, 1998)	(De HOOG, 2000)	(RODRIGUE S-TUDELA, 2005)
São Sebastião	Água	P2	SS 17	<i>T.cutaneum</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T. spp.</i>	-	-
		P1	SS 31	<i>T.cutaneum</i>	-	<i>T. spp.</i>	<i>T.mucooides</i>	-
		P2	SS 247	<i>T.cutaneum</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T. spp.</i>	<i>T.mucooides</i>	-
		P1	SS 282	<i>T.cutaneum</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T. spp.</i>	<i>T.mucooides</i>	<i>T. mucooides</i>
		P1	SS 290	<i>T.cutaneum</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T. spp.</i>	<i>T.mucooides</i>	<i>T. mucooides</i>
		P1	SS 294	<i>T.cutaneum</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T. spp.</i>	-	-
		P1	SS 295	<i>T. pullulans</i>	-	-	<i>T.cutaneum</i>	-
		P1	SS 296	<i>T.cutaneum</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T. spp.</i>	-	-
		P2	SS 299	<i>T.cutaneum</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T. spp.</i>	<i>T.mucooides</i>	<i>T. mucooides</i>
		P2	SS 426	<i>T.cutaneum</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T. spp.</i>	<i>T.mucooides</i>	<i>T.mucooides</i>
		P2	SS 524	<i>T.cutaneum</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T. spp.</i>	-	-
		P1	SS 591	-	-	-	-	-
		P1	SS 603	<i>T.cutaneum</i>	-	-	-	-
	P2	SS 609	-	-	-	-	-	
	P2	SS 617	-	-	-	<i>T. mucooides</i>	-	
	Areia	P1	SS 304	-	-	<i>T. spp.</i>	-	-
		P1	SS 308	-	-	-	-	<i>T. japonicum</i>
		P1	SS 624	-	-	-	-	-
		P1	SS 625	<i>T.cutaneum</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T. spp.</i>	<i>T.mucooides</i>	-
		P1	SS 626	-	-	-	<i>T.mucooides</i>	-
P1		SS 627	<i>T.cutaneum</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T. spp.</i>	-	-	
P1	SS 630	-	-	-	-	-		
Subtotal			22	14	11	13	10	5
Santos	Água	P3	ST 31	<i>T.cutaneum</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T. spp.</i>	-	-
		P3	ST 81	-	-	-	-	<i>T.japonicum</i>
		P3	ST 82	<i>T.cutaneum</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T. spp.</i>	-	<i>T.cutaneum</i>
		P3	ST 119	<i>T.cutaneum</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T. spp.</i>	<i>T.mucooides</i>	<i>T. mucooides</i>
		P2	ST 161	-	-	<i>T. spp.</i>	-	-
		P1	ST 189	<i>T.cutaneum</i>	-	<i>T. spp.</i>	-	-
		P1	ST 195	-	-	-	-	<i>T.japonicum</i>
		P2	ST 200	-	-	-	-	<i>T.japonicum</i>
		P3	ST 205	<i>T.cutaneum</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T. spp.</i>	<i>T.mucooides</i>	-
	P3	ST 217	-	-	-	-	-	
	P3	ST 371	<i>T.cutaneum</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T.spp</i>	-	<i>T.dermatis</i>	
	Areia	P1	ST 131	<i>T.cutaneum</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T.spp</i>	<i>T.mucooides</i>	<i>T.dermatis</i>
		P1	ST 182	<i>T.cutaneum</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T. spp.</i>	-	<i>T. mucooides</i>
P1		ST 183	<i>T.cutaneum</i>	-	<i>T. spp.</i>	-	-	
P1		ST 299	-	-	-	<i>T.mucooides</i>	-	
Subtotal			13	9	7	10	4	8
Ubatuba	Água	P1	UB 55	-	-	<i>T. spp.</i>	-	-
		P1	UB 57	-	-	-	-	-
		P2	UB 59	<i>T.cutaneum</i>	-	<i>T. spp.</i>	<i>T. mucooides</i>	<i>T. dermatis</i>
	P2	UB 62	-	-	-	-	-	
Areia	-	UB 13	<i>T.cutaneum</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T. spp.</i>	-	-	
	-	UB 118	<i>T.cutaneum</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T. spp.</i>	<i>T.mucooides</i>	<i>T.mucooides</i>	
Subtotal			6	3	2	4	2	2
Total geral			41	26	20	27	16	15

Legenda: **P1:** Ponto 1, **P2:** Ponto 2, **P3:** Ponto 3.

Tabela 11. Número de espécies de *Trichosporon* identificadas de acordo com 5 chaves distintas.

Local	Espécie	(AHEARN, 1970)	(KONEMAN, 1987)	(KURTZMAN, 1998)	(De HOOG, 2000)	(RODRIGUES- TUDELA, 2005)
São Sebastião	<i>T.beigelii</i>	-	11	-	-	-
	<i>T.cutaneum</i>	13	-	-	1	-
	<i>T.japonicum</i>	-	-	-	-	1
	<i>T.mucooides</i>	-	-	-	9	4
	<i>T.pullulans</i>	1	-	-	-	-
	<i>T.spp.</i>	-	-	13	-	-
Santos	<i>T.beigelii</i>	-	7	-	-	-
	<i>T.cutaneum</i>	9	-	-	-	1
	<i>T.dermatis</i>	-	-	-	-	2
	<i>T.japonicum</i>	-	-	-	-	3
	<i>T.mucooides</i>	-	-	-	4	2
	<i>T.spp.</i>	-	-	10	-	-
Ubatuba	<i>T.beigelii</i>	-	2	-	-	-
	<i>T.cutaneum</i>	3	-	-	-	-
	<i>T.dermatis</i>	-	-	-	-	1
	<i>T.mucooides</i>	-	-	-	2	1
	<i>T.spp.</i>	-	-	4	-	-
Total isolados testados 102		26	27	20	16	15
Clínica - <i>T.asahii</i> (CBS 2479)		<i>T.cutaneum</i>	<i>T.spp.</i>	<i>T.beigelii</i>	<i>T.asahii</i>	<i>T.asahii</i>
Clínica - <i>T. spp.</i> (AC-80)		<i>T.cutaneum</i>	<i>T.spp.</i>	<i>T.beigelii</i>	<i>T.mucooides</i>	<i>T.mucooides</i>
Ambiental - <i>T. spp.</i> (75-B)		<i>T.cutaneum</i>	<i>T.spp.</i>	<i>T.beigelii</i>	-	-
Ambiental I- <i>T. spp.</i> (143-B)		<i>T.cutaneum</i>	<i>T.spp.</i>	<i>T.beigelii</i>	<i>T.mucooides</i>	<i>T.mucooides</i>

Dessa forma, nessa pesquisa a variação de substratos levou a resultados diferentes, quando se aplicaram diferentes chaves de identificação. Assim, a reprodutibilidade e acurácia desses métodos fenotípicos foram bastante inconsistentes, quando da identificação de diferentes espécies de *Trichosporon* em isolados de amostras de água de mar e areia de regiões costeiras.

Por esta razão, faz-se necessária, a seguir, uma avaliação da freqüência da assimilação dos substratos utilizados no teste auxanograma: O número de substratos

positivos, utilizados no teste auxanograma dos isolados suspeitos de *Trichosporon* spp., variou de acordo com a região e o tipo de amostra.

Os percentuais de positividade acima de 50% para os açúcares utilizados nos testes, com isolados das três regiões estudadas foram: maltose (96%), sacarose (89,2%), sorbitol e trealose (86,2%), L-arabinose (83,3%), melibiose e xylose (62%), adonitol (71,5%), celobiose (54,9%). Até 50% de positividade obteve-se: dulcitol (29,4%), rhamnose (42,1%), rafinose (46%), inositol (47%) e lactose (50%). Os substratos glicose e peptona, como deveriam, tiveram 100% de positividade, em todos os isolados, independente da amostra e da região estudada. Com o mesmo percentual (100%), outros açúcares foram representados, porém em amostras e locais distintos: adonitol, celobiose, L-arabinose, maltose, rafinose, sacarose, sorbitol, xylitol, trealose e peptona em amostra de areia de Ubatuba e celobiose, maltose, rafinose, sacarose, em amostra de areia de Santos. Para amostras de água, também com 100% de positividade, obteve-se: L-arabinose, maltose, sacarose, sorbitol e trealose para a região de Ubatuba; e, apenas L-arabinose, em São Sebastião.

Com as menores taxas de positividade, notou-se: dulcitol com 29,5% e rhamnose, com 33,3%, em amostras de água e areia, respectivamente, da região de São Sebastião; dulcitol, com 18,2% e 28,5%, respectivamente, para amostras de água de mar e areia de Santos. Para a região de Ubatuba, o açúcar inositol com 10% para amostra de água; e, em areia a menor taxa foi de 50% de positividade para os açúcares: dulcitol, inositol, lactose e rhamnose (Figura 17).

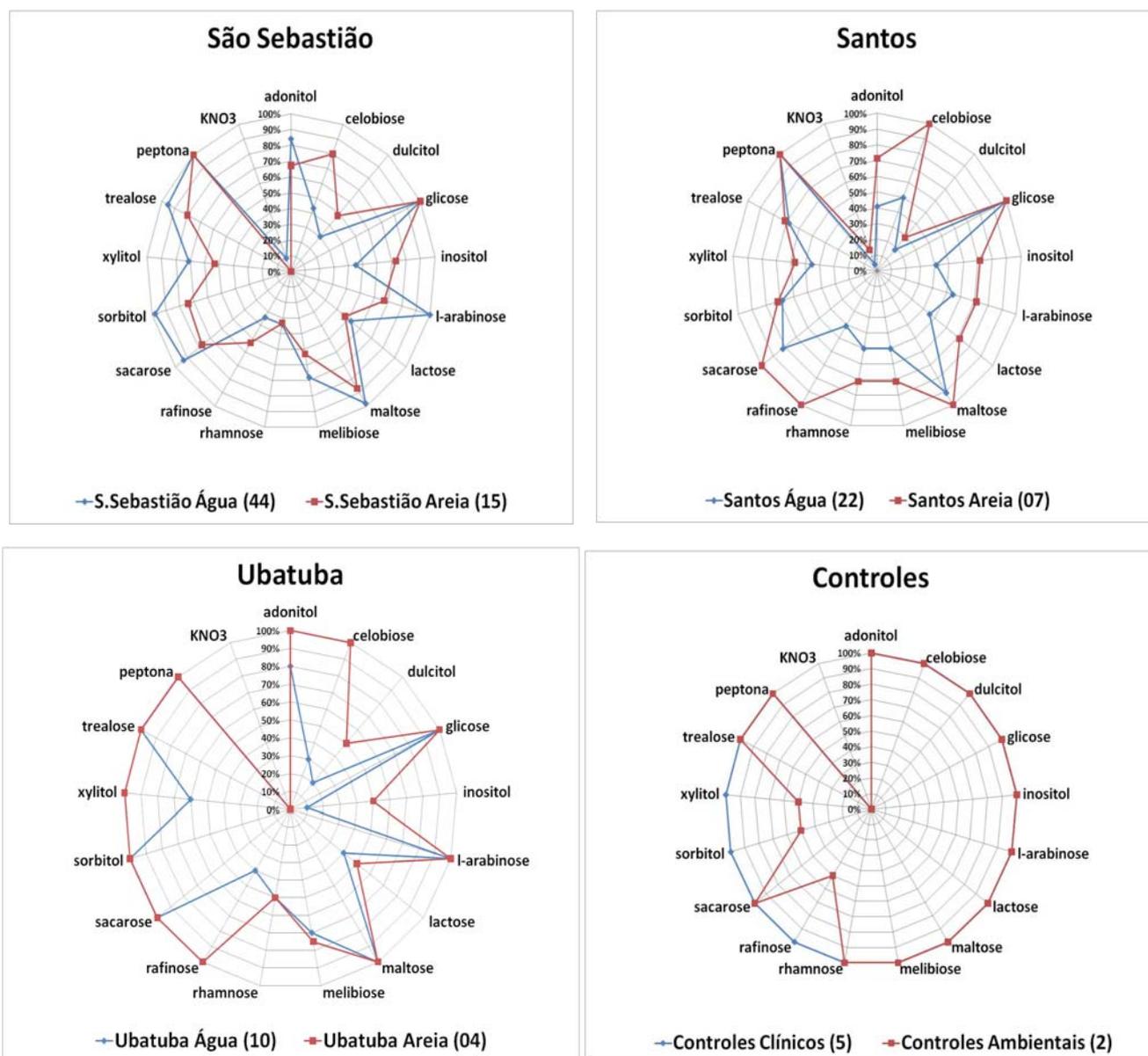


Figura 17. Percentual de substratos positivos no auxanograma para as leveduras isoladas de acordo com a região e tipo de amostra.

5.2.1.6 Tolerância a cicloheximida

No teste a tolerância e crescimento em Agar Sabouraud Dextrose, suplementado com 0,1% de cicloheximide, obtiveram-se 56,8% (58/102) de positividade para o total de isolados testados. Dos 58 isolados tolerantes à cicloheximida, 61,5% foram de

amostras de São Sebastião, com o maior número de isolados, com tolerância à cicloheximida, em relação aos isolados de Santos e Ubatuba que apresentaram menores índices, respectivamente, 26,3% e 12,2% (Figura 18).

Quando analisamos os isolados de São Sebastião e Santos, apresentaram crescimento na presença de 0,1% de cicloheximida, em um percentual de: 59,3% (35/59), 55,17% (16/29), respectivamente. Para Ubatuba, o índice de crescimento e tolerância a cicloheximida foi um pouco menor, com 50%, lembrando que o número de isolados é também inferior (7/14).

Como controle no teste foram utilizadas 4 cepas padrões clínicas (*T. asahii* CBS-2479 e *T. spp.*, AC-57, AC-80, AC-101), e nenhuma delas foram resistentes à cicloheximida (100%). Foram, ainda, testadas 6 cepas padrões ambientais (*T. spp.* 75-A, 75-B, 132-A, 132-B, 143-A e 143-B) e 2 delas (33,3%) foram negativas para o teste, não apresentando crescimento na presença de 0,1% de cicloheximida, porém as 4 restante (66,7%) tiveram crescimento, ou seja, foram tolerantes à presença de 0,1% de cicloheximida.

Na análise estatística para os resultados de cicloheximida para todos os isolados ambientais não houve nenhuma diferença significativa nem por local de coleta nem por amostras ($\alpha < 0.05$).

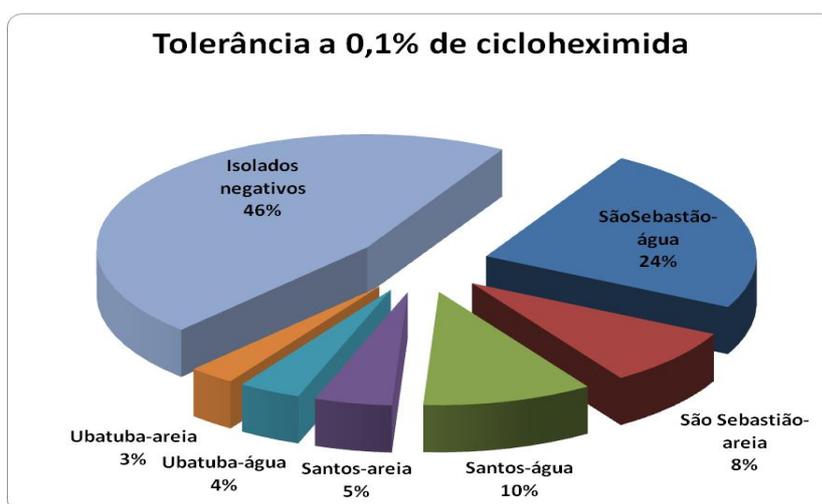


Figura 18. Frequência de isolados que apresentaram tolerância a 0,1% de cicloheximida, por amostra e região estudada.

5.2.1.7 Identificação semi-automatizada (ID 32 C[®]) (Biomerieux, Marcy-l'Étoile, França[®])

Do total de isolados testados (86), 32,5% foram identificados como *Trichosporon mucoides*, considerando um nível de acurácia $\geq 85\%$ pela leitura no programa. Dos 86 isolados testados, obtiveram-se 17 (32%) dos isolados de São Sebastião; 08 (35%) dos isolados, de Santos; e, 03 (27%) dos isolados, de Ubatuba identificados como *Trichosporon mucoides* (Tabela 9). Do total de isolados, 28 isolados identificados como *Trichosporon mucoides*, o sistema considerou os seguintes perfis: (20) boa identificação, (02) fraca discriminação, (01) inaceitável e (05) perfil duvidoso.

Os resultados da identificação pelo teste ID 32C dos isolados de *Trichosporon* spp., de amostras de água de mar e areia, não apresentaram diferença significativa nem por tipo de amostra, nem por local de coleta ($\alpha < 0,05$).

Tabela 12. Isolados identificados pelo teste API ID 32 C, das três regiões costeiras de São Paulo, por tipo de amostra.

Local	Amostra	Nº de isolados testados	Nº Identificado como <i>T. mucoides</i> em cada amostra pelo API ID 32C		Porcentagem identificada como <i>Trichosporon</i> spp.
			1ª opção	2ª opção	
São Sebastião (59)	Água	39	08	03	21,1%
	Areia	13	6	0	11,5%
Santos (29)	Água	19	7	0	30,4%
	Areia	4	1	0	4,3%
Ubatuba (14)	Água	9	3	0	27%
	Areia	2	0	0	0%
TOTAL 102		86	25	03	32,5%
Clínicas	<i>T. asahii</i> (CBS2479)	3	<i>T. asahii</i>	0	100%
	<i>T. spp.</i> (AC-57)		<i>T. mucoides</i>		
	<i>T. spp.</i> (AC-101)		<i>T. asahii</i>		
Ambientais	<i>T. spp.</i> (75-A)	3	<i>Candida parapsilosis</i>	0	0%
	<i>T. spp.</i> (75-B)		<i>Stephanoascus ciferrii</i>		
	<i>T. spp.</i> (132-B)		<i>Cryptococcus humicola</i>		

5.2.1.8 Produção de enzimas extracelulares

Os testes foram realizados com incubação a duas temperaturas (25 °C e 37 °C).

5.2.1.8.1 Proteinase

Neste experimento, para os isolados de água de mar da região de São Sebastião, foi obtida atividade da produção de proteinase em 84% e 77,3%, com incubação de 25 °C e 37 °C, respectivamente. Quanto aos isolados de amostras de areia, foram 66,7% (à 25 °C) e 60% (à 37 °C) para atividade positiva de proteinase.

Em amostras da Baixada Santista, os resultados da atividade positiva foram 36,4% (à 25 °C) e 22,7% (à 37 °C) em amostras de água do mar e 71,4% (à 25 °C) e 57,1% (à 37 °C) em amostras de areia.

Para a atividade de proteinase em isolados de Ubatuba, foram 50% (a 25 °C) e 40% (a 37 °C) em amostras de água do mar; e para amostras de areia 50% (a 25 °C) e 0% (a 37 °C) de atividade positiva.

O maior índice de positividade foi observado nos isolados de São Sebastião. Entre o total de isolados testados, a maior atividade para proteinase foi quando submetida à incubação de 25 °C (65,7%) do que quando incubada a 37 °C (54,9%) (Figura 19).

Entre os isolados de água de mar das regiões de São Sebastião, Santos e Ubatuba houve diferença significativa ($p=0.0002$) na expressão de proteinase, quando os isolados foram incubados à temperatura de 25 °C. Enquanto para os isolados de areia, para as três regiões, não se apresentou diferença significativa ($\alpha<0.05$). Para a análise da expressão de proteinase à temperatura de 37 °C, houve uma diferença significativa entre os isolados de água de mar para as regiões de São Sebastião, Santos e Ubatuba ($p=0.0002$), contrário aos resultados da análise dos isolados de amostras de areia que não apresentaram nenhuma diferença significativa ($\alpha<0.05$). De forma geral, para as análises de isolados de amostras de água e areia nas três regiões não houve diferença significativa ($\alpha<0.05$).

5.2.1.8.2 Fosfolipase

Os resultados da atividade de fosfolipase em isolados de água de mar de São Sebastião foram de 20,5% e 68,2% para as incubações de 25 °C e 37 °C, respectivamente. Quanto às amostras de areia foram positivas em 40% (a 25 °C) e 46,7% (a 37 °C).

Para os testes, em isolados de Santos, obteve-se positividade em 50% (à 25 °C) e 59% (à 37 °C) dos isolados de amostras de água e 71,4% (à 25 °C) e 42,8% (à 37 °C), dos isolados de amostras de areia.

Os isolados de amostras de água da região de Ubatuba não apresentaram positividade quando incubados à 25 °C, porém foram positivos em 40% dos isolados incubados à 37 °C. Para as amostras de areia, houve positividade em 25% dos isolados incubados à 25 °C e, não houve atividade quando incubados à 37 °C.

No total das amostras, a maior atividade de fosfolipase ocorreu em isolados de Santos. De forma geral, a produção de fosfolipase foi positiva em 55,9% dos isolados ambientais incubados à 37 °C, e, apenas, 31,4% dos isolados incubados à 25 °C (Figura 19).

Entre os isolados de água de mar das regiões de São Sebastião, Santos e Ubatuba houve diferença significativa ($p=0.0005$) na expressão de fosfolipase à 25 °C. Para os isolados de areia, das três regiões não houve diferença significativa. Considerando os isolados de amostras de água das três regiões, a análise da expressão de fosfolipase à 37 °C, não apresentou diferença significativa para os isolados de água de mar entre as regiões de São Sebastião, Santos e Ubatuba ($p=0.1165$) e nem para areia ($p=0.2195$). Em relação às análises de isolados de água e areia, das três regiões estudadas, não houve diferença significativa ($\alpha<0.05$).

5.2.1.8.3 Lipase

Dos isolados ambientais, 92,2% apresentaram positividade para a produção de lipase, quando submetidos à temperatura de 25 °C; e 54,9% quando, à 37 °C. Todos os

isolados de amostras de água de mar e areia da região Ubatuba produziram 100% da atividade da lipase, bem como para os isolados de areia de Santos, exceto os isolados de amostras de água de Santos, que apresentaram atividade de 77,3% em cada uma das temperaturas testadas. Para os isolados de São Sebastião, a positividade em amostras de areia foi de 86,7% à 25 °C; e 47%, à 37 °C, tendo em amostras de água de mar 97,7% à 25 °C; e 25%, à 37 °C, conforme mostra tabela 10 e figura 19.

Na análise estatística da atividade lipídica à 25 °C considerou-se a diferença significativa para os isolados de amostras de água de mar e areia, de São Sebastião ($p=0.0125$). Observou-se que à 37 °C houve diferença significativa para da atividade lipídica também para os isolados de São Sebastião, entre amostras de água de mar e areia ($p=0.0125$). Ainda, havendo uma diferença significativa para os isolados de água de mar entre as regiões de Santos, São Sebastião e Ubatuba ($p=0.0009$).

5.2.1.8.4 DNase

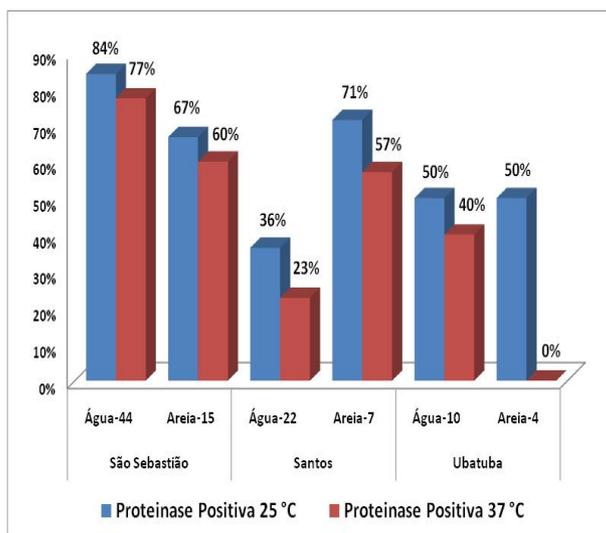
Dos 102 isolados ambientais testados, 33% apresentaram atividade positiva para DNase. Os menores índices foram para isolados de São Sebastião que apresentaram apenas 25% de atividade para as amostras de água (Figura 19). Quanto às temperaturas testadas, à 25 °C obteve-se atividade positiva, em alguns isolados. Porém, para 37 °C, a capacidade da atividade não foi possível detectar, e ainda deve-se considerar que o meio para DNase, quando submetido a essa temperatura secou muito rápido, não favorecendo o desempenho dos testes.

Considerando a análise estatística de DNase a duas temperaturas (25 °C e 37 °C), observou-se que não houve diferença significativa nem por tipo de amostra nem por local em isolados de água de mar e areia ($\alpha < 0.05$).

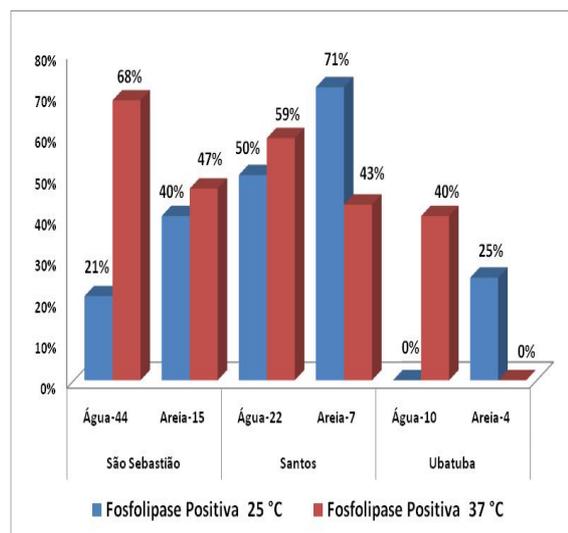
Das cinco cepas clínicas padrões (AC-57, AC-80, AC-101 de *T. spp.* e CBS 2479 de *T. asahii*), todas apresentaram atividade enzimática para DNase e lipase para ambas as temperaturas testadas, porém só uma delas foi positiva para atividade enzimática de fosfolipase (temperatura de 37 °C), e apenas 1/5 (25 °C) e 1/5 (37 °C) para a enzima proteinase. Das seis cepas padrões ambientais testadas, cinco

apresentaram atividade enzimática para DNase, para lipase 6/6 a (25 °C) e 5/6 a (37 °C), para fosfolipase, 2/6 (37 °C) e 1/6 (25 °C) e 3/6 para proteinase em ambas temperaturas. Assim, pode-se dizer que lipase (%) e DNase, em ambas temperaturas, apresentaram as maiores atividades enzimáticas para para os controles.

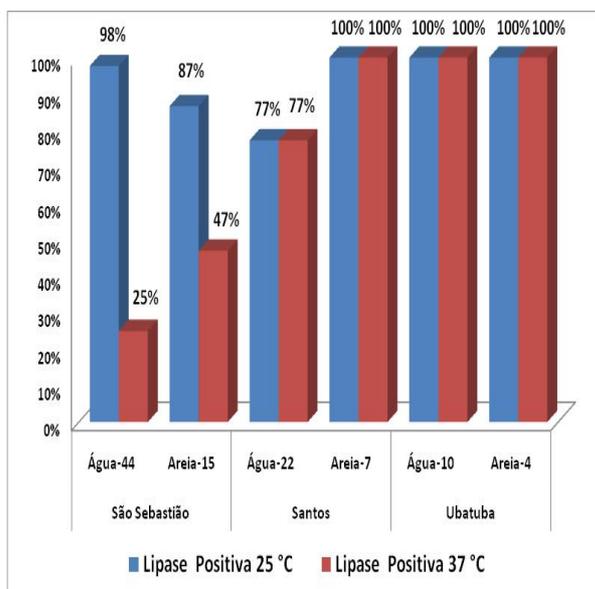
Proteinase



Fosfolipase



Lipase



DNase

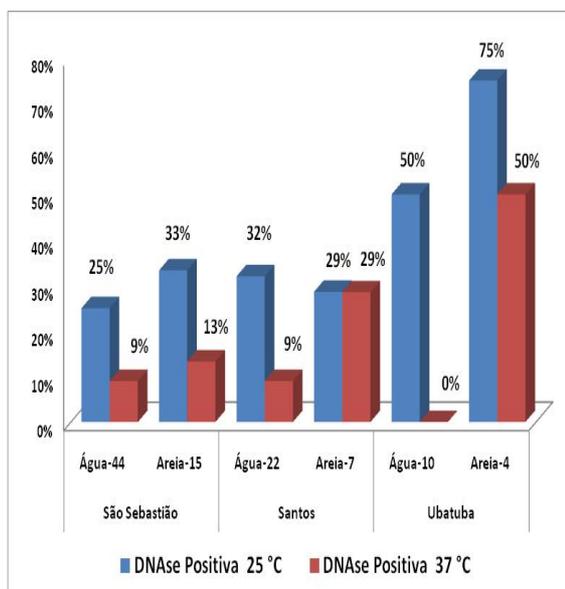


Figura 19. Comparação da atividade enzimática em isolados de *Trichosporon* spp., das três regiões costeiras do Estado de São Paulo, por tipo de teste, amostra, local e temperatura de incubação.

5.2.1.9 Teste de sensibilidade a antifúngicos (Difusão em Agar por E-TEST®)

5.2.1.9.1 Teste piloto (incubação á duas temperaturas)

Para a padronização do experimento com antifúngicos, foi previamente realizado um teste piloto com 2 isolados, de amostras de água de mar (SS 282) e areia (ST 179) e as cepas padrões de referência: *T. asahii* (CBS 2479), *Candida krusei* (ATCC 6258) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), que após o preparo das fitas nas placas inoculadas, foram submetidas a duas temperaturas diferentes (25 °C e 37 °C).

O resultado apresentado nos testes com as seis drogas, para os isolados de amostras de água de mar e areia, incubados nas duas temperaturas (25 °C e 37 °C), mostrou pequenas variações: para a droga anfotericina, todas as cepas testadas tiveram valores mais baixos de MICs, quando incubadas à 25 °C.

Para a cepa controle *C.krusei*, notou-se que quando incubada à temperatura de 25 °C apresentou maior MIC para a droga caspofungina. E ainda, resistência para fluconazol, enquanto que incubada à 37 °C isso não ocorreu após leitura de 48 horas. À 37 °C, para a droga voriconazol, houve valor mais alto de MIC e, para a droga anfotericina B, passou a ser SDD.

A cepa controle *C. parapsilosis* apresentou maiores MICs à 37 °C para as drogas, anfotericina B, cetoconazol, fluconazol e itraconazol. Quando incubada à 37 °C apresentou uma variação na droga anfotericina-B, tornando-se SDD.

Para os isolados testados (ST 179 e SS 282) os resultados mostram maiores MICs na temperatura de 25 °C para as drogas anfotericina B e voriconazol. O isolado ST 179 apresentou resistência diante a droga caspofungina, somente à 37 °C, enquanto o isolado SS 282 apresentou resistência à mesma droga frente às duas temperaturas de incubação testadas. O isolado ST 179 teve maior MIC para cetoconazol e voriconazol à 25 °C (Anexo D). Para a droga anfotericina, todas as cepas testadas tiveram maiores MICs à 37 °C. As leituras feitas em 24 horas, obviamente apresentaram menores MICs comparados aos incubados por 48 horas.

A diferença entre os resultados dos testes incubados nas duas temperaturas (25 °C e 37 °C) dos isolados ambientais, sugerem que novos testes e estudos devem ser feitos para avaliar as melhores condições de incubação de isolados ambientais.

Entretanto, foi decidido avaliar o teste da sensibilidade aos antifúngicos à temperatura de 37 ° C, estandardizado para isolados clínicos.

5.2.1.9.2 Antifungigrama

Para interpretação do teste de susceptibilidade de *Trichosporon* spp. *in vitro* foi utilizado como referência protocolo (M27-A2 e M27-S3), NCCLS, 2002 e 2008, respectivamente, devido ao fato de, no protocolo de microdiluição em caldo do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI – antigo, National Committee for Clinical Laboratory Standards-NCCLS) não estar incluído o gênero *Trichosporon* spp. Contudo, os poucos estudos sobre a sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos de espécies de *Trichosporon* utilizam como referência as normas do CLSI (2002), padronizadas para *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans* (Arikan e Haşçelik, 2002). Segundo Arikan e Haşçelik (2002), não se sabe se existe alguma variação relacionada à espécie no perfil de suscetibilidade de isolados de *Trichosporon*. Além disso, a concordância entre metodologias não foi extensivamente avaliada para este gênero.

Foi investigado o perfil de sensibilidade de 27 isolados de amostras de água e areia, pertencentes ao gênero *Trichosporon*, frente a seis drogas: Anfotericina B (AP), Caspofungina (CS), Cetoconazol (KE), Fluconazol (FL), Itraconazol (IT) e Voriconazol (VO), onde as placas com as drogas de um isolado testado podem ser observadas na figura 20.

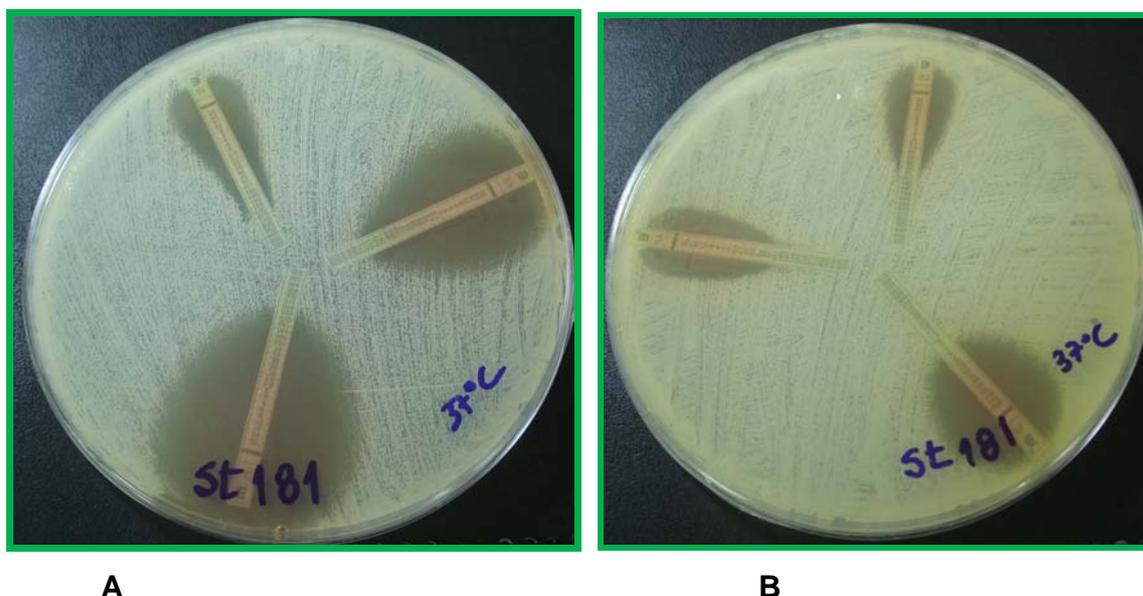


Figura 20. Teste de sensibilidade aos antifúngicos de isolado de *Trichosporon* spp., de amostra de água de mar da Baixada Santista, utilizando fitas E-test®, com as 6 drogas testadas . **A:** KE, VO, IT e **B:** CS, FL, AP (sentido horário).

De acordo com a tabela referência protocolo (M27-S3), NCCLS, 2008, apresentou-se a sensibilidade à maioria das drogas testadas em nossos isolados de amostras de água de mar e areia, porém, observou-se resistência em 33,3% (n = 09) à caspofungina, 11,1% (n = 3) à fluconazol, 7,4% (n = 2), à itraconazol e 3,7% (n = 1) à voriconazol (Figura 21 e Tabela 13,). Assim, vale ressaltar que a maior resistência apresentada foi à droga caspofungina e a mesma também foi observada na literatura para amostras clínicas (ESPINEL-INGROFF, 1998). Entretanto, a eficiência de anfotericina B também já foi descrita e, quando associada à droga fluconazol, foi avaliada como eficaz no tratamento de *Trichosporonose*. Apresentando resistência às drogas obtiveram-se isolados provenientes de São Sebastião (FL: 7,4%; IT: 7,4%; CS: 14,8%) provenientes de água de mar (02) e areia (03) e Santos (FL: 3,7%; VO: 3,7%; CS: 18,5%), sendo de amostras de água de mar (04) e areia (01). Enquanto que os isolados de Ubatuba não apresentaram nenhuma resistência (Tabela 13).

Quanto aos perfis das cepas controles, *C. krusei* foi sensível a fluconazol, voriconazol e caspofungina; Sensível-Dose Dependente para anfotericina, itraconazol e cetoconazol; *C. parapsilosis* foi sensível a fluconazol, itraconazol, voriconazol e

caspofungina. A ATCC CBS2479 de *Trichosporon asahii* apresentou resistência à caspofungina e foi sensível às outras cinco drogas.

Em geral, os valores dos CIMs foram: anfotericina B (CIM=0,016 a 1,0 µg/mL), para fluconazol (CIM=0,064 a 2,0 µg/mL), Cetoconazol (CIM=0,006 a 0,38 µg/mL), Caspofungina (CIM = 0,023 a 1,0 µg/mL), itraconazol (CIM= 0,012 a 3 µg/mL), voriconazol (CIM = 0,002 a 0,19 µg/mL).

A literatura descreve que a droga fluconazol também pode apresentar, relativamente, altos MICs para alguns isolados de *Trichosporon* (NAGAI *et al.*, 1999; UZUN , 1997). Porém, itraconazol expressa MICs relativamente baixos. (ESPINEL-INGROFF, 1998; UCHIDA, 1991). Voriconazol aparece com muita atividade e mais potente que itraconazol *in vitro* (MCGINNIS, 1991; MCGINNIS, 1998; UZUN, 2000). Quanto aos MICs, obtidos pelas drogas equinocandinas, caspofungina, anidulafungina, e FK463 são consistentemente altos, indicando que esses agentes praticamente não têm atividade contra isolados de *Trichosporon* (ESPINEL-INGROFF, 1998; UZUN, 1997);

Anfotericina, fluconazol e itraconazol têm sido utilizados no tratamento de *Trichosporonoses* (CANALES, 1998; GRAUER, 1994). Infelizmente, *in vivo* a eficácia de várias drogas antifúngicas avaliadas permanece limitada em infecções disseminadas e a taxa de mortalidade é alta (WALSH, 1989). Como exemplo, o fracasso clínico em *Trichosporonose* devido à susceptibilidade das cepas à anfotericina B tem sido reportado (ALBALLAA, 1991).

O avanço às fungemias nosocomiais devido à *Trichosporon* foi observado durante o tratamento com itraconazol (KRCMERY, 1998). Fluconazol, combinado com anfotericina B, foi avaliado ser benéfico no tratamento de *Trichosporonose* por alguns autores (ANAISSIE, 1994; BHANSALI, 1986).

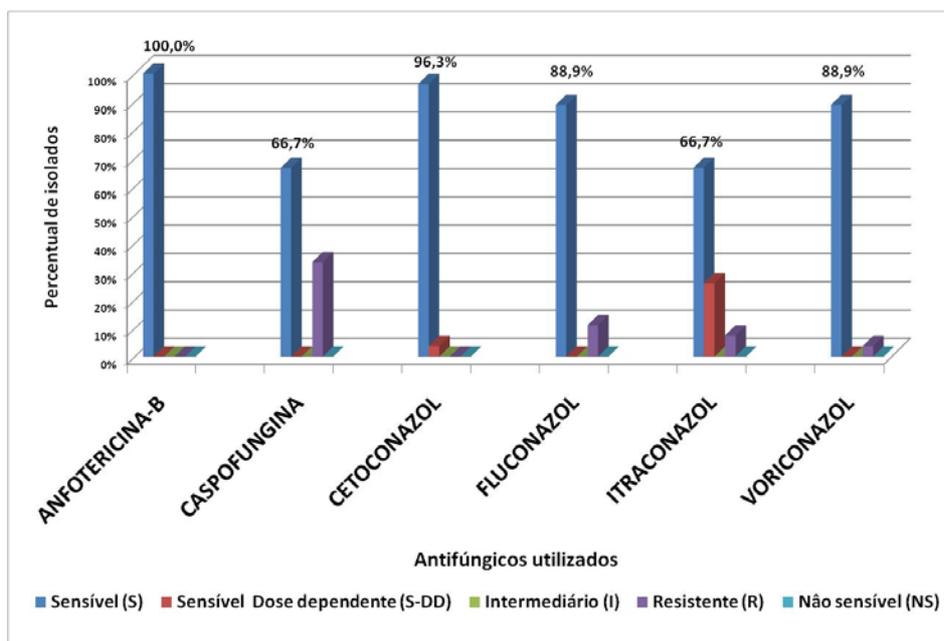


Figura 21. Perfis do teste de susceptibilidade antifúngica em isolados de *Trichosporon* spp. de amostras de água de mar e areia da região costeira de São Paulo.

Tabela 13. Resultados dos testes de sensibilidade *in vitro* de isolados de *Trichosporon* spp., de amostras de água de mar e areia, por região e tipo de antifúngico.

Local	Fluconazol (FL)			Anfotericina (AP)			Itraconazol (IT)			Cetoconazol (KE)			Voriconazol (VO)			Caspofungina (CS)		
	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R
S.Sebastião	14	0	2	16	0	0	10	4	2	16	0	0	15	0	0	12	0	4
			(7,4%)						(7,4%)									(14,8%)
Santos	08	0	01	09	0	0	07	02	0	08	01	0	08	0	01	04	0	05
			(3,7%)												(3,7%)			(18,5%)
Ubatuba	02	0	0	02	0	0	01	01	0	02	0	0	1	0	0	02	0	0
SubTotal	24	0	03	27	0	0	18	07	02	26	01	0	24	0	01	18	0	09
%	88,8	0	11,1	100	0	0	66,6	25,9	7,4	96,2	3,7	0	88,8	0	3,7	66,6	0	33,3
Total	27			27			27			27			27			27		

Controles	Fluconazol (FL)			Anfotericina (AP)			Itraconazol (IT)			Cetoconazol (KE)			Voriconazol (VO)			Caspofungina (CS)		
	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SD D	R	S	SD D	R	S	SDD	R	S	SDD	R
<i>C.krusei</i> (ATCC 6258)	01	0	0	0	01	0	0	01	0	0	01	0	01	0	0	01	0	0
<i>C.parapsilosis</i> (ATCC 22019)	01	0	0	0	01	0	01	0	0	0	01	0	01	0	0	01	0	0
<i>Trichosporon</i> <i>asahii</i> (ATCC CBS2479)	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1

Legenda: S = sensível, SDD = sensível dose dependente, R = Resistente.

5.3 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE *Trichosporon* spp.

5.3.1 Extração do DNA cromossômico

Todos os isolados de amostras de água de mar e areia e controles (clínicos) tiveram seus DNAs extraídos, segundo o método descrito por Gandra *et al.*, (2006). A qualidade do DNA foi verificada em gel de agarose, e a sua concentração foi determinada.

5.3.2 Identificação de *Trichosporon* spp. através da reação de PCR

Os iniciadores ou “primers” específicos de gênero produziram como produto final um fragmento de 170 pb. Dos 102 isolados submetidos a PCR, 63,7% foram identificados como pertencentes ao gênero *Trichosporon* (65/102). A reação de PCR identificou o gênero *Trichosporon*; em 75,8% dos 29 isolados suspeitos de Santos; 59,3%, dos 59 isolados suspeitos de São Sebastião; e, de Ubatuba, teve 57,1%, dos 14 isolados suspeitos identificados (Figura 22).

Os controles utilizados na reação de PCR: clínicos, CBS2479 – *T.asahii*, AC-57 – *T. spp.*, AC-101 – *T. spp.* e isolados ambientais, 75-A - *T. spp.*, 75-B - *T. spp.*, 132-B – *T. spp.*, foram amplificados e confirmam a positividade do teste.

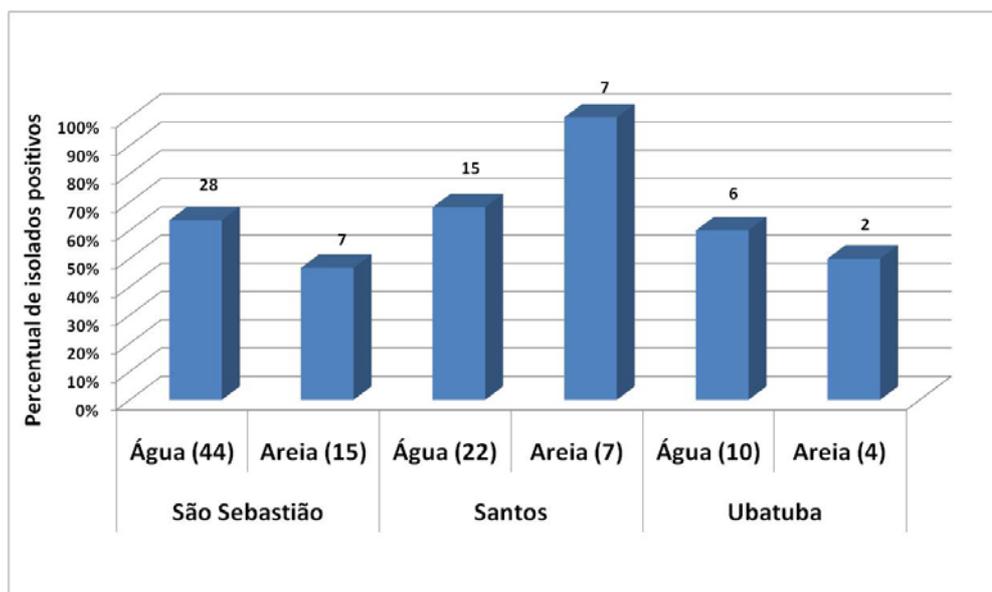


Figura 22. Frequência de identificação por PCR de *Trichosporon* spp. por tipo de amostra e região estudada.

5.3.3 Caracterização molecular pela técnica de BOX-PCR

Um total de 65 isolados, confirmados pela técnica de PCR, caracterizados morfológica e bioquimicamente como *Trichosporon* spp. foi submetido à técnica de BOX-PCR.

O dendograma obtido pela técnica de BOX-PCR apresentou uma similaridade inicial de 15,2% entre os 90 testados (65 isolados de amostras de água de mar e areia e os controles clínicos e ambientais), que apresentaram >2 produtos de amplificação e foram obtidos 21 agrupamentos com similaridade $\geq 70\%$ entre todos os isolados testados provenientes das regiões de São Sebastião, Baixada Santista e Ubatuba. Dentre esses agrupamentos, foram observados 01, 01, 09 e 11 agrupamentos formados respectivamente, por 07, 04, 03 e 02 isolados de *Trichosporon* spp..

Analisando o total de isolados de *Trichosporon* spp. (n=65) submetidos à técnica de BOX-PCR, verificou-se que não foram obtidos produtos de amplificação por 9,2% (n= 06) das leveduras testadas; e 7,6% (n= 05) apresentaram apenas uma banda.

Portanto, foram incluídos nos dendrogramas somente os isolados que apresentaram ≥ 2 produtos de amplificação (Figura 23).

Analisando os resultados, foi verificado que 10 agrupamentos que apresentaram similaridade $\geq 70\%$ eram formados por isolados de amostras de água de mar de mesmo local, sendo 07 agrupamentos do Canal de São Sebastião; 02, da Baixada Santista; e, 01, da região de Ubatuba. Entre os agrupamentos de isolados de água de mar, provenientes do mesmo local, 03 subcluster foram agrupados no mesmo ponto e data de coleta (02 subcluster, de São Sebastião, um deles com 100% de similaridade; e 01 subcluster de Ubatuba).

Quando os agrupamentos foram analisados por diferentes locais, houve 05 subcluster de isolados de amostras de água de mar, sendo: 03 provenientes de São Sebastião e Santos; e 02 agrupamentos de isolados, provenientes de Santos e Ubatuba.

Observou-se que 04 agrupamentos, em amostras de areia nos mesmos locais: 02, entre isolados de Santos; e 02, de isolados de Ubatuba. Porém, não foram verificados agrupamentos em amostras de areia em locais diferentes. Dos agrupamentos em isolados de amostras de areia, 02 subcluster correspondiam ao mesmo ponto e data de coleta (01 subcluster, com 03 isolados de São Sebastião; e, 02, de Santos, com 100% de similaridade).

Foram agrupados 5 subcluster entre isolados de amostras de água de mar e areia para os mesmos locais de coleta: 03 subcluster provenientes do Canal de São Sebastião e 02 subcluster, isolados da Baixada Santista.

Apenas 02 agrupamentos foram formados pelos isolados de amostra de água de mar e areia dos diferentes locais: São Sebastião e Santos.

No total, 53 isolados e 7 controles (clínicos e ambientais) foram agrupados com similaridade $\geq 70\%$.

Foram verificados 02 agrupamentos entre nossos isolados e as cepas controles, sendo 01 agrupamento entre a cepa controle 132-A (*Trichosporon* spp.) e um isolado de amostra de areia da região de São Sebastião. O outro agrupamento foi observado entre a ATCC CBS 7556 (*Trichosporon ovoides*) e um isolado proveniente de amostra de água de mar, também do Canal de São Sebastião.

Dois agrupamentos foram observados entre os próprios controles: 01 subcluster, formado com duas cepas, com 85,7% de similaridade: *T.inkin* (ATCC CBS 5585) e *T. mucoides* (CBS 7625). O segundo subcluster apresentou 100% de similaridade entre um controle clínico, *Trichosporon* spp. (AC-101) e *Trichosporon asahii* (ATCC CBS 2479), sendo ainda, agrupado com o controle clínico *Trichosporon* spp. (AC-57) com 85,7% de similaridade.

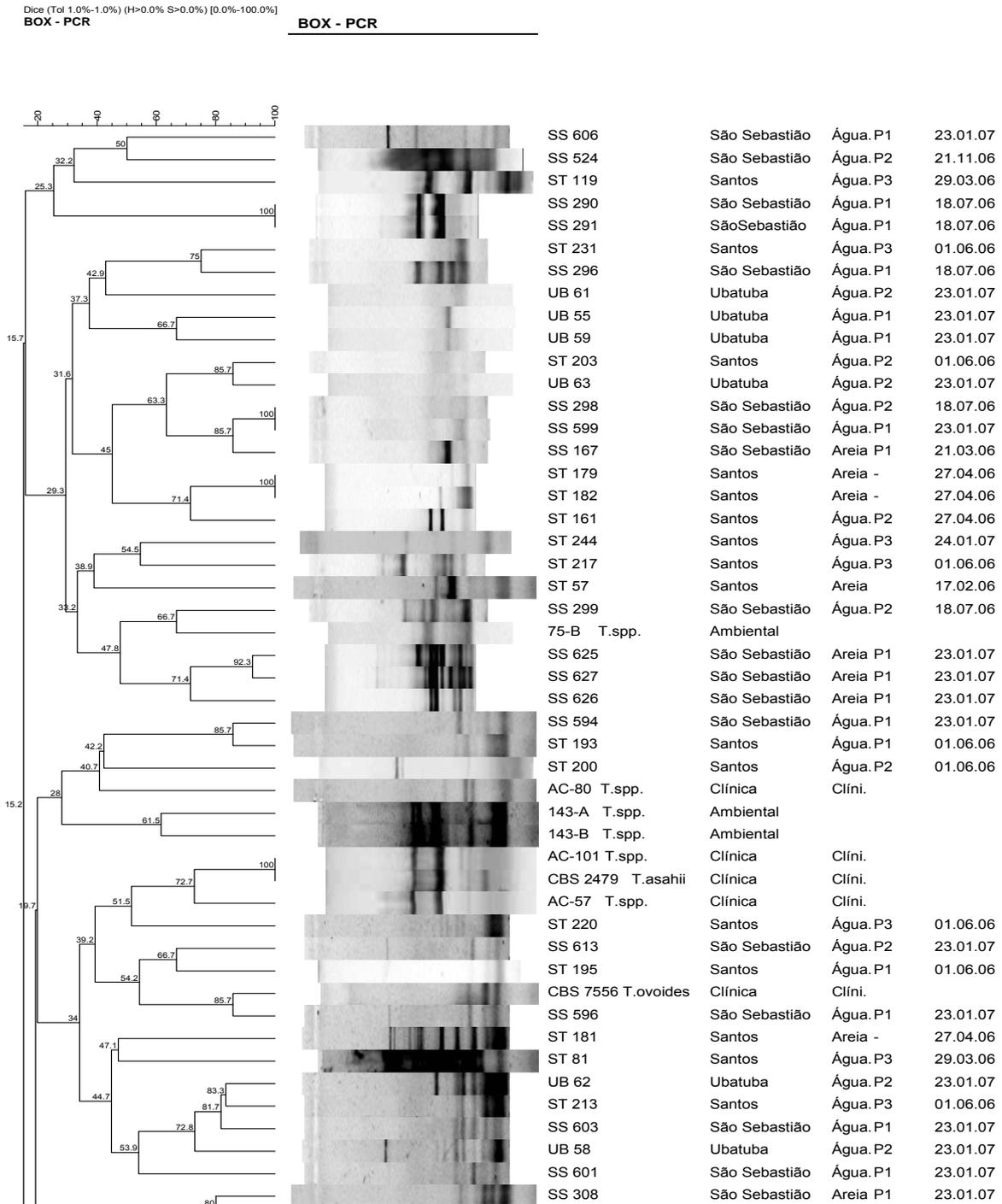


Figura 23. Dendrograma construído com a técnica de BOX-PCR com isolados de *Trichosporon* spp. provenientes de amostras de água de mar e areia das áreas de São Sebastião, Baixada Santista e Ubatuba (continua).

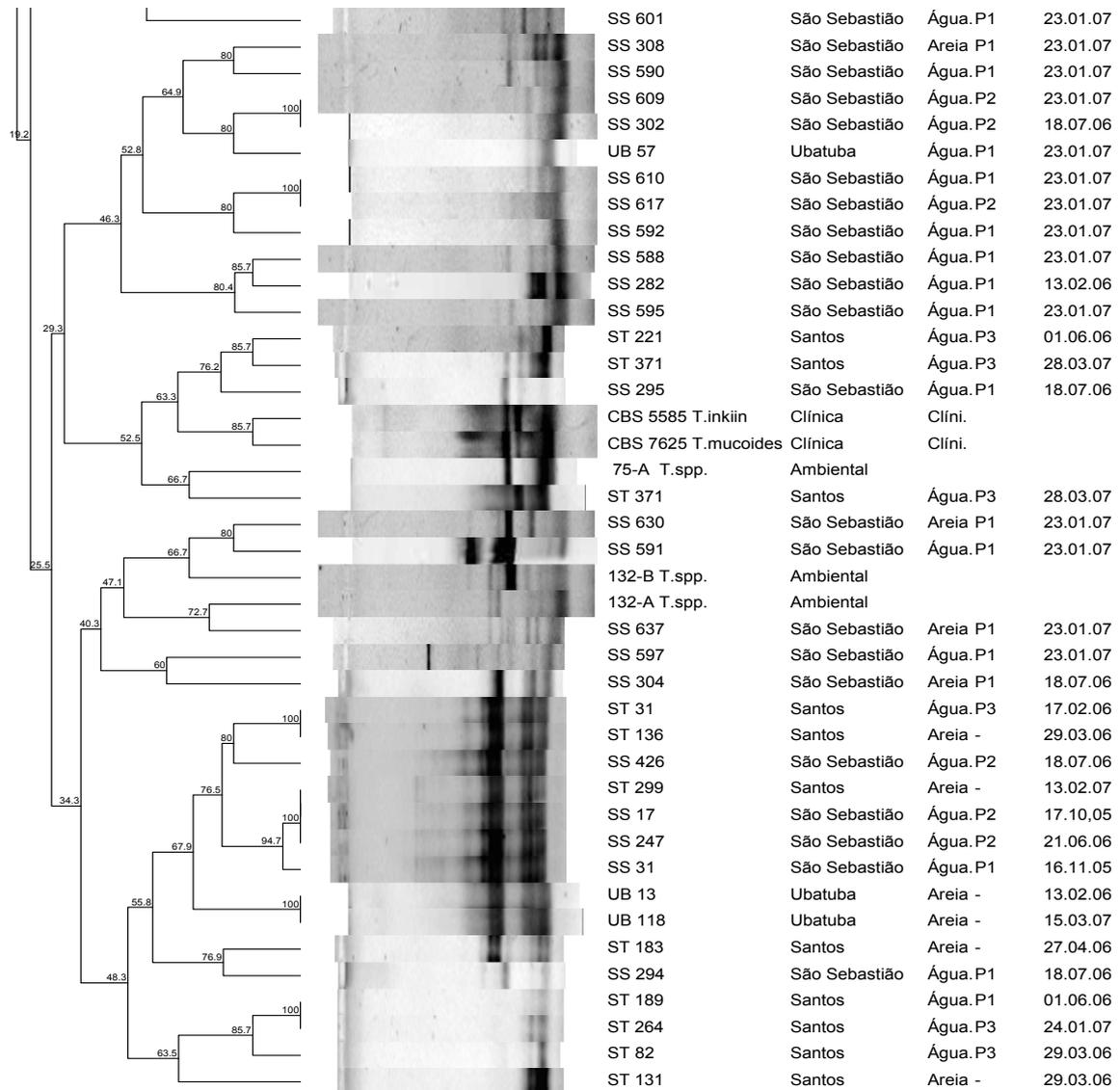


Figura 23. Dendrograma construído com a técnica de BOX-PCR com isolados de *Trichosporon* spp. provenientes de amostras de água de mar e areia das áreas de São Sebastião, Baixada Santista e Ubatuba.

Legenda: **SS:** São Sebastião, **ST:** Santos, **UB:** Ubatuba, **P:** Ponto de coleta.

5.3.4 Seqüenciamento do fragmento rDNA amplificado

Seqüenciamento parcial da região ITS e/ou IGS

Um total de 45 isolados foi submetido ao seqüenciamento parcial da região ITS utilizando o iniciador (*primer*) ITS1.fwd, destes 14 isolados não apresentaram resultados satisfatórios após o seqüenciamento com o iniciador (*primer*) ITS1.fwd. Sendo assim, os resultados apresentados na figura 24 e tabela 14 correspondem a 33 isolados que foram identificados pelo seqüenciamento parcial da região ITS.

Um total de 22 isolados foi submetido ao seqüenciamento parcial da região IGS utilizando o iniciador (*primer*) IGS1.fwd. Porém, 02 isolados não apresentaram resultados satisfatórios após o seqüenciamento com esse iniciador. Sendo assim, os resultados apresentados na figura 25 e tabela 15 correspondem a 20 isolados que foram identificados pelo seqüenciamento parcial da região IGS.

As seqüências obtidas após o seqüenciamento parcial da região ITS e/ou IGS foram alinhadas utilizando o programa *BioEdit* e uma seqüência representativa de cada espécie que apresentou > 99% de identidade (*Sequence Identity Matrix*) com as demais leveduras foi selecionada como representante de cada cluster. Em seguida essas seqüências foram comparadas com as seqüências disponibilizadas no GenBank, e em seguida foi construída uma árvore filogenética com as leveduras identificadas pelo iniciador ITS1.fwd (Figura 24) e uma com as leveduras identificadas com o iniciador IGS1.fwd (Figura 25).

Analisando os resultados obtidos ao utilizar o primer ITS1.fwd verificamos que 07 leveduras (21%) pertencem ao gênero *Trichosporon* e a maioria (60%) pertence ao gênero *Candida* (Figura 26). As vinte leveduras que foram submetidas ao seqüenciamento utilizando o iniciador IGS1.fwd foram identificadas como pertencentes ao gênero *Trichosporon* (Figura 27).

É importante lembrar que apenas dois isolados (SS308 e ST189) foram submetidos ao seqüenciamento utilizando tanto o iniciador ITS1.fwd como o IGS1.fwd. Entretanto, o isolado SS308 foi identificado como *Candida boidinii* pelo iniciador ITS1 e *Trichosporon debeurmannianum* pelo iniciador IGS1, enquanto que o isolado ST189 foi identificado como *Trichosporon debeurmannianum* pelos dois iniciadores.

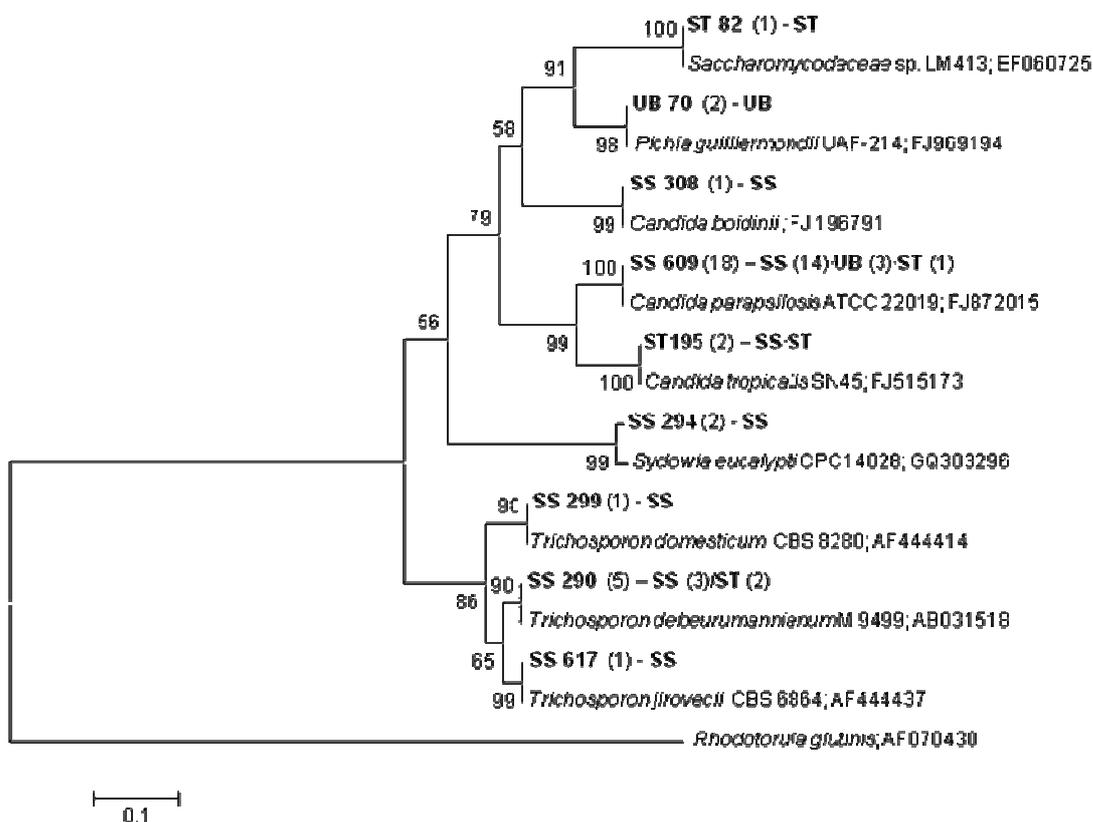


Figura 24. Árvore filogenética baseada na comparação das sequências da região ITS de leveduras com as sequências disponíveis no GenBank. Os valores de *bootstrap* < 50 foram retirados da figura acima.

Legenda: (): Número de isolados que apresentaram >99% de identidade entre si; SS: Canal de São Sebastião / UB: Ubatuba / ST: Baixada Santista.

Nota: Os números no interior dos parênteses após a sigla do local de coleta correspondem ao número de isolados obtidos de cada local.

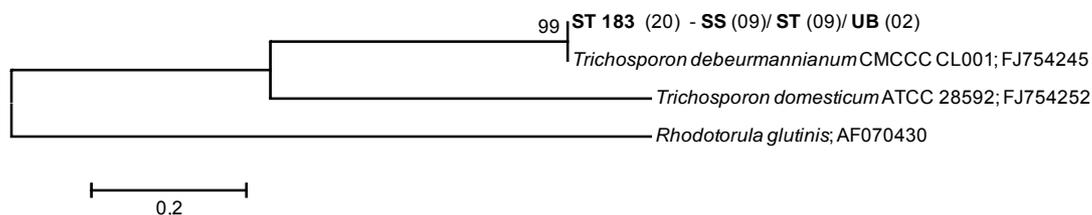


Figura 25 – Árvore filogenética baseada na comparação das sequências da região IGS de leveduras com as sequências disponíveis no GenBank. Os valores de *bootstrap* < 50 foram retirados da figura acima.

Legenda: (): Número de isolados que apresentaram >99% de identidade entre si; SS: Canal de São Sebastião / UB: Ubatuba / ST: Baixada Santista

Nota: Os números no interior dos parênteses após a sigla do local de coleta correspondem ao número de isolados obtidos de cada local.

Tabela 14 – Espécies de leveduras identificadas, pelo sequenciamento parcial da região ITS utilizando o iniciador ITS1.fwd, por local de coleta.

Identificação	Total de isolados	Isolados por local de Coleta		
		SS	ST	UB
<i>Saccharomycodaceae</i> sp.	1	0	1	0
<i>Pichia guilliermondii</i>	2	0	0	2
<i>Candida boidinii</i>	1	1	0	0
<i>Candida parapsilosis</i>	18	14	1	3
<i>Candida tropicalis</i>	2	1	1	0
<i>Sydowia eucalypti</i>	2	2	0	0
<i>Trichosporon domesticum</i>	1	1	0	0
<i>Trichosporon debeurmannianum</i>	5	3	2	0
<i>Trichosporon jirovecii</i>	1	1	0	0
	33	23	5	5

Nota:

SS: Canal de São Sebastião; ST: Baixada Santista; UB: Ubatuba

Tabela 15 – Espécies de leveduras identificadas, pelo sequenciamento parcial da região IGS utilizando o iniciador IGS1.fwd, por local de coleta.

Identificação	Total de isolados	Isolados por local de Coleta		
		SS	ST	UB
<i>Trichosporon debeurmannianum</i>	20	9	9	2
Total	20	9	9	2

Nota:

SS: Canal de São Sebastião; ST: Baixada Santista; UB: Ubatuba

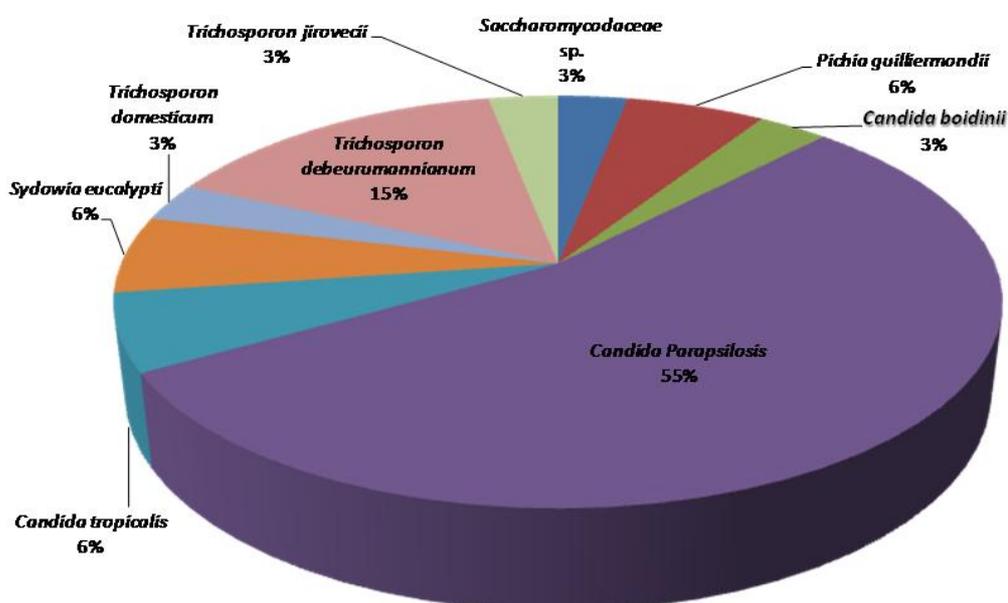


Figura 26. Espécies de leveduras identificadas, pelo sequenciamento parcial da região ITS utilizando o iniciador ITS1.fwd.

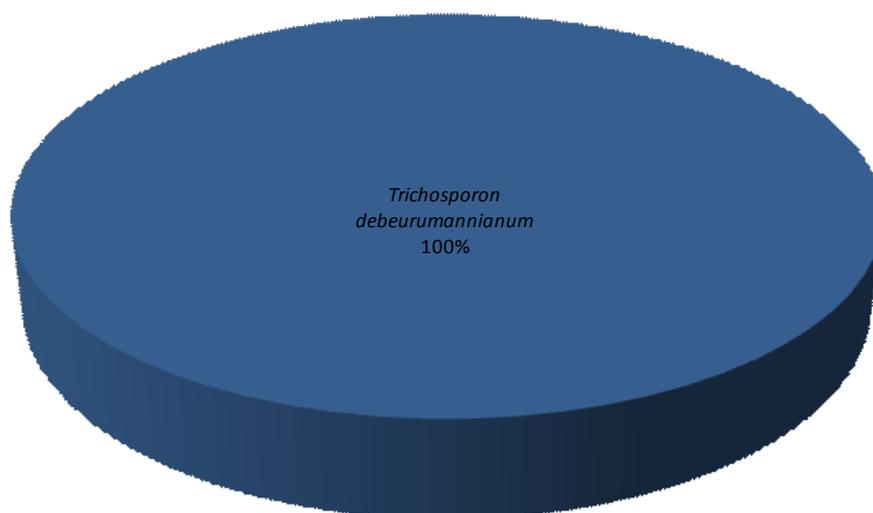


Figura 27. Espécies de leveduras identificadas, pelo sequenciamento parcial da região IGS utilizando o iniciador IGS1.fwd.

No seqüenciamento dos isolados de amostras de água de mar e areia apenas 41,5% (27/65) das leveduras suspeitas de pertencerem ao gênero *Trichosporon* foram identificadas. Vinte isolados apresentaram similaridade com *T. debeurmannianum* pelo sequenciamento com o iniciador IGS1 e somente 7 de 33 com *T. debeurmannianum* (5), *T. domesticum* (1) e *T. jirovecii* (1), utilizando o iniciador ITS1 (Tabela 16).

Tabela 16. Identificação por seqüenciamento dos isolados de *Trichosporon* spp. de amostras de água do mar e areia do Canal de São Sebastião, Baixada Santista e Ubatuba.

Nº	Local	Data da Coleta	Tipo de Amostra	Data de acesso GenBank	Nº de Acesso GenBank	Identificação pelo GenBank	Similaridade	Nº de pb	Iniciador (Seqüenciamento)
SS 290	Canal de São Sebastião	18.07.06	Água de mar	19/11/2009	AB031518	<i>Trichosporon debeurmannianum</i> M9499	100%	446	ITS1
SS 294	Canal de São Sebastião	18.07.06	Água de mar	19/11/2009	GQ303296	<i>Sydowia eucalypti</i> CPC14028	97,5%	477	ITS1
SS 295	Canal de São Sebastião	18.07.06	Água de mar	19/11/2009	GQ303296	<i>Sydowia eucalypti</i> CPC14028	97,5%	477	ITS1
SS 299	Canal de São Sebastião	18.07.06	Água de mar	19/11/2009	AF444414	<i>Trichosporon domesticum</i> CBS 8280	100%	473	ITS1
SS 302	Canal de São Sebastião	18.07.06	Areia	19/11/2009	FJ515173	<i>Candida tropicalis</i> SN45	100%	472	ITS1
SS 308	Canal de São Sebastião	23.01.07	Areia	19/11/2009	EU135909	<i>Candida boidinii</i> FJ196791	100%	525	ITS1
SS 590	Canal de São Sebastião	23.01.07	Água de mar	19/11/2009	FJ872015	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	100%	445	ITS1
SS 591	Canal de São Sebastião	23.01.07	Água de mar	19/11/2009	AB031518	<i>Trichosporon debeurmannianum</i> M9499	100%	446	ITS1
SS 592	Canal de São Sebastião	23.01.07	Água de mar	19/11/2009	FJ872015	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	100%	445	ITS1
SS 594	Canal de São Sebastião	23.01.07	Água de mar	19/11/2009	FJ872015	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	100%	445	ITS1
SS 595	Canal de São Sebastião	23.01.07	Água de mar	19/11/2009	FJ872015	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	100%	445	ITS1
SS 596	Canal de São Sebastião	23.01.07	Água de mar	19/11/2009	FJ872015	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	100%	445	ITS1
SS 597	Canal de São Sebastião	23.01.07	Água de mar	19/11/2009	FJ872015	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	100%	445	ITS1
SS 601	Canal de São Sebastião	23.01.07	Água de mar	19/11/2009	FJ872015	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	100%	445	ITS1
SS 603	Canal de São Sebastião	23.01.07	Água de mar	19/11/2009	FJ872015	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	100%	445	ITS1
SS 604	Canal de São Sebastião	23.01.07	Água de mar	19/11/2009	FJ872015	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	100%	445	ITS1
SS 606	Canal de São Sebastião	23.01.07	Água de mar	19/11/2009	FJ872015	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	100%	445	ITS1
SS 609	Canal de São Sebastião	23.01.07	Água de mar	19/11/2009	FJ872015	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	100%	445	ITS1
SS 610	Canal de São Sebastião	23.01.07	Água de mar	19/11/2009	FJ872015	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	100%	445	ITS1
SS 613	Canal de São Sebastião	23.01.07	Água de mar	19/11/2009	FJ872015	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	100%	445	ITS1
SS 617	Canal de São Sebastião	23.01.07	Água de mar	19/11/2009	AF444437	<i>Trichosporon jirovecii</i> CBS 6864	100%	503	ITS1
SS 624	Canal de São Sebastião	23.01.07	Areia	19/11/2009	FJ872015	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	100%	445	ITS1
SS 626	Canal de São Sebastião	23.01.07	Areia	19/11/2009	AB031518	<i>Trichosporon debeurmannianum</i> M9499	100%	446	ITS1
ST 82	Baixada Santista	29.03.06	Água de mar	19/11/2009	EF060725	<i>Saccharomycodaceae</i> sp. LM413	100%	487	ITS1

Nº	Local	Data da Coleta	Tipo de Amostra	Data de acesso GenBank	Nº de Acesso GenBank	Identificação pelo GenBank	Similaridade	Nº de pb	Iniciador (Sequenciamento)
ST 182	Baixada Santista	27.04.06	Areia	19/11/2009	AB031518	<i>Trichosporon debeurmannianum</i> M9499	100%	446	ITS1
ST 189	Baixada Santista	01.06.06	Água de mar	19/11/2009	AB031518	<i>Trichosporon debeurmannianum</i> M9499	100%	446	ITS1
ST 195	Baixada Santista	01.06.06	Água de mar	19/11/2009	FJ515173	<i>Candida tropicalis</i> SN45	100%	472	ITS1
ST 221	Baixada Santista	01.06.06	Água de mar	19/11/2009	FJ872015	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	100%	445	ITS1
UB 57	Ubatuba	23.01.07	Água de mar	19/11/2009	FJ872015	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	100%	445	ITS1
UB 58	Ubatuba	23.01.07	Água de mar	19/11/2009	FJ872015	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	100%	445	ITS1
UB 59	Ubatuba	23.01.07	Água de mar	19/11/2009	FJ969194	<i>Pichia guilliermondii</i> UAF-214	100%	476	ITS1
UB 62	Ubatuba	23.01.07	Água de mar	19/11/2009	FJ872015	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	100%	445	ITS1
UB 70	Ubatuba	23.01.07	Areia	19/11/2009	FJ969194	<i>Pichia guilliermondii</i> UAF-214	100%	476	ITS1
SS 17	Canal de São Sebastião	17.10.05	Água de mar	19/11/2009	FJ754245	<i>Trichosporon debeurmannianum</i> CMCCC CL001	100%	476	IGS1
SS 31	Canal de São Sebastião	16.11.05	Água de mar	19/11/2009	FJ754245	<i>Trichosporon debeurmannianum</i> CMCCC CL001	100%	476	IGS1
SS 247	Canal de São Sebastião	21.06.06	Água de mar	19/11/2009	FJ754245	<i>Trichosporon debeurmannianum</i> CMCCC CL001	100%	476	IGS1
SS 304	Canal de São Sebastião	18.07.06	Areia	19/11/2009	FJ754245	<i>Trichosporon debeurmannianum</i> CMCCC CL001	100%	476	IGS1
SS 308	Canal de São Sebastião	23.01.07	Areia	19/11/2009	FJ754245	<i>Trichosporon debeurmannianum</i> CMCCC CL001	100%	476	IGS1
SS 426	Canal de São Sebastião	19.09.06	Água de mar	19/11/2009	FJ754245	<i>Trichosporon debeurmannianum</i> CMCCC CL001	100%	476	IGS1
SS 524	Canal de São Sebastião	21.11.06	Água de mar	19/11/2009	FJ754245	<i>Trichosporon debeurmannianum</i> CMCCC CL001	100%	476	IGS1
SS 625	Canal de São Sebastião	23.01.07	Areia	19/11/2009	FJ754245	<i>Trichosporon debeurmannianum</i> CMCCC CL001	100%	476	IGS1
SS 627	Canal de São Sebastião	23.01.07	Areia	19/11/2009	FJ754245	<i>Trichosporon debeurmannianum</i> CMCCC CL001	100%	476	IGS1
ST 31	Baixada Santista	17.02.06	Água de mar	19/11/2009	FJ754245	<i>Trichosporon debeurmannianum</i> CMCCC CL001	100%	476	IGS1
ST 131	Baixada Santista	29.03.06	Areia	19/11/2009	FJ754245	<i>Trichosporon debeurmannianum</i> CMCCC CL001	100%	476	IGS1
ST 136	Baixada Santista	29.03.06	Areia	19/11/2009	FJ754245	<i>Trichosporon debeurmannianum</i> CMCCC CL001	100%	476	IGS1
ST 161	Baixada Santista	27.04.06	Água de mar	19/11/2009	FJ754245	<i>Trichosporon debeurmannianum</i> CMCCC CL001	100%	476	IGS1
ST 183	Baixada Santista	27.04.06	Areia	19/11/2009	FJ754245	<i>Trichosporon debeurmannianum</i> CMCCC CL001	100%	476	IGS1
ST 189	Baixada Santista	01.06.06	Água de mar	19/11/2009	FJ754245	<i>Trichosporon debeurmannianum</i> CMCCC CL001	100%	476	IGS1
ST 264	Baixada Santista	24.01.07	Água de mar	19/11/2009	FJ754245	<i>Trichosporon debeurmannianum</i> CMCCC CL001	100%	476	IGS1
ST 299	Baixada Santista	13.02.07	Areia	19/11/2009	FJ754245	<i>Trichosporon debeurmannianum</i> CMCCC CL001	100%	476	IGS1
ST 371	Baixada Santista	28.03.07	Água de mar	19/11/2009	FJ754245	<i>Trichosporon debeurmannianum</i> CMCCC CL001	100%	476	IGS1
UB 13	Ubatuba	13.02.06	Areia	19/11/2009	FJ754245	<i>Trichosporon debeurmannianum</i> CMCCC CL001	100%	476	IGS1
UB 118	Ubatuba	15.03.07	Areia	19/11/2009	FJ754245	<i>Trichosporon debeurmannianum</i> CMCCC CL001	100%	476	IGS1

6 DISCUSSÃO

6.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DAS TRÊS REGIÕES COSTEIRAS DO ESTADO DE SÃO PAULO

A costa brasileira sofre a influência de três principais correntes: Corrente Norte do Brasil; Corrente do Brasil e Corrente das Malvinas. As águas dessas correntes, por força de mistura, originam massas de água pobres em nutrientes e apresentando diferenças de temperaturas e salinidade, que condicionam os fenômenos físico-químicos e biológicos regionais, na interface dos sistemas continentais e oceânicos (MELO, 1985).

O litoral do estado de São Paulo sofre influência de três tipos de massas de água (Água Costeira – AC, Água Tropical – AT, e Água Central do Atlântico Sul – ACAS), que influenciam os níveis de salinidade e temperatura da água. Porém, as massas de águas superficiais possuem características termohalinas, relacionadas com a radiação solar, temperatura do ar e com o índice de pluviosidade da região (CASTRO FILHO *et al.*, 1987; CASTRO FILHO, 1990).

O Estado de São Paulo, cortado pelo Trópico de Capricórnio, em latitude aproximada de 23° 21' Sul, encontra-se em uma área de transição entre os climas Tropicais Úmidos de altitude, com estação seca bem definida, devido à menor ação das atividades frontais, e os Subtropicais, sempre úmidos pela intensa ação das frentes vindas do Sul. O clima é bastante úmido, com médias de pluviosidade elevadas, em torno de 2000 mm anuais. A quantidade de chuva é um elemento particularmente importante, pois influencia diretamente na qualidade da água do mar. As chuvas podem carregar águas paradas com esgoto e água de pequenos córregos que recebem esgotos clandestinos. Esgoto, lixo e outros detritos, na ocorrência de chuvas, são carregados para as praias pelas galerias, córregos e canais de drenagem, produzindo, assim, um aumento considerável na densidade de bactérias nas águas litorâneas. Nos meses mais chuvosos, a tendência é ter um maior número de praias impróprias para banho, coincidindo com os meses de verão, período de sensível aumento da população flutuante (CETESB, 2005).

De um modo geral, portanto, verifica-se nas regiões oceânicas que as camadas superiores (0-200m) são dominadas por Águas Tropicais (AT), quentes e salgadas ($T > 20,0$ °C e $S > 36,40$) (MIRANDA, 1982), pobres em nutrientes, transportadas pelas correntes do contorno oeste.

A salinidade da água do mar é de aproximadamente 35‰ podendo sofrer alterações devido ao aporte de água doce e condições de temperaturas elevadas que podem acarretar forte evaporação. Entretanto, nos arredores dos grandes estuários, a salinidade tem uma tendência a ser mais baixa (MENDES, 1993). Essa tendência foi observada nas amostras coletadas na Baía de Santos, cujos valores de salinidade variaram de 19,7 a 31,8 ‰, sendo que todos os valores acima de 31‰ foram encontrados no Ponto 2, que é o ponto mais próximo da saída da baía. No Canal de São Sebastião, durante todos os meses de coleta de amostras, a salinidade variou de 24,1 a 35‰. No entanto, em Ubatuba, os valores de salinidade variaram de 26,4 a 31,7 ‰, sendo observados valores abaixo de 30‰ apenas nas amostras coletadas no ano de 2007.

Os diferentes valores de salinidade da água do mar encontrados nos três locais estudados podem ser explicados pelo índice de pluviosidade de cada região. Pode-se assim, citar a Baixada Santista que possui a maior média pluviométrica do litoral, tanto nos meses de primavera-verão, quanto nos meses de outono-inverno, aumentando o aporte de água doce dentro da própria Baía. Entretanto, o município de São Sebastião apresenta os menores índices pluviométricos do litoral norte (CETESB, 2008).

Em regiões subtropicais, precipitações intensas podem ocorrer devido às mudanças nas condições meteorológicas associadas à passagem de frentes frias que acontecem durante todo o ano (MAHIQUES, 1995). Dessa forma, explicam-se os baixos valores de salinidade encontrados em Ubatuba, no ano de 2007.

As médias de temperatura observadas nas amostras de água do mar coletadas na Baixada Santista (16,3 a 28,5 °C), Canal de São Sebastião (22,2 a 32,7 °C) e Ubatuba (25,3 a 31,9 °C), durante os meses de amostragem realizados nesse estudo, estão em concordância com outros resultados encontrados na literatura. Foi observado, na Baixada Santista, entre os meses de novembro de 2004 e dezembro de 2005, temperatura da água do mar variando de 20,2 a 28,2 °C (ANCONA, 2007). Venturini,

(2007) encontrou valores similares de temperatura da água do mar, variando de 23,2 a 27,2 °C nos meses de abril e novembro de 2004, no Canal de São Sebastião. Em Ubatuba, no período de setembro de 1995 a agosto de 1996, a temperatura da água do mar observada, variando de 17,3 a 29,5 °C (MANTELATTO e FRANZOZO, 1999).

Analisando a variação de temperatura e salinidade nos três ambientes estudados, é possível afirmar que os nossos resultados foram influenciados pela radiação solar e pela temperatura do ar, visto que a profundidade de coleta das amostras foi de apenas 10 cm, o que possibilita as trocas de calor entre as massas de água superficiais e o ar atmosférico. De acordo com Paulson e Simpson (1977), o conhecimento da distribuição de radiação solar na camada superficial dos oceanos é importante para a modelagem física, química e biológica dos processos. Sabe-se que uma das principais aplicações físicas é a modelagem do aquecimento das camadas superficiais pela absorção da radiação solar.

Os valores de pH da água do mar dos três locais estudados, estiveram dentro de uma faixa normalmente encontrada em águas estuarinas e oceânicas. O valor mais baixo (6,5) foi encontrado no Ponto 3, da Baixada Santista, local onde existe a predominância de contaminação industrial proveniente da região de Cubatão; e, em São Sebastião, próximo a região da marina. Os demais valores de pH variaram de 7,0 a 8,0, sendo encontrado nas três regiões estudadas.

Em relação à condutividade, o valor mais baixo (31,8 ms) também foi encontrado na Baixada Santista, no mesmo dia e no mesmo ponto (Ponto 1) onde foram encontrados os valores mais baixos de salinidade (19,7‰) e temperatura (16,3 °C). Os demais valores de condutividade variaram de 33,2 a 49,9 ms, sendo que o maior valor foi observado em Ubatuba. Os baixos valores de salinidade encontrados em Ubatuba, no ano de 2007, podem estar relacionados ao fato de que as regiões subtropicais podem ter sofrido precipitações intensas devido às mudanças nas condições meteorológicas, associadas à passagem de frentes frias, que acontecem durante todo o ano (MAHIQUES, 1995).

Os estuários e as regiões costeiras são ambientes de transição entre o continente e o mar, são corpos de águas rasas, com volumes variáveis, dependendo das condições climáticas e hidrológicas. Estes ecossistemas estão sujeitos a impactos

ambientais mais freqüentes que no oceano, pois por estarem mais próximos à costa são influenciados pelos processos naturais e antropogênicos. Isto devido à sua importância econômica, já que servem como via de transporte, turismo e como receptor de efluentes domésticos, industriais e agrícolas (BARREIRA-ALBA, 2004).

Contudo, os ambientes costeiros do Brasil vêm sofrendo nos últimos anos um considerável processo de degradação ambiental, gerado pela crescente pressão sobre os recursos naturais marinhos e continentais e pela capacidade limitada desses ecossistemas absorverem os impactos resultantes. A introdução de nutrientes, alteração ou destruição de habitats, alterações na sedimentação, superexploração de recursos pesqueiros, poluição industrial, principalmente de poluentes persistentes, e a introdução de espécies exóticas, constituem-se nos maiores impactos ambientais (GEOBRASIL, 2002).

Apurou-se que as concentrações de leveduras em amostras de areia foram altas e se relacionaram com os valores de pH. As maiores contagens de leveduras em amostras de água de mar foram encontradas no Canal de São Sebastião.

A qualidade microbiológica de amostras de água do mar do Canal de São Sebastião, Ubatuba e Baía de Santos foi avaliada utilizando indicadores de contaminação fecal, com o objetivo de caracterizar os três ambientes quanto ao nível de impacto antropogênico presente em cada região. Segundo os critérios estabelecidos, na Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 274/2000, densidades de coliformes termotolerantes, *E.coli* e enterococos intestinais superiores a 1000 UFC/100 mL, 800 UFC/100 mL e 100 UFC/100 mL, respectivamente, em duas ou mais amostras de um conjunto de análises, realizadas em cinco semanas consecutivas, caracterizam a impropriedade de uma praia para recreação de contato primário (balneabilidade). Apesar das coletas de amostras nesse trabalho não terem sido feitas semanalmente; e, sim mensalmente, os resultados das amostras foram avaliados como indicativas de contaminação pontual.

As amostras de água coletadas no Canal de São Sebastião e Ubatuba apresentaram contagens de Coliformes Termotolerantes, *E. coli* e Enterococos Intestinais abaixo dos valores estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 274/2000 para atividades de recreação de contato primário, mostrando assim que o nível de

impacto antropogênico é baixo nesses dois locais. Isso foi confirmado quando se compararam os resultados, obtidos nesse trabalho, com dados de balneabilidade da CETESB. As praias próximas aos pontos de coleta permaneceram próprias para atividades de recreação primária durante todo o ano de 2006 e 2007 (CETESB, 2008).

Na Baixada Santista, nos pontos 01 e 03 foram encontradas as maiores contagens dos indicadores de contaminação fecal, em comparação com os outros dois ambientes estudados. Principalmente nos meses de fevereiro e março de 2006, cujas as contagens de Coliformes Termotolerantes, *E. coli* e Enterococos intestinais chegaram a $8,4 \times 10^3$ UFC/100mL, $9,1 \times 10^2$ UFC/100mL e $4,9 \times 10^1$ UFC/100mL, respectivamente, ficando acima dos valores estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 274/2000. Isso não aconteceu em 100% das amostras coletadas no Ponto 02, da Baía de Santos, área usada para o cultivo de bivalves. Nesse os valores encontrados para os indicadores de contaminação fecal analisados ficaram abaixo dos valores estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 274/2000, indicando que esse local apresenta os menores índices de impacto antropogênico. Dados da CETESB mostraram que em 2006 e 2007, 54% e 60%, respectivamente, das praias de Santos tiveram classificação anual “ruim” para balneabilidade, demonstrando assim, o alto índice de contaminação da região de Santos (CETESB, 2008).

Os coliformes são pouco resistentes às altas salinidades, desta forma, sua detecção no ambiente marinho demonstra uma descarga constante de resíduos de origem fecal (HAGLER e HAGLER, 1988). São extremamente sensíveis a determinadas variações ambientais e podem, também, afetar sua sobrevivência, tais como, temperatura da água, baixa concentração de nutrientes, pH, sedimentação, luminosidade, oxigênio dissolvido, matéria orgânica, fitoplâncton, salinidade, entre outros (REGAN *et al.*, 1993). O índice pluviométrico é outro fator que pode interferir na contagem microbiana (LIZÁRRAGA-PARTIDA e CÁRDENAS, 1996).

Dentre os indicadores de contaminação fecal, deve-se considerar que os enterococos, se caracterizam pela alta tolerância a pH 9,6 e temperaturas de 10° e 45°C, com capacidade de crescer na presença de 6,5% de cloreto de sódio (CONAMA, 2001). Não se multiplicam em águas poluídas, indicando contaminação fecal recente, sendo mais utilizados para avaliação da qualidade de águas salinas, avaliação da água

tratada e avaliação e monitoramento das condições higiênico sanitária nas indústrias alimentícias (SILVA *et al.*, 2000).

A poluição presente na Baixada Santista, causada principalmente pela presença do porto de Santos, pelas indústrias da região de Cubatão e pelos esgotos domésticos liberados, tanto no estuário, quanto por meio do emissário submarino, é responsável pelos altos valores de Coliformes Termotolerantes, *E. coli* e Enterococos intestinais encontrados, nesse estudo, em comparação com os valores encontrados em amostras de água do mar do Canal de São Sebastião e Ubatuba.

Indicadores microbiológicos, como os coliformes termotolerantes, *E. coli* e enterococos intestinais, têm sido utilizados mundialmente para verificar a contaminação fecal dos corpos d'água, indicando assim a presença de bactérias patogênicas, que são uma ameaça à saúde pública humana, animal e dos ecossistemas (RIVERA e MARTINS, 1996; SHIBATA *et al.*, 2004; RIVERA *et al.*, 2008).

Spencer *et al.* (1970), estudando águas de ambientes marinhos no sul dos E.U.A., argumentaram que o número de leveduras torna-se rapidamente elevado após o despejo de resíduos domésticos nas águas; fato que pode estar correlacionado com o aumento de coliformes fecais.

A partir dos resultados e análises estatísticas obtidos nesse trabalho em relação às contagens de Coliformes Termotolerantes, *Escherichia coli*, enterococos intestinais foi possível classificar a Baixada Santista, o Canal de São Sebastião e Ubatuba como ambientes de alto, médio e baixo impacto antropogênico, respectivamente.

Programas de monitoramento da qualidade da água permitem avaliar o cenário ambiental de um determinado corpo d'água, possibilitando o estabelecimento de diagnóstico do recurso hídrico e servindo de parâmetro para os usos deste recurso (GALVÃO *et al.*, 2006) e, principalmente, como suporte para gestão ambiental.

6.2 LEVEDURAS EM AMOTRAS DE ÁGUA DE MAR E AREIA

O oceano é o único meio de subsistência para muitas comunidades principalmente nas populações costeiras em expansão (UNITED NATIONS, 2008). Entretanto, diversos estudos relatam que, especialmente desde a década de 1970,

vários ecossistemas aquáticos têm sido profundamente impactados, afetando significativamente as cadeias tróficas aquáticas, a diversidade, as atividades econômicas em águas costeiras e a saúde humana, principalmente quando ocorre a introdução de bactérias patogênicas (CARLTON, 1985; SMAYDA, 1997; IMO, 1997).

A avaliação das condições sanitárias dos ecossistemas aquáticos brasileiros é realizada, segundo os padrões de qualidade de água estabelecidos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) (resoluções número 20 de 1986, 274 de 2000 e 357 de 2005). As contagens de coliformes totais e termotolerantes e, recentemente as contagens de *Escherichia coli*, microrganismos relacionados ao trato intestinal de animais de sangue quente, são estabelecidas para determinar a que fim se destina um corpo d'água. Além destes, sugere-se um programa de monitoramento, a contagem de microrganismos heterotróficos autóctones do ambiente aquático, tais como bactérias e leveduras, cujo aumento na contagem indica um aporte de matéria orgânica não necessariamente de origem fecal, mas que pode levar a um aumento na contagem de populações autóctones potencialmente patogênicas (HAGLER *et al.*, 1986; ARAUJO *et al.*, 1991).

Nesta pesquisa, observou-se que, independente da atividade antrópica e do ambiente costeiro analisado, as leveduras estiveram presentes em 89% das amostras de água de mar; e, em 88,7% das amostras de areia das três regiões estudadas; porém, em concentrações diferentes. Entretanto, quando a frequência é analisada por região estudada, notou-se que na Baixada Santista foi de 100% nas amostras de água de mar e areia, seguido de Ubatuba (91,7% em água de mar e 100% em areia) e, por fim, no Canal de São Sebastião (82,5% em água de mar; e, 85% em areia).

O número de leveduras encontrados nas amostras de águas das regiões de São Sebastião e Santos apresentou uma tendência em relação às concentrações de Coliformes fecais, Enterococos intestinais, *E. coli* e Colifagos. Assim, é possível considerá-las como bons indicadores de poluição nos dois ambientes estudados.

Entretanto, a sua frequência na região de Ubatuba não foi relacionada a nenhum outro parâmetro microbiológico, podendo estar ligada ao aporte de matéria orgânica, principalmente pela presença de uma Marina no local (HAGLER *et al.*, 1986; ARAUJO *et al.*, 1991).

As leveduras presentes nas amostras de areia, das três regiões estudadas, não evidenciaram correlação com os parâmetros microbiológicos, apresentando correlação apenas com os parâmetros físico-químicos (condutividade, pH e salinidade), o que leva a considerar que as areias das praias sofrem influências abióticas que devem ser avaliadas.

Em amostras de areia do Ponto 2, de São Sebastião, foi observada a correlação entre a concentração de leveduras e pH. As variações do pH podem estar relacionadas com as marés, pois Kolm e Andretta (2003) relataram que durante as marés altas a variação é significativamente mais elevada do que durante as marés baixas.

Para as amostras de areia de Santos, foi observada a correlação entre as concentrações de leveduras e os parâmetros físico-químicos: condutividade e salinidade.

No Canal de São Sebastião, em amostras de água de mar, as leveduras foram encontradas com as maiores contagens, porém as maiores frequências de leveduras foram obtidas em amostras coletadas na Baixada Santista, para todas as amostras de água de mar e areia. Esses índices podem ser explicados pelo médio e alto impacto antrópico, respectivamente, das regiões citadas. As contagens de leveduras de amostras de água de mar das regiões de São Sebastião e Santos apresentaram correlação com os indicadores de contaminação fecal.

O Ponto 1, de São Sebastião, mostrou correlação entre as concentrações de leveduras, coliformes termotolerantes e *E. coli*.

Na região de Santos, em amostras de água do mar dos Pontos 1 e 3, as correlações entre as concentrações de leveduras, colifagos e coliformes termotolerantes permitiram classificar as duas áreas como impróprias para banho, de acordo a resolução CONAMA nº 274/2000. O Ponto 2, ponto controle, apresentou baixas concentrações para os indicadores de contaminação fecal, fora dos valores estabelecidos pela resolução, indicando que o local apresenta menor impacto antropogênico.

A presença de colifagos também foi observada, pois além de serem bons indicadores de contaminação fecal, são também considerados indicadores da presença

de enterovírus em águas naturais e/ou tratadas. Isso se deve ao fato de que esses vírus são mais resistentes aos processos de tratamento de água do que as bactérias indicadoras convencionais (ROMERO *et al.*, 1990).

A região de Ubatuba apresentou alta frequência de leveduras em amostras de água de mar (91,7 em ASD e 100% em CA) e areia (100% em ASD e CA), porém não houve correlação com os parâmetros microbiológicos. A concentração de leveduras do ponto 1, localizado na Marina, apresentou correlação com os valores de pH, quando nos meses de fev/06, fev/07 e mar/07, meses de alta temporada as concentrações de leveduras aumentaram de acordo com a variação do pH, o que pode estar relacionado à contaminação química pelas embarcações. Quanto ao Ponto 2, por estar localizado a mar aberto, não apresentou nenhuma correlação que indicasse maior contaminação.

Considerando que as leveduras são abundantes em águas costeiras (COOKE *et al.*, 1960; SPENCER *et al.*, 1970; AHEARN, 1973) informaram que este fato pode estar relacionado ao arrasto da terra pelos rios e canais, bem como de resíduos domésticos e industriais que aumentam os nutrientes para água de mar.

Entretanto, Kurtzman e Fell (1998) referem à baixa ocorrência e diversidade de leveduras em águas de ambiente hipersalino. As populações de leveduras são mais escassas na água do mar do que em água doce, e diminuem com a profundidade e a distância da superfície (VOLZ, 1974).

Bactérias, fungos, parasitas e vírus têm sido isolados de areia das praias e muitos deles são patógenos potenciais (WHO, 2003). Fatores que promovem a sobrevivência e a dispersão desses patógenos incluem a natureza da praia: fenômenos de marés, presença de esgoto sanitário, épocas de temporada com aumento do número de banhistas e a presença de animais. Transmissões desses organismos podem ocorrer por contato direto da pessoa ou por outros meios (CETESB, 2004).

As leveduras fermentativas (principalmente, *Candida krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*) podem ser bons indicadores de poluição doméstica e fecal, sendo frequentemente isoladas de águas poluídas por esgotos domésticos (WOOLLETT e HENDRICK, 1970). Hagler e Mendonça-Hagler (1981) referem-se às espécies de leveduras, que são encontradas em praias em menor proporção do que em águas de estuário poluído. Os autores encontraram *Candida*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*,

Debaryomyces e *Trichosporon* como gêneros mais freqüentemente isolados em águas de estuário poluído, concordando com o que já existe na literatura (HAGLER E MENDONÇA-HAGLER, 1981).

Tem sido expressa pela comunidade científica e órgãos ambientais, grande preocupação em relação a poluição da areia da praia, porque esta pode se tornar um material de reservatório para vetores de infecções. Contudo, a capacidade dos microrganismos isolados de amostras de areia de praia, que podem infectar banhistas e usuários das praias permanece não demonstrada, e a real extensão da ameaça à saúde pública não é conhecida. Por esta razão não há evidência de suporte para estabelecer um manual de valores para índices de organismos ou microrganismos patogênicos em areia de praia, ou seja, não existem “Valores Guia ou Valores Imperativos” definidos pela legislação para a qualidade micológica de areias de praias (CETESB, 2004).

O controle da balneabilidade enfoca principalmente a qualidade microbiológica das águas, entretanto, nos últimos anos tem aumentado a preocupação com a contaminação das areias das praias, devido ao crescente descarte inadequado de lixo, dejetos de animais (pombos e cães) e a poluição trazida pelas águas das chuvas (WHO, 2003). Assim, todas essas fontes, além das marés, disseminam microrganismos patogênicos na areia, colocando em risco a saúde da população que dela se utiliza nas áreas destinadas à balneabilidade para fins de recreação. Dessa forma faz-se necessário o levantamento das condições sanitárias periodicamente nas praias do estado de São Paulo.

Em função das incertezas científicas internacionais sobre o assunto, discutidas por ocasião da 60^a Reunião Ordinária do CONAMA, decidiu-se pela publicação da RESOLUÇÃO CONAMA 274/00, que classifica as praias para fins de balneabilidade. Em seu artigo 8º, recomenda aos órgãos ambientais a avaliação das condições parasitológicas e microbiológicas da areia para futura padronização.

6.3 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE *Trichosporon* spp.

As leveduras do gênero *Trichosporon* habitam nichos ecológicos naturais diversificados, podendo ser encontrados tanto no meio ambiente, como na superfície corpórea de seres humanos e animais (PAULA *et al.*, 1983; MARTINS *et al.*, 1989). Ocorrem também em substratos como madeira, solo, areia de praia e água salgada (HAGLER *et al.*, 1993). Porém, apresentam baixa adaptação a ambiente marinho ocorrendo preferencialmente em ambiente de água doce poluído (PAULA *et al.*, 1983).

A caracterização fenotípica para isolados ambientais de *Trichosporon* spp., avaliada nesse estudo, seguiu-se a metodologia tradicional para isolados clínicos. Porém, os resultados mostraram diferenças morfológicas e fenotípicas entre esses isolados.

Não foram observadas células apressórias em nenhum microcultivo de *Trichosporon* spp.. Essa característica está ligada às espécies *T. inkin* ou *T. ovoides*, que sofrem modificações morfológicas em segmentos terminais ou intercalares nas hifas dessas leveduras (De HOOG *et al.*, 2000). São facilmente distinguíveis, por isso, sua ausência, nesse estudo, pode estar associada às características individuais dos isolados.

Os caracteres macromorfológicos da colônia fúngica podem variar consideravelmente entre um meio de cultivo e outro, dependendo da constituição nutricional ou devido a diferentes tempos e temperaturas de incubação.

A temperatura é um dos parâmetros ambientais mais importantes, influenciando todas as atividades dos microrganismos (ROSE e HARRISON, 1987).

O estabelecimento do diagnóstico de infecções fúngicas tem sido relativamente difícil, justificando a necessidade da utilização de métodos mais rápidos e seguros. Dessa forma, CHROMagar Candida permite diferenciar as espécies de *Candida*, pela assimilação de cromógeos e, conseqüentemente, expressar cores variadas na identificação, foi testado em nossos isolados de *Trichosporon*. Esse meio tem sido testado, experimentalmente, para espécies de outros gêneros (GIUSIANO *et al.*, 2004), Nesta pesquisa, todas as espécies de *Trichosporon* testadas no meio CHROMagar,

apresentaram comportamento variável, não sendo possível um parâmetro para a identificação. Assim, CHROMagar Candida não parece ser uma alternativa promissora para a diferenciação de espécies de *Trichosporon* (GIUSIANO *et al.*, 2004). Entretanto para o isolamento de leveduras, o meio expressou ser tão seletivo quanto Agar Sabouraud Dextrose, com a vantagem de já no isolamento das leveduras, podermos obter uma triagem de leveduras.

De um total de 210 isolados, foram triados como suspeitos de *Trichosporon* spp. 102 isolados e na caracterização macro e micromorfológica apenas 50% (51/102) isolados foram confirmados pelo teste de produção de urease para o gênero *Trichosporon*. No grupo de leveduras *Basidiomycetes*, caracterizado pela produção de urease e incapacidade de fermentar carboidratos simples, como glicose, estão classificados os *Trichosporon* spp. Por isso, essas duas características também são utilizadas na diferenciação entre *Trichosporon* spp. e outras leveduras, tais como *Candida* spp. (uréase negativa e fermentação positiva) e *Geotrichum* spp. (uréase negativa e fermentação negativa), para que se não for possível suprimir, pelo menos diminuir possíveis confusões na identificação do gênero (GUÉHO *et al.*, 1992; GUÉHO *et al.*, 1993, KURTZMAN e FELL, 1998; De HOOG *et al.*, 2000).

Trichosporon behend foi caracterizado utilizando os seguintes: compostos de carbono (maltose, lactose, melibiose, celobiose, D-xilose, eritrol, ribitol e inositol) e de nitrogênio (nitrato), na chave de identificação para o gênero (KREGGER-VAN RIJ, 1984).

Os sistemas clássicos de identificação de leveduras baseiam-se em características morfológicas e fisiológicas (KREGGER-VAN RIJ, 1984; BARNETT *et al.*, 1990) e muitas vezes são incapazes de distinguir algumas espécies e, sobretudo, cepas de uma mesma espécie. Vários autores têm proposto chaves para a identificação do gênero *Trichosporon*, (AHEARN, 1970, KONEMAN, 1987, KURTZMAN E FELL, 1998) e para a identificação de espécies patogênicas emergentes (DE HOOG, 2000; RODRIGUES-TUDELA, 2005).

Nesse estudo, avaliaram-se 15 fontes de Carbono, 1 fonte de nitrogênio e peptona, número de substratos de carbono sugerido para o desempenho dos isolados de *Trichosporon* spp. Foram utilizadas 5 chaves de identificação, propostas na

literatura, e os resultados foram diferentes para as 5 chaves. Os dados foram confirmados por meio do auxanograma 39 isolados, porém, o resultado do número de isolados para as 5 chaves foi diferente. Esses métodos fenotípicos são utilizados em laboratórios de rotina, mas sua acurácia parece limitada (GUÉHO *et al.*, 1992; SUGITA *et al.*, 1994; SUGITA *et al.*, 1995; WALSH *et al.*, 2004). Frequentemente apresentam resultados inconsistentes para identificação de espécies de *Trichosporon*. Vale ressaltar que a maioria destes métodos não contempla as novas categorias taxonômicas em seus bancos de dados (DOOLEY, BECKIUS, JEFREY, 1994; FENN *et al.*, 1994; RAMANI *et al.*, 1998).

Desses 39 isolados identificados, 51,3% foram do Canal de São Sebastião (13/39 de amostras de água de mar e 7/39 de amostras de areia), 38,5% da Baixada Santista (amostras de areia 9/39 e água de mar 6/39) e 13,8% da região de Ubatuba (02/39 de amostras de água de mar, e 02/39 de amostras de areia).

A tolerância e crescimento em Agar Sabouraud Dextrose, acrescido de 0,1% de cicloheximida, pelos 39 isolados de *Trichosporon* spp. das três regiões estudadas foi de 66,7% positiva. Obteve-se o maior índice de tolerância entre os isolados de água de mar (69,23%) e areia (100%) de São Sebastião. Os isolados de areia (66,6%) da região de Santos tiveram maior tolerância que os isolados de água de mar (44,4%). Para os isolados de Ubatuba, foi obtido um resultado de 50% de tolerância para ambas amostras.

A cicloheximida é um antibiótico, usualmente, empregado para o controle de fungos filamentosos contaminantes de cultivos laboratoriais. Além dos fungos filamentosos, inibidos pela ação dessa substância, algumas leveduras também podem ser inibidas, como as do gênero *Trichosporon* (LACAZ *et al.*, 2002). De Hoog, descreve a sensibilidade para algumas espécies de *Trichosporon* de importância médica à cicloheximida, porém, não define tempo de incubação e crescimento. Assim, nesse estudo a incubação foi de 15 dias, para uma melhor confiabilidade dos testes. A literatura propõe que apenas a espécie *T. inkin* pode apresentar sensibilidade a 0,1% de cicloheximida (De HOOG *et al.*, 2000), o que não pode ser confirmado pelos nossos

resultados assegurados, pois embora tenha-se obtido sensibilidade à cicloheximida, não se detectou a espécie *T. inkin* nos nossos isolados nesse trabalho.

Na avaliação do teste utilizando o sistema API ID 32C, pode-se considerar que não foi promissor, pois não foi possível identificar as espécies de leveduras do gênero *Trichosporon*, como referenciado pelo fabricante. Os resultados apresentaram perfis de “excelente a duvidoso”, e para todos os isolados que foi possível identificar o gênero, indicou especificidade para *T. mucoides*. Resultados semelhantes foram obtidos por Li *et al.*, (2005), que testaram API 20 AUX para identificação de espécies do gênero *Trichosporon* e concluíram que o sistema não apresentou diferenciação entre as espécies. O API ID 32 C também foi empregado na identificação de *T. asahii* e *T. cutaneum*, no entanto, não se discutiu a eficiência do teste. Em contrapartida, o próprio fabricante especifica quais espécies podem ser identificadas, e *T. cutaneum* não é possível.

A atividade enzimática extracelular dos isolados de *Trichosporon* spp., das três regiões estudadas, variou conforme a enzima testada: Lipase (97,4% a 25 °C e 82% a 37 °C), seguida por proteinase com 71,8 % a 25 °C e 58,9% a 37 °C. Dessa forma, os menores índices de atividade foram para as enzimas fosfolipase (46,2% a 25 °C e 30,8% a 37 °C) e DNase (38,5% a 25 °C e 43,6% a 37 °C), apresentando assim atividade detectável.

As lípases são enzimas responsáveis pela hidrólise dos triglicerídeos, e consequente produção de glicerídeos e ácidos graxos livres; as fosfolipases atuam sobre os fosfolípídeos presentes nas membranas celulares. Os achados obtidos na presente pesquisa sugerem que lípase, proteinases e fosfolipases sejam as principais enzimas produzidas por *Trichosporon* spp. A literatura tem considerado a enzima lípase um importante fator relacionado à patogenicidade, de *Basidiomycetes* não-*Trichosporon* como leveduras do gênero *Malassezia* (RAN *et al.*, 1993). Considera-se que a expressão de fosfolipase parece ser mais intensa em *M. furfur* do que nas outras espécies do mesmo gênero (GANDRA *et al.*, 2006). No entanto, alguns pesquisadores afirmam não existirem indícios suficientes que comprovem a influência dessas enzimas lipolíticas na patogenicidade (VON KONELL, 2002).

Aproximadamente, oitocentas espécies de leveduras e outros fungos, representando em torno de setenta espécies, foram testadas por Ahearn *et al.* (1968b) quanto à capacidade de hidrolisar atividade proteolítica. Isolados de vários gêneros, incluindo *Endomycopsis*, *Kluyveromyces*, demonstraram significativa atividade de proteinase. Os organismos que apresentaram maiores atividade proteolíticas foram os isolados de *Candida lipolytica* e *C. punicea*, sendo também caseinolíticas como *Bullera alba*, e espécies do gênero *Trichosporon*.

Os resultados expressos pelos nossos isolados mostraram que houve maior atividade de proteinase nos isolados de água de mar (84% a 25 °C e 77,3% a 37 °C) e em isolados de amostras de areia (71,4% e 66,7% a 25 °C) coletadas em São Sebastião e Santos, respectivamente. A produção de fosfolipase foi mais alta em isolados de amostras de água (50% a 25 °C e 59% a 37 °C) e de areia (71,4% a 25 °C) de Santos. Em São Sebastião, (68,2% a 37 °C) em isolados de amostras de água de mar e (46,7% a 37 °C) em amostras de areia. Contudo, em Ubatuba a atividade foi baixa, em isolados de água (0% e 40%, 25 °C e 37 °C, respectivamente) e em areia, ausente quando submetidos à temperatura de 37 °C e 25% positiva quando incubado a 25 °C.

A atividade de lipase esteve presente em 92,2% e 54,9% dos isolados ambientais nas amostras das três regiões, quando submetidos às temperaturas de 25 °C e 37 °C, respectivamente. Em contraste, os resultados de DNase tiveram menor atividade para os isolados de São Sebastião, em isolados de amostras de água (25%); e em Santos; para as amostras de areia (28,6%).

Foi estabelecida uma classificação para o risco de infecções fúngicas para seres humanos e animais: *Trichosporon asahii*, *T. cutaneum*, *T. inkin*, *T. mucoides* e *T. ovóides*, que são consideradas espécies que essencialmente ocupam nichos ecológicos não-vertebrados, possuem habilidade relativamente alta de sobreviver em tecidos de organismos vertebrados, e são capazes de desenvolver micoses oportunistas superficiais e profundas (DE HOOG, 1996).

Além das infecções superficiais (pidra branca, dermatites e onicomicoses) às quais o gênero *Trichosporon* pode ser relacionado, quadros de tricosporonose

disseminados também têm sido observados. Esses casos de infecção invasiva são mais comuns em pacientes imunodeprimidos, como portadores da síndrome da imunodeficiência (COPPOLA *et al.*, 1992); transplantados (MORETTI-BRANCHINI *et al.*, 2001) e quadros como doenças hematológicas malignas (MEYER *et al.*, 2002).

As elevadas taxas de mortalidade decorrentes de infecções causadas por leveduras emergentes têm fundamentado a busca por protocolos terapêuticos mais eficazes e menos tóxicos; ao mesmo tempo, que novos fármacos vêm sendo criados (GARCIA-MARTOS *et al.*, 2001; BERGOLD; GEORGIADIS, 2004).

Vários autores sugerem que a sensibilidade das diferentes espécies de *Trichosporon* pode variar. *Trichosporon cutaneum*, uma espécie mais freqüentemente associada a infecções superficiais, demonstrou suscetibilidade aos antifúngicos (anfotericina B, fluconazol, itraconazol, cetoconazol e 5-fluorocitosina). No entanto, a espécie *T. mucoides* mais associada a processos invasivos, mostrou-se resistente a anfotericina B (GARCIA-MARTOS *et al.*, 2001). É confirmado por Bassetti e colaboradores, 2004, que os isolados envolvidos com fungemias, como *T. asahii*, já começaram a demonstrar resistência a formulações mais modernas, como anfotericina B lipossomal; e, aos triazólicos, como voriconazol, testadas *in vitro*.

Frente a isso, atualmente, pode-se evidenciar uma mudança marcante no perfil epidemiológico das leveduroses, ao serem relatados casos de infecções por espécies emergentes (CARVALHO *et al.*, 2008; MACEDO *et al.*, 2008).

Nesse estudo de forma geral, obteve-se sensibilidade à maioria das drogas testadas (caspofungina (CS), anfotericina-B (AP), cetoconazol (KE), fluconazol (FL), itraconazol (IT) e voriconazol (VO), com os isolados de amostras de água de mar e areia, porém, pode-se observar resistência em 3,3% (n = 1) dos isolados para anfotericina-B, 33,3% (n = 10) a caspofungina, 3,3% (n = 1) a cetoconazol, 13,3% (n = 4) a fluconazol, 10% (n = 3) a itraconazol e 6,6% (n = 2) a voriconazol. Destacando a maior resistência pela droga caspofungina.

Apresentando resistência às drogas, foram notificados isolados provenientes de São Sebastião (FL: 6,6%; IT: 6,6%; CS: 13,3%) e Santos (FL: 3,3%; VO: 3,3%; CS: 16,6%), regiões de médio e alto impacto antropogênico, respectivamente. Porém, os isolados de

Ubatuba, região de baixo impacto antropogênico, não apresentaram nenhuma resistência.

A anfotericina B tem sido considerada a mais eficaz droga nos casos de tricosporonose (BASSETTI *et al.*, 2004). Entretanto, desde a década de 1990, quando ainda se empregava a designação *T. beigelli*, estudos sugeriam a resistência de *Trichosporon* a esse polieno, suspeita que, posteriormente aos estudos taxonômicos de reclassificação do gênero, se confirmou para *T. asahii* (RODRIGUEZ-TUDELA *et al.*, 2005). Nesta pesquisa os isolados ambientais de *Trichosporon* spp. apresentaram valores de CIM=0,016 a 1,0 µg/mL, inferiores àqueles (CIM = 8 a 16 µg/mL) observados por outros autores (LI *et al.*, 2005). Os resultados de sensibilidade de *T. asahii* frente a anfotericina B verificados por Rodrigues-Tudela *et al.*, (2005) foram bastante variáveis (CIM = 0,5 a 16 µg/mL), ainda assim, superiores aos encontrados na presente investigação. Em relação às outras espécies de *Trichosporon*, a literatura concorda que as espécies *Trichosporon* não-*asahii* (como os isolados ambientais desta pesquisa), sejam mais resistentes aos triazólicos do que a anfotericina B (PAPHITOU *et al.*, 2002; RODRIGUES-TUDELA *et al.*, 2005).

Segundo Anaissie *et al.*, (1992), a administração de anfotericina B e fluconazol em associação foi capaz de prolongar a sobrevivência em estudos de tricosporonose experimental. Segundo os autores, o fato atribui-se à droga fluconazol, responsável inclusive pela diminuição das contagens de unidades formadoras de colônias (UFCs) nos rins de camundongos infectados. Recentes pesquisas no tratamento da Tricosporonose têm demonstrado a superioridade dos azólicos em relação à anfotericina B (PAPHITOU *et al.*, 2002; RODRIGUES-TUDELA *et al.*, 2005).

Nesse trabalho os resultados para fluconazol foram (CIM = 0,064 a 2,0 µg/mL) . Hadley *et al.* (2002), descreve resistência de *Trichosporon* spp. a fluconazol. Entretanto, Nettles *et al.* (2003) relata sucesso no tratamento da tricosporonose causada por *T. mucoides*, quando da administração *in vivo* de fluconazol.

Para o antifúngico Cetoconazol foi expresso uma CIM = 0,006 a 0,38 µg/mL. A ação da droga cetoconazol tem sido considerada “boa” diante do tratamento de infecções superficiais, tais como a piedra branca genital e piedra branca do cabelo,

respectivamente causadas pelas espécies *T. inkin* e *T. ovóides* (WALZMAN; LEEMING, 1989; KWON-CHUNG; BENNETT *et al.*, 1992; HERBRECHT *et al.*, 1993).

Nessa pesquisa, os testes evidenciaram que o representante azólico de 1ª geração, Itraconazol expressou CIM = 0,012 a 3,0 µg/mL. Na literatura, a droga itraconazol tem expressado efetividade nos testes de sensibilidade *in vitro* para *Trichosporon* spp (PAPHITOU *et al.*, 2002; RODRIGUES-TUDELA *et al.*, 2005).

O triazólico Voriconazol apresentou em nossos testes um CIM = 0,002 a 0,19 µg/mL. Os relatos, para o uso da droga voriconazol, descrevem como um antifúngico muito potente para o tratamento de Tricosporonose (MACGINNIS *et al.*, 1998; PAPHITOU *et al.*, 2002; UZUN *et al.*, 2000; RODRIGUES-TUDELA *et al.*, 2005).

A concentração mínima inibitória expressa nessa pesquisa para a droga equinocandina caspofungina foi de CIM = 0,023 a 1,0 µg/mL. A droga caspofungina, que é um antifúngico dos mais modernos, pertencente ao grupo das equinocandinas, apresenta atividade muito satisfatória no tratamento de infecções por leveduras do gênero *Candida*, especialmente associadas quando às fungemias. Entretanto ainda existem poucos trabalhos que demonstram sua atividade antifúngica contra *Trichosporon* spp. (PFALLER *et al.*, 2002; BASSETTI *et al.*, 2004).

Assim vale ressaltar que nessa pesquisa, com isolados de amostras de água de mar e areia, a maior resistência apresentada foi à droga caspofungina. Essa resistência também foi observada na literatura para amostras clínicas, quando *Trichosporon* spp. testados *in vitro*, bem como outras leveduras basidiomicetos, como *Cryptococcus* spp.. apresentaram resistência à caspofungina. Consequentemente, este antifúngico não é o mais recomendado para o tratamento (ESPINEL-INGROFF *et al.*, 1998).

Foi descrito um caso de sucesso no tratamento com caspofungina, como sendo a única droga administrada para um paciente, com *Trichosporonose*, causada por *T. inkin* (MADARIAGA *et al.*, 2003). Entretanto, outros autores atribuem o efeito da caspofungina sobre *Trichosporon* spp. ao sinergismo que esta desempenha, quando administrada em associação aos azólicos ou anfotericina B (BASSETTI *et al.*, 2004).

Dessa forma, a suscetibilidade pelas leveduras às drogas antifúngicas ainda deve ser mais bem avaliada na determinação de drogas mais efetivas e dos riscos do seu uso nas terapias.

O aumento de infecções fúngicas está associado a fatores de predisposição, especialmente em portadores de imunodeficiências adquiridas ou induzidas que incluem: enfermidades malignas, diabetes mellitus, doenças pulmonares dependentes de esteróis e tratamentos quimioterápicos ou imunossupressivos em transplantados (BANERJEE; SHANNON, 2001).

6.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS LEVEDURAS DO GÊNERO *Trichosporon*

As técnicas de tipagem moleculares baseadas na Reação em Cadeia pela polimerase (PCR) são rápidas e de fácil padronização. A reação de PCR é uma técnica que possibilita a amplificação de sequências específicas de DNA utilizando iniciadores (“primers”) e pode ser usado nos diferentes estudos da ecologia e sistemática bacteriana. Poucas tecnologias nos últimos anos provocaram um impacto tão profundo na Biologia Molecular quanto o PCR, inicialmente descrito por Mullis e Faloona (1987). De modo geral, esta técnica vem sendo empregada na detecção de microrganismos, detecção de genes codificadores de virulência, em estudos taxonômicos e em epidemiologia molecular, assim como para gerar polimorfismos que tenham importância na caracterização interespecies, ou da mesma espécie (VERSALOVIC *et al.*, 1991; SINGH *et al.*, 2001).

Na identificação de espécies de *Trichosporon*, além dos métodos fenotípicos tradicionais de caracterização morfológica e bioquímica, atualmente também tem sido utilizados métodos moleculares. Normalmente em laboratórios de rotina, somente os métodos fenotípicos são utilizados devido ao seu menor custo, porém os resultados parecem ter uma acurácia limitada (GUÉHO *et al.*, 1992; SUGITA *et al.*, 1994; SUGITA *et al.*, 1995; WALSH *et al.*, 2004). Contudo, os métodos moleculares podem oferecer melhores resultados na identificação, mas ainda não apresentam compatibilidade no

custo e praticidade para os laboratórios de rotina (SUGITA *et al.*, 2002; RODRIGUEZ-TUDELA *et al.*, 2005).

Através da reação em cadeia pela polimerase (PCR), para a identificação de espécie, detectamos 63,7% do total (102) de isolados suspeitos de *Trichosporon* spp. Os mesmos (65) foram submetidos à técnica de BOX-PCR e verificou-se que nos três ambientes estudados, para as amostras de água de mar e areia, foi encontrada uma alta diversidade genética entre esses isolados. No entanto, os resultados apresentados neste trabalho, demonstraram que a sequência BOX-A1 está presente no genoma de leveduras e foi suficiente para discriminar e agrupar as leveduras quanto ao tipo de amostra e origem do isolado.

As leveduras são fungos que têm como característica fundamental do seu ciclo de vida a ocorrência de um estágio unicelular. Este tipo de crescimento é adequado para a exploração de substratos líquidos, assim compreende-se que as leveduras sejam encontradas em diferentes tipos de ambientes aquáticos, incluindo os marinhos. Dentre as cerca de 1000 espécies presentemente conhecidas, algumas aparentam ser de origem marinha, dado que têm sido observados exclusivamente em água do mar. No entanto, em ambientes costeiros e estuarinos, além das populações autóctones, outras populações, leveduras alóctones, podem ser encontradas. As leveduras associadas ao tracto gastrointestinal do Homem e de outros mamíferos são encontradas em águas poluídas e é possível que pertençam ao grupo das espécies alóctones (CANHOS e VAZOLLER, 2006).

Do total de 102 suspeitos de *Trichosporon* spp., isolados em amostras de água de mar e areia, no teste de produção de uréase apresentou um resultado 50% positivo. Para os testes de assimilação de carboidratos (auxanograma) utilizando 5 diferentes chaves, a chave de Kurtzman foi mais eficiente para a identificação de gênero.

Utilizando o teste de otimização API ID 32 C, dos 86 isolados testados apenas 28 (32,5%) foram identificados como *T. mucoides*. Em contra partida, dos 102 isolados suspeitos de *Trichosporon* spp., testados na reação em cadeia pela polimerase (PCR), 65 isolados (63,7%) foram identificados em nível de gênero.

A identificação do gênero *Trichosporon* utilizando métodos fenotípicos e genotípicos está sendo muito controverso, pois existe variação de expressão na

assimilação de fontes de carbono e muita diversidade genética (RODRIGUES TUDELA, 2005). Resultados similares foram encontrados em nosso estudo quando o sequenciamento IGS1 foi mais expressivo do que o ITS1.

Dos 27 isolados de leveduras identificadas como pertencente ao gênero *Trichosporon*, pelo sequenciamento com ITS1 ou IGS1, 25 foram *Trichosporon debeurmannianum*, 1 *Trichosporon jirovecii* e 1 *Trichosporon domesticum*.

Dos isolados seqüenciados e caracterizados como *Trichosporon* spp., a maior porcentagem indicou similaridade a *Trichosporon debeurmannianum*, com maior freqüência encontrada em amostras de água de mar coletadas no Canal de São Sebastião (50%) e Santos (50%).

Embora, somente dois isolados de leveduras terem sido seqüenciados utilizando iniciadores para duas regiões diferentes (ITS1 e IGS1-26SS) e que todos os isolados submetidos ao sequenciamento com IGS1 foram identificados como *Trichosporon debeurmannianum*, não podemos afirmar que o seqüenciamento utilizando o iniciador para a região IGS1 é mais eficiente. Maiores estudos deverão ser feitos para avaliar a eficiência do método para a identificação de espécies de *Trichosporon* spp.

Vale ressaltar que na identificação de *Trichosporon asahii* está sendo proposta uma classificação dentro da mesma espécie em seis genótipos (RODRIGUES TUDELA, 2007).

7 CONCLUSÕES

- Os indicadores de contaminação fecal, bem como as leveduras foram úteis para se avaliar o nível de atividade antropogênica nos três ambientes costeiros.
- As maiores contagens de leveduras em amostras de água de mar em meio Agar Sabouraud Dextrose.
- As concentrações de leveduras em amostras de areia foram maiores em comparação com as de amostras de água do mar.
- O meio CHROMagar favoreceu o isolamento de leveduras do gênero *Trichosporon*.
- Os isolados ambientais apresentaram características bioquímicas diferentes dos isolados clínicos, dificultando a identificação tradicional.
- A técnica de PCR utilizada no presente estudo não foi eficiente para a rápida identificação do gênero *Trichosporon*, e metodologias alternativas de seqüenciamento é necessária.
- 33% das leveduras isoladas de amostras de água de mar e areia apresentaram resistência à caspofungina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABDEL-GAWAD, K. M.; Mycological and physiological studies of keratinophilic and other moulds associated with sheep wool. **Microbiological Research**. V.152, n.2, p.181-188, jul. 1997.

ABDEL-RAHMAN, S. M. Polymorphic exocellular protease expression in clinical isolates of *Trichophyton tonsurans*. **Mycopathologia**, v.150, n.2, p.117-120, jun. 2000.

ABDEL-RAHMAN, S. M. *Trichophyton tonsurans* exocellular protease expression: correlation with clinical presentation in tinea capitis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v.27, n.4, p. 268-271, jun.2002.

ABESSA, D. M. S.; SOUSA, E. C. P.M. DE; RACHID, B. R. F.; MASTROTI, R. R. Sediment toxicity in Santos estuary, SP, Brazil: Preliminary results. **Ecotoxicology and Environmental Restoration**, v.4, n. 1, p. 6-9, 2001.

ABESSA, D.M.S.; CARR, R.S.; BAUER, R. F.R; SOUSA, E.C.P.M.; HORTELANI, M.A.; SARKIS, J.E. Influence of a Brazilian sewage outfall on the toxicity and contamination of adjacent sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 50, p. 875-885, 2005.

AGARDY, T. e ALDER, J.. Coastal Systems. In: Ecocystems and human well-being – Current state and trends: findings of the condition., (Ed.). The millennium ecosystem assessment series, v. 1. Washington D. C.: Island Press, p. 515-543, 2005.

AHEARN, D. G., ROTH, F. J. e MEYERS, S.P.- Ecology and characterization of yeasts from aquatic regions of South Florida. **Mar. Biol.**, New York; v.1. p. 291-308, 1968.

AHEARN, D. G.; MEYERS, S. P., and NICHOLS, R. A. Extracellular proteinases of yeast and yeastlike fungi. **Applied Microbiology** 16: 1370-1374, 1968b.

AHEARN, D. G. Effects of environmental stress of aquatic yeasts population. In: Bella, W. **Baruch Symposium in Marine Science: estuarine microbiological ecology**. Columbia, University of South Caroline Press, Columbia. p. 433-440, 1973.

AHEARN, D. G. Identification and ecology of yeasts of medical importance, p.129-145. **Ind. J. E. Prier and H. Friedman** (ed.). Opportunistic pathogens. University Park Press, Baltimore, 1974.

ALEXANDER, B. D. Diagnosis of fungal infection: new technologies for the mycology laboratory. **Transpl. Infect. Dis.**, v. 4 (Suppl. 3), p. 32-37, 2002.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:**

Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ALMEIDA, B.C. **Diversidade de bactérias isoladas de água do mar no Canal de São Sebastião, Litoral Norte do estado de São Paulo**. 36 f. Qualificação (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the examination of water and wastewater**. 18^o ed., APHA, 1992.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ORGANIZATION. Microbiological examination. In: APHA (Ed.). **Microbiological Examination of Water and Wastewater**. 20th ed. Washington, D.C.: APHA, AWWA, WEF, 1998.

ANAISSE, E.; LOKS, A.; HACHEN, R.; RUBIN, R.; GRIFFEN, G.; ROBINSON, R.; SOBEL, J.; BODEY, G. Azoles therapy for *Trichosporonosis*: clinical evolution of eight patients, experimental and therapy for murine infection and review. **Clin. Infect. Dis.**, v. 15, p.781-787, 1992.

ANAISSE, E. J.; HACHEM, R.; KARYOTAKIS, N. C.; GOKASLAN, A.; DIGNANI, M. C.; STEPHENS, L. C. and TIN, U. C.. Comparative efficacies of amphotericin B, triazoles, and combination of both as experimental therapy for murine *Trichosporonosis*. **Antimicrob. Agents Chemother**. 38:2541-4, 1994.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Relatório: Água de Lastro, 2003.

AOKI S., ITO-KOWA S., NAKAMURA K., KATO J., NINOMIYA K., VIDOTTO V. Extracellular proteolytic activity of *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia** 128:143-150, 1994.

APHA. **Standard methods for the examination of water and Wastewater**. American Public Health Association, 19th edition, 953 p., New York, 1995.

ARAUJO, F. V.; VAN WEERELT, M. M. D.; FANCO, G. M. O.; SOARES, C. A . G.; HAGLER, A. N. e MENDONÇA-HAGLER, L. C. Classification based on coliform counts of coastal waters in metropolitan Rio de Janeiro, Brazil. In: MAGOON, O. T.; CONVEX, H.; TIPPIE, V.; TOBON, L. T. E. e CLARKE, D. (eds), *Coastal Zone*, 325 p, 1991.

ARÊA-LEÃO, A. E. Considerações sobre os Thallosporados. O gênero *Trichosporon*. '*Trichosporon minor*' n. Sp. Produtor da piedra axilar. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**.35: 729-745, 1940.

ARIKAN, S.; HASÇELIK, G. Comparison of NCCLS microdilution method and E-test® in antifungal susceptibility testing of clinical *Trichosporon asahii* isolates. **Diag Microbiol and Infec Dis**. 43: 107-11, 2002.

AYRES, R. S. e WESTCOTT, D. W. **A qualidade da água na agricultura**. Campina Grande, Paraíba, UFPb Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação, 1991. 208p.

BALAJEE, S. A.; SIGLER, L.; BRANDT, M. E. DNA and the classical way: identification of medically important molds in the 21st century. **Med. Mycol.**, v. 45, n. 6, p. 475-490, sep. 2007.

BANERJEE, A.; SHANNON, K. M. Leukemic transformation in patients with severe congenital neutropenia. **J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, v. 23, p. 487-495, 2001.

BARREIRA-ALBA, J.J. *Dinâmica Metabólica e Transporte de Propriedades no Sistema Estuarino-Lagunar de Cananéia-Iguape*. São Paulo. 405p. (Tese de Doutorado. Instituto Oceanográfico, USP), 2004.

BARROS, M. E. S.; SANTOS, D. A.; HAMDAN, J. S. In vitro methods for antifungal susceptibility testing of *Trichophyton* spp. **Mycological Research**, v. 110, n.11, p 1355-1360, nov. 2006.

BASSETTI, M.; BISIO, F.; DI BIAGIO, A.; PIERRI, I.; BALOCCO, M.; SORO, O.; CRUCIANI, M.; BASSETTI, D. *Trichosporon asahii* infection treated with caspofungin combined with liposomal amphotericin B. *J. Antimicrob.Chemother.*, v.1,p.575-577, 2004.

BELAUSTEGUIGOITIA, J. C. Causal Chain Analysis and Root Causes: The GIWA Approach. **Ambio**, v. 33, n. 1–2, p. 7-12, 2004.

BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. **Visão Acad.** V.5, p.159-172, 2004.

BHANSALI, S.; KARANES, C.; PALUTKE, W.; CRANE, L.; KIEL, R.; and RATANATHARATHORN, V.. Successful treatment of disseminated *Trichosporon beigellii* (*cutaneum*) infection with associated splenic involvement. **Cancer**. 58:1630-2, 1986.

BINDE, D.R.; MENNA, P.; BANGEL, E.V.; BARCELLOS, F.G.; HUNGRIA, M. rep-PCR fingerprinting and taxonomy based on the sequencing of the 16S rRNA gene of 54 elite commercial rhizobial strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, mar., 2009. Epub ahead of print.

BISWAS, S. K.; WANG, L.; YOKOYAMA, K.; NISHIMURA, K. Molecular phylogenetics of the genus *Trichosporon* inferred from mitochondrial cytochrome-b gene sequences. **Journal of clinical microbiology**, v, 43, n.10, p.5171-5178, 2005.

BOEKHOUT, T. A revision of ballistoconidia-forming yeasts and fungi. **Study Mycology** 33:1–194, 1991.

BONETTI, J. Remote sensing and GIS potentialities in the study of estuaries, lagoons and bays. In: MANGROVE 2000 – INTERNATIONAL SYMPOSIUM: SUSTAINABLE

USE OF ESTUARIES AND MANGROVE. **Challenges and Prospects**, 2000, Recife. Recife: UFPE, p.1-7, 2000.

BORIOLO M.F.G. *et al.* Ferramentas moleculares para caracterização de *Candida albicans* (Robin) Berkhout (1923) em estudos epidemiológicos. **Rev. Estud. Biolg.**, v. 27, n. 58, p. 21-42, 2005.

BRANCO, S. M. e ROCHA, A. A. Proteção e usos múltiplos de represas. São Paulo, CETESB. Edgard Blucher, 185 p. 1977.

BRITO A. C., COSTA C. A. A. "Piedra" em Belém do Pará. **An Bras Dermatol.** 1966; 41: 227-8.

BUSHELMAN, S.J.; CALLEN, J.P.; ROTH, D. N. Disseminated *Fusarium solani* infection. **J Am Acad Dermatol.** 32(2 Pt 2):346-351, 1995.

CANALES, M. A.; SEVILLA, J.; GUTIERREZ, O. P. and NAVARRO, F. H.. Successful treatment of *Trichosporon beigeli* pneumonia with itraconazole. **Clin. Infect. Dis.** 26:999-1000, 1998.

CANHOS, V. P. e VAZOLLER R. F. Estudo da diversidade microbiana: bactérias, fungos filamentosos e leveduras do Estado de São Paulo. Síntese e recomendações. **V.1**, Cap. 11, p.116-118, 2006.

CARLTON J. T. Transoceanic and interoceanic dispersal of coastal marine organism: the biology of ballast water. **Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.**, v. 23, p. 313-371, 1985.

CARNEIRO J. A., ASSIS F. A., TRINDADE FILHO J., CARVALHO C. A. Q. Piedra branca genital 40 casos. **An Bras Dermatol.** 1971; 46: 265-9.

CARRILLO-MUNÓZ, A.J.; QUINDÓS, G.; CÁRDENES, C.D.; VARGAS, R.A.; ARÉVALO, P.; BRIÓ, S.; MADARIAGA, L. Evaluación del medio Chromalbicans Agar para la identificación presuntiva de *Candida albicans*. **Rev Iberoam Micol** 18: 501-108, 2001.

CARVALHO, A. M. R.; MELO, L. R. B.; MORAES, V. L.; NEVES, R.P. Invasive *Trichosporon cutaneum* infection in an infant with wilms. **Brazilian Journal of Microbiology** 39:1-2, 2008.

CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R.. *Cryptococcus neoformans*. Washington: ASM Press, 541, 1998.

CASTRO FILHO, B.M.; MIRANDA, L.B.; MIYAO, S.Y. Condições hidrográficas na Plataforma Continental ao largo de Ubatuba: variações sazonais e em média escala. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, v. 35, n. 2, p. 135-151, 1987.

CASTRO FILHO, B.M. Wind driven currents in the Chanel of São Sebastião: winter 1979. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, v. 38, p. 111-132. 1990.

CAWLEY, M. J.; BRAXTON, G. R.; HAITH, L. R. *et al.* *Trichosporon beigelli* infection: experience in a regional burn center. **Burns**. V. 26, p. 483-486, 2000.

CETESB. Baixada Santista – Memorial Descritivo. Carta do meio ambiente e de sua dinâmica. Relatório técnico CETESB. São Paulo, SP 33p, 1985.

CETESB. **Dinâmica dos vazamentos de petróleo no Canal de São Sebastião**, São Paulo, 120p.,1996.

CETESB. Desenvolvimento de metodologias para diagnóstico, monitoramento e recuperação ambiental de ecossistemas costeiros: relatório de atividades. São Paulo, BR, 145p, 1997.

CETESB. **Relatório de balneabilidade das praias paulistas** – 1998. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, 230 p., São Paulo, 1999.

CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. 2004. **Relatório das águas litorâneas do Estado de São Paulo: balneabilidade das praias**. São Paulo, 2003.

CETESB. **Relatório de qualidade das águas litorâneas no estado de São Paulo**. Balneabilidade das praias 2004/2005 CETESB, São Paulo. 1 CD ROM 183p, 2004.

CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Estatísticas sobre vazamentos de óleo no estado de São Paulo**. Disponível em [HTTP://www.cetesb.sp.gov.br](http://www.cetesb.sp.gov.br). Acesso 13 abr. 2007.

CETESB. **Relatório de qualidade das águas litorâneas do estado de São Paulo 2007**. Série Relatórios, CETESB, 294 p, 2008.

CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Programa de monitoramento**. http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/praias/informacoes_imprensa.asp 04 nov. 2009.

CHEN, L.C.; BLANK, E.S.; CASADEVALL, A. Extracellular proteinase activity of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Diagn Lab Immunol* 3: 570-574, 1996.

CHEN S. C. A. *et al.* PHospHolipase activity in *Cryptococcus neoformans*: A new virulence factor. **The Journal of Infections Diseases**. V.175 p. 414-420, 1997.

CHRISTENSEN, W. B. Urea decomposition as a mean of differentiating *Proteus* and *Paracolon* cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. **J. Bacteriol.**, v.52, p.461-466, 1946.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. Villanova. PA. Approved Standard Document M-27-A., v.17, n.9,1997.

- COLOMBO, A.L. Diagnóstico de doenças fúngicas oportunistas: O Grande desafio para os centros médicos de atendimento terciário. **Infectologia**, Ano IX, nº 52, Jul-Ago, 2007.
- COMISSÃO MUNDIAL SOBRE MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO. Nosso Futuro Comum. Rio de Janeiro. Fundação Getúlio Vargas, 1988. 430p.
- CONAMA. Resoluções CONAMA, Nº. 274. Ministério da Habitação, Urbanismo e Meio Ambiente, 89 p., Brasília, 2000.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. RESOLUÇÃO nº 20 de 18 de junho de 1986. Estabelece a classificação das águas doces, salobras e salinas. Diário oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 18 de jun. p. 11-356, 1986.
- COOKE, B. W.; PHAFF, H. J.; MILLER, M. W.; SHIFRINE, M. e KNAFF, E. P. Yeasts in polluted water and sewage. **Mycologia**, v. 52. p. 210-220, 1960.
- COOKE, V.M.; MILES, R.J.; PRICE, R.G.; MIDGLEY, G.; KHAMRI, W.; RICHARDSON, A.C. New chromogenic agar medium for the identification of *Candida* spp. **Appl Envir Microbiol** 68: 3622-3627, 2002.
- COPPOLA, S.; ANGARAN O, G.; MONTAGNA, M. T.; CONGEDO, P.; BELLISARIO, A.; MONNO, L.; INFANTE, G.; PASTORE G. *Trichosporon beigelli* infection in AIDS patients undergoing antifungal prophylaxis – Report of two cases. **J.Micol. Med.**, v. 3, p.169-171, 1993.
- COUTINHO, S.D.; PAULA, C. R.. Proteinase, pHospholipase, hyaluronidase and chondroitin-sulphatase production by *Malassezia pachydermatis*. Medical Mycology (Oxford), Inglaterra, v. 38, p. 73-76, 2000.
- COX, G.M.; PERFECT, J.R. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and *gattii* and *Trichosporon* species. In: AJELLO, L.; HAY, R.J. TOPLEY e WILSON'S: microbiology and microbial infections. 9.ed. London: Oxford University Press, p.460-484, 1999.
- COX, G. M.; MUKHERJEE, J.; COLE, G. T.; CASADEVALL, A. e PERFECT, J.R. Urease as a Virulence Factor in Experimental Cryptococcosis. **Infect Immun.**, 68(2): 443-448, 2000.
- CROCCO, E.; MIMICA, L.; MURAMATU, L.; GARCIA, C.; SOUZA, V.; RUIZ, L.; ZAITZ, C. Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica *in vitro*: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. **An. Bras. Dermatol**, Rio de Janeiro, 79(6):689-697, nov/dez, 2004.
- CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L. Pueden basarse las indicaciones de los antifúngicos en los estudios de sensibilidad. **Revista Ibero americana de Micologia**, v. 19, p. 133-38, 2002.

DASSANAYAKE, R. S.; SAMARANAYAKE, L. P. Amplification-based nucleic acid scanning techniques to assess genetic polymorphism in *Candida*. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 29, n. 1, p. 1-24, 2003.

DE BRUIJN F. J. Use of Repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergeneric Consensus) Sequences and the Polymerase Chain Reaction To Fingerprint the Genomes of *Rhizobium meliloti* Isolates and Other Soil Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 7., p. 2180-2187, 1992.

De HOOG G. S.; GUARRO J.; GENÉ J. FIGUEIRAS M. J. **Atlas of clinical fungi** 2.ed., ULFRECH e RÉUS: Centralbureau Voor Schimm el Cultures to Universitat Rovira; Virgili, 126p, 2000.

DE HOOG, G. S. Risk assessment off ungi reported from humans and animals. **Mycoses**, v. 39, p. 407-417, 1996.

DOMBEK, P. E.; JOHNSON, L. K.; ZIMMERLEY, S. T.; SADOWSKY, M.J. Use of Repetitive DNA Sequences and the PCR To Differentiate *Escherichia coli* Isolates from Human and Animal Sources. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2572-2577, 2000.

DOOLEY, D.P.; BECKIUS, M.L.; JEFFREY, B. S. Misidentification of clinical yeast isolates by using the updated Vitek Yeast Biochemical Card. **J Clin Microbiol.** 32(12):2889-92, 1994.

ELLNER, K.; MCBRIDE, M.E.; ROSEN, T.; BERMAN, D. Prevalence of *Trichosporon beigeli*. Colonization of normal perigenital skin. **Journal of Medicine and Veterinary Mycology**, v.29, p.99-103, 1993.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Improved enumeration Methods for the recreational water quality indicators: Enterococci and *Escherichia coli***. Washington, D.C.: EPA, 2000, v. 821/R-97/004. 49 p.

ESPINEL-INGROFF, A.; KISH, C. W.; KERKERING, T. M.; FRONTLING, R. A.; BARTIZAL, K.; GALGIANI, J. N.; PFALLER, M. A.; GERARDEN, T.; RINALDI, M. G.; FOTHERGILL, A. Collaborative comparison of both macrodilution and microdilution antifungal susceptibility testes. **J.Clin. Microbiol.**, v.30;p. 3138-3145, 1992.

ESPINEL-INGROFF, A. Comparison of in vitro activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. **J Clin Microbiol.** 36:2950-2956, 1998.

ESPINEL-INGROFF, A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; IQBAL, N.; ELLIS, D.; PFALLER, M. A.; MESSER, S.; RINALDI, M.; FOTHERGILL, A.; GIBBS, D.L.; WANG, A. Multicenter evaluation of a new disk agar diffusion method for susceptibility testing of filamentous fungi with voriconazole, posaconazole, itraconazole, amphotericin B and caspofungin. **J. Clin. Microbiol.**; 45:1811-1820, 2007a.

- ESPINEL-INGROFF, A.; PFALLER, M.A. Susceptibility test methods for fungi. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. (Eds.). **Manual of Clinical Microbiology**, 9th Ed. ASM Press, Washington, DC. 1973-1986, 2007b.
- ESTEVEZ, F.A. **Fundamentos de Limnologia**. Editora Interciência, 575 p., Rio de Janeiro, 1988.
- FAO. (Food and Agriculture Organization) Integrated coastal area management and agriculture, forestry and fisheries. Scialabba, N. (Ed.). FAO Guidelines. Environment and Natural Resources Service, Rome: FAO, 256p, 1998.
- FAO (Food and Agriculture Organization). Report and Proceedings of the Expert Workshop on DNA-based Molecular Diagnostic Techniques: Research Needs for Standardization and Validation of the Detection of Aquatic Animal Pathogens and Diseases. **Fisheries Technical Paper**, n. 395, Bangkok, 1999.
- FARACO, B. F. C. e FARACO, B. A. Poluição hídrica micológica. **Rev. Bras. Med.**, v.33, p.385-387, 1976.
- FELL, J. W.; AHEARN, S. P.; MEXERS, S. P.; ROTH, F.J. Jr. Isolation of yeasts from Biscayne, Florida, and adjacent benthic areas **Limnol. Oceanogr.** V. 5. P. 366-371, 1960.
- FELL, J. W. e van UDEN, N. Yeasts in marine environments. In: Oppenheimer, C. H. – **Symposium on Marine Microbiology**. Springfield, Charles C. Thomas, p.329-340, 1963.
- FELL, J. W. Distribution of yeasts in the Indian Ocean. **Bull. Mar. Sci.**, v.17, p.454-70, 1967.
- FELL, J. W.; BOEKHOUT T.; FONSECA A.; SCORZETTI G.; STATZELL-TALLMAN A. Biodiversity and systematic of basidiomycetous yeast as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **Int. Journal of Syst. And Evol. Microbiology**, v.50, p.1351-1371, 2000.
- FENN, J. P.; SEGAL, H.; BARLAND, B.; DENTON, D.; WHISENANT, J.; CHUN, H.; CHISTOFFERSON, K.; HAMILTON, L.; CARROLL, K. Comparison of updated Vitek yeast biochemical card and API 20C strip for yeast identification system. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1184-7, 1994.
- FERNÁNDEZ-TORRES, B.; CARRILLO, A. J.; MARTÍN, E.; DEL PALACIO, A.; MOORE M. K.; VALVERDE, A.; SERRANO, M.; GUARRO, J. In Vitro Activities of 10 Antifungal Drugs against, 508. **DermatopHyte Strains. Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, n.9, p.2524-2528, 2001.
- FERNÁNDEZ-TORRES, B.; CABAÑES, F. J.; CARRILLO-MUÑOS, A. J.; ESTEBAN, A.; INZA, I. ABARCA, L.; GUARRO, J. Collaborative evaluation of optimal antifungal

susceptibility testing conditions for dermatophytes. *Journal of Clinical Microbiology*, v.40, n.11, p. 3999-4003, nov. 2002.

FERNÁNDEZ-TORRES, B.; INZA, I.; GUARRO, J. In vitro activities of the new antifungal drug eberconazole and three other topical agents against 200 strains of dermatophytes. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n.11, p. 5209-5211, Nov. 2003.

FERRAZZA M.H.S.H., *et al.* Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, v. 27, n. 2, p. 58-63, 2005.

FOTEDAR, R.; AL-HEDAITHY, S.S.A. Identification of chlamyospore-negative *Candida albicans* using CHROMagar Candida medium. *Mycoses* 46: 96-103, 2002.

FRICKER-HIDALGO, H.; VANDAPEL, O.; DUCHESNE, M.; MAZOYER, M.; MONGET, D.; B.; LEBEAU, B.; FRENEY, J.; AMBROISE-THOMAS, P.; GRILLOT, R. Comparison of the New API *Candida* system to the ID 32C system for identification of clinically important yeast species. *J Clin Microbiol.* 34(7): 1846-8, 1996.

FUNDAÇÃO SISTEMA ESTADUAL DE ANÁLISE DE DADOS (SÃO PAULO). SABESP. **Projeções para o estado de São Paulo: população e domicílios até 2025.** São Paulo: A Fundação, 2004.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. Programa para a conservação das zonas Costeira e Marinha sob influência do bioma Mata Atlântica – Criação e Consolidação de unidades de conservação marinhas. Edital 02/2008.

FUNDESPA, 1999. Levantamento oceanográfico da área diretamente afetada por efluentes de emissários submarinos de esgotos da Sabesp, entre os municípios de São Sebastião e Mongaguá, Estado de São Paulo. Relatório Final. Volume1. Fundação de Estudos e Pesquisas Aquáticas. São Paulo 182p.

GACSER, A.; SCHAFER, W.; NOSANCHUK, J.; SALOMON, S.; NOSANCHUK, J.. Virulence of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* in reconstituted human tissue models. *Fungal Genetics*. 2007 Article in press.

GALVÃO, J.A.; FURLANI, E.F.; SÁLAN, E.O; PORTO, E.; OETTERER, M. Características físico-químicas e microbiológicas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) da água e dos mexilhões cultivados em Ubatuba, SP. *Ciências Agrotécnicas*, Lavras, 30(6): 1124-1129, 2006.

GANDRA, R. F.; SIMÃO, R. C. G.; MATSUMOTO, E. F.; SILVA, B. C. M.; RUIZ, L. S.; SILVA, E. G.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R. Genotyping by RAPD-PCR analyses of *Malassezia furfur* strains from *Pityriasis versicolor* and seborrhoeic dermatitis patients. *Mycopathologia* 00:1-8, 2006.

GANOULIS J. G. Water quality assessment and protection measures of a semi-enclosed coastal area: the Bay of Themeikos (NE Mediterranean Sea). *EMECS* 90, v.23, p.83-87, 1991.

GARCIA-MARTOS, P.; DOMINGUEZ, I.; MARIN, P.; GARCIA-AGUDO, R.; AOUI, S.; MIRA. J. Antifungal susceptibility of emerging yeasts pathogens. **Enferm. Infect. Microb. Clin.**, v.19, p. 249-256, 2001.

GARCIA-MARTOS P., RUIZ-ARAGON J., GARCIA-Agudo L., LINARES M. Dermatofitosis por *Microsporum gypseum*: descripción de ocho casos y revisión de la literatura. **Rev Iberoam Micol.** 2004 Sep; 21(3):147-9.

GEO BRASIL 2002. **Perspectivas do Meio Ambiente no Brasil**. Brasília, D. F.: Edições IBAMA, 440 p, 2002.

Ghannoum, MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 13: 122-143, 2000.

GHÉHO,E.; IMPROVISI, L.; CHRISTEN, R.; DE HOOG, G. S. Phylogenetic relationships of *Cryptococcus neoformans* and some related basidiomycetous yeast determined from partial large subunit rRNA sequences. **Ant. Leeuwenhoek**, v. 63, p.175-189, 1993.

GIACOIA GP. *Trichosporon beigellii*: a potential cause of sepsis in premature infants. **South Med J**, 85:1247-8, 1992.

GIL-LAMAIGNERE, C.; ROILIDES, E.; HACKER, J.; MULLER F. M. Molecular typing for fungi--a critical review of the possibilities and limitations of currently and future methods. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 9, n. 3, p. 172-85, 2003.

GIUSIANO G. E.; MANGIATERRA, M.; ROJAS, F.; GOMES, V. Yeasts species distribution in neonatal intensive care units in northeast Argentina. **Mycoses**, v. 47,p. 300-3003, 2004.

GONDIM-GONÇALVES H., MAPURUNGA A. C. P., MELO-MONTEIRO C., LOWY G., LIMA A. A. B. Piedra Branca - revisão de literatura a respeito de três casos. *Rev Bras Med.* 48: 541- 7, 1991.

GOTO S.; YAMASATO K., OKUNO D. Et. Lizuka, H. Yeasts from the Pacific ocean. **Proc.IV I FS: Ferment. Technol.** Today, 1972.

GRANADE T. C., ARTIS W. M. Antimycotic susceptibility testing of Dermatophytes in Microcultures with a Standardized Fragmented Mycelial Inoculum. **Antimicrob Agents Chemother.** Apr: 725 – 729, 1980.

GRAUER, M. E.; BOKEMEYER, C.; BAUTSCH, W.; FREUND, M. and Link, H.. Successful treatment of a *Trichosporon beigellii* septicemia in a granulocytopenic patient

with amphotericin B and granulocyte colony-stimulating factor. **Infection**. 22:283-6, 1994.

GROLL, A.H. & WALSH, T.J. Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats. **Clin Microbiol Infect**. 7(supplement 2): 8-24, 2001.

GUARRO, J., GENE', J. e STCHIGEL, A. M. Developments in Fungal Taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, 12: 454-500, 1999.

GUÉHO E., SMITH, M. Th.; De HOOG, G. S.; BILLON-GRAND, G.; CHRISTEN, R. e BATENBURG-VAN DER VEGTE, W. H. Contributions to a revision of the genus *Trichosporon*. **Antonie Leeuwenhoek**, v.61, p.289-316, 1992.

GUÉHO E., IMPROVISI L., de HOOG GS, DUPONT B. *Trichosporon* on humans: a practical account. **Mycoses**; 37(1-2); 3-10, 1994.

GUIDELINES OF CARE FOR SUPERFICIAL MYCOTIC INFECTIONS OF THE SKIN: PIEDRA. **J Am Acad Dermatol.**, 34: 122-4, 1996.

GUILLAMÓN, J. M.; SABATÉ, J.; BARRIO, E.; CANO, J.; QUEROL, A. Rapid identification of wine yeasts species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. **Archives of Microbiology**. V.169, p. 387-392, 1998.

HADLEY, S.; MARTINEZ, J. A.; MCDERMOTT, L.; RAPINO B.; SNYDMAN, D. R. Real-time antifungal susceptibility screening AIDS management of invasive yeast infection in immunocompromised patients. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.49,p.415-419, 2002.

HAGLER, A. N. **Ecologia e Taxonomia de leveduras em um estuário poluído e ambientes marinhos do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro. Tese de Doutorado. Instituto de Microbiologia, UFRJ., 1978.

HAGLER, A. N., L.C. MENDONÇA-HAGLER, ROSA C. A.; MORAIS P. B. Yeasts as an example of microbial diversity in Brazilian Ecosystems. Estrutura: In **Decologia Brasilensis**. Vol. 1. Funcionamento e Manejo de Ecossistemas (F. A. Esteves Ed.) UFRJ, Rio de Janeiro, p. 225-244, 1979.

HAGLER, A. N. e MENDONÇA-HAGLER L. C. Yeasts from marine and estuarine waters with different levels of pollution in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Appl. Environ. Microbiol**. V.41 n.(1), p 173-178, 1981.

HAGLER, A. N.; OLIVEIRA R. B.; MENDONÇA-Hagler L. C. Yeasts in the intertidal sediments of a polluted estuary in Rio de Janeiro, Brasil. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **J. Microbiol**. v.48, p. 53-56, 1982.

HAGLER, A. N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; SANTOS, E. A.; FARAGE, S. e SILVA-FILHO, J. B. e SCHARNK, A. Microbial pollution indicators in Brazilian tropical and subtropical marine surface waters. **The Science of the Total Environment**. v. 58, p.151-160, 1986.

HAGLER, A. N. e AHEARN, D. G. Ecology of aquatic yeast. In: Rose, A. H. e HARRISON, J. S. Eds. The yeast. 2 Ed. London, Academic Press. p.181-205, 1987.

HAGLER, A. N. e HAGLER, L. C. S. M. Indicadores microbiológicos de qualidade sanitária, p. 88-9, in ROITMAN, I.; TRAVASSO, L. R. e AZEVEDO, J. L.(Eds.), Tratado de **Microbiologia**. Manole, São Paulo, 1988.

HAGLER, A.N.; ROSA, C.A.; MORAIS, P.B.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; FRANCO, G.M.O.; ARAÚJO, F.V.; SOARES, C. A.G. Yeasts and coliform bacteria of water accumulated in bromeliads of mangrove and sand dune ecosystems of southeast Brazil. **Can. J. Microbiol.** , 39: 973-977, 1993.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, v. 41, p. 95-98, 1999.

HANEL A. Activity of *Candida albicans* isolated from the intestine of psoriatic patients. **Zentrum Fiir Dermatologie**, Germany, v.31, p. 451-457, 1988.

HANEL, H.; KIRS, R.; SCHIMIDTS, H. New systematically active antimicrotocs from the betablocker category. **Mycoses**, v. 38, n.7-8, p.251-264, 1995.

HANKIN L. e ANAGNOSTAKIS S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, v.67, n (3), p.597-607, 1975.

HAZEN, K. C. New and emerging yeast pathogens. **Clin. Microbiol. Rev.** 8: 462- 78, 1995.

HERBRECHT, R.; KOENIG, H.; WALLER, J.; LIU, K. L.; GUÉHO, E. *Trichosporon* infections: clinical manifestations and treatment. **J Mycol Med** 1993:3:129-36.

HOMMA, M. *et al.* Detection of intracellular forms of secretory aspartic proteinase in *Candida albicans*. **Journal of General Microbiology**. London, v.138, p. 627-633, 1992.

HURLEY, R.; LOUVOIS J.; MULHALL A. Yeasts as human and animal pathogens. In: **The Yeasts**, 2nd ed., by Rose, A, H. and Harrison, J. S., Academic Press, London, p. 207-281, 1987.

HUTCHINSON, G. E. A treatise on Limnology: introduction to lake biology and limnoplankton, London, John Wiley e Sons, v. 2, 115 p, 1967.

HYNES, H. B. N. The biology of polluted waters. Liverpool, U.K., University Press, 202p, 1974.

IBRAHIM, A. S.; MIRBORDE, F.; FILLER, S. G.;BANO, Y.; COLE, G. T.; KITAJIMA, Y.; EDWARDS, J. E. NOZAWA, y.; CHAMMOUM, M. A. Evidence implicating pHospolipase as a virulence factor of *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 63, n.5, p. 1993-1998, maio, 1995.

ICHIKAWA, T.; SUGITA, T.; WANG, L.; YOKOYAMA, K.; NISHIMURA, K.; NISHIKAWA, A. Phenotypic switching and HexNAcase activity of the Pathogenic yeast *Trichosporon asahii*. **Microbiol. Immunol.** **48**:237-242, 2004.

ISHII, S.; SADOWSKY, M.J. Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 4, 733-740, 2009.

JEFFRIES, C. D.; HOLTMAN, D. F.; and GUSE, D. G. Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acid. *J. Bacteriol.* **73**: 590- 591, 1957.

JESSUP, C. J.; WARNER, J.; ISHAM, N.; HASAN, I.; GHANNOUM, m. a. Antifungal Susceptibility Testin of DermatopHytes: Establishing a Medium for Inducing Conidial Growth and Evaluation of Susceptibility of Clinical Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.1,p. 341-344,Jan. 2000.

JICKELLS, T. D.. Nutrient biogeochemistry of the coastal zone. *Science*, v. 281, p. 217-222, 1998.

JOHNSON, T. W.; SPARROW, T. K. Fungi in oceans and estuaries. Weinheim: **J. Cramer Company**, p.668, 1961.

JONES, E. B. G. The ecology and rotting ability of marine fungi. In: *Marine borers, fungi and fouling organisms of wood*. Paris: O.E.C.D., 1971.

JUKES, T.H.; CANTOR, C.R. Evolution of protein molecules. In: MUNRO, H.N. (Ed). **Mammalian protein metabolism**. New York: Academic Press, 1969. p. 21-132.

KAPLAN, W. Piedra in lower animals; a case of White piedra in a monkey and a review of literature. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 134, p. 113-117, 1959.

KARACA, N.; KOÇ, A. N. In vitro susceptibility testing of dermatopHytes: comparasion of disk diffusion and reference broth dilutin methods. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.48, n.4, p. 259-264, abr. 2004.

KATAOKA-NISHIMURA, S.; AKIYAMA, H.; SAKU, K.; KASHIWA, M.; MORI, S.; TANIKAWA, S.; SAKAMAKI, H.; ONOZAWA, Y. Invasive infection due to *Trichosporon cutaneum* in patients with hematologic malignancies. **Cancer**. **82**(3):484-7, 1998.

KOEUTH, T.; VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J.R. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. **Genome Research**, v. 5, p. 408-418, 1995.

KOLM, H. E.; ANDRETTA, L. Bacterioplankton in different tides of the Perequê tidal creek, Pontal so Sul, Paraná, Brazil. *Brasilian Journal of Microbiology*, São Paulo, **34**: 97-103, 2003.

KONEMAN, R. *Micologia: prática de laboratório*. Editora Panamericana, Buenos Aires, 221 p. 3^a ed. 1987.

KRCMERY, V.; ORAVCOVA, C. Jr.; SPANIK, S.; MRAZOVA-STUDENA, M.; TRUPL, J.; KUNOVA, A.; STOPKOVA-GREY, K.; KUKUCKOVA, E.; KRUPOVA, I.; DEMITROVICOVA, A.; and KRALOVICOVA, K.. Nosocomial breakthrough fungaemia during antifungal prophylaxis or empirical antifungal therapy in 41 cancer patients receiving antineoplastic chemotherapy: analysis of aetiology risk factors and outcome. **J Antimicrob Chemother.** 41:373-380, 1998.

KRCMERY, V. J.; MATEICKA, F.; KUNOVA, A., *et al.* Hematogenous *Trichosporon*osis in cancer patients: report of 12 cases including 5 during prophylaxis with itraconazole. **Support Care Center.** 7:39-43, 1999.

KREGER VAN-RIJ, N. J. W. *The yeasts: a taxonomic. Study.* 3^a. ed. Amsterdam, Elsevier, North Holland, 1082 p., 1984.

KREMERY, V.; KRUPOVA, L. e DENNING, D. Invasive yeast infections others than *Candida* spp. In acute leukaemia. **Journal of Hospital Infection.** v. 41, p. 181-194, 1999.

KUNOVÁ, A.; SORKOVSKÁ, D.; SUFLIARSKY, J. *et al.* First reports of catheter associated *Trichosporon pullulans* breakthrough fungemia in cancer patient. **Journal of Infection.** V.32, p. 70-71, 1996.

KUROKAWA, C. S.; SUGIZAKI, M. F.; PERAÇOLI, M. T. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. **Rev .Inst. Med. Trop. São Paulo.** v.40, p.125-135, 1998.

KURTZMAN, P.C. e FELL, J.W. - **The yeasts, a taxonomic study.** 4. ed. Amsterdam, Elsevier, 1998.

KWON-CHUNG K.J., POLACHEK I., and BENNETT J.E. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (Serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (Serotypes B and C). **J. Clin. Microbiol.** 15(3):535-537, 1982.

KWON-CHUNG, K.J. *et al.*; Genetic evidence for role of extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*. **Infection and Immunity,** v. 49.p.571-575, 1985.

KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E. **Medical Mycology.** Philadelphia: Lea e Febiger, 866p, 1992.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. **Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico.** São Paulo, Sarvier, 1984.

LACAZ C. S.; PORTO E.; MARTINS, J. E. C. **Micologia Médica : fungos actinomicetos e algas de interesse médico,** 8a.ed. São Paulo : Savier-EDUSP, 695p, 1991.

LACAZ C. S., PORTO E. HEINS-VACARI E. M. MELO N. T. Guia para identificação: Fungos Actinomicetos, Algas de interesse médico. São Paulo: Sarvier, p.138-9, 1998.

LACAZ C. S. ; PORTO E.; MARTINS, J. E. C. ; HEINS-VACARI, E, M. ; MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica**. São Paulo: Sarvier, 2002.

LAMPARELLI, C. C.; MOURA, D. O.DE; CAIRES,M. M. DE. **Relatório de balneabilidade das praias paulistas**, 2001.

LASCAUX, A.S.; BOUSCARAT, F.; DESCAMPS, V.; CASALINO, E.; PICARDI-DAHAN, C.; CRIEKX, B.; BELAICH, S. Cutaneous manifestations during disseminated trichosporonosis in na AIDS patients. **Ann Dermatol Venereoln**. 125: 111-3, 1998.

LAW, D. ; MOORE, C. B.; JOSEPH, L. A. *Et al*. High incidence of antifungal drug resistende in *Candida tropicalis*. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.7, p. 241-245, 1996.

LEAF H.L.; SIMBERKOFF M.S. Invasive *Trichosporonosis* in a patient with the acquired immunodeficiency syndrome. **J Infect Dis** :160:356-7, 1989.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Principles of biochemistry**. 2nd Ed. New York: Worth Publishers, 1993. 725p.

LESTINI, B. J. ; CHRCH, J. A. *Trichosporon pullulans* as a complication of chronic granulomatous disease in a patient undergoing immunosuppressive therapy for inflammatory bowel disease. **Pediatr. Infect. Dis. J**. 25 : 87-9, 2006.

LI, H. M. ; DU, H. T. ; LIU, W. ; WAN, Z. ; LI, R. Y. Microbiological characteristics of medically important *Trichosporon species*. **Mycopathologia**. 160 : 217-25, 2005.

LIMA, E. B.; PAIVA, S. C.; REGO, R. C. P.; GAZINEU, M. H. P. e SALGUEIRO, A. A. Investigação de Metais em água de abastecimento no Município de Rio Formoso-PE. **Higiene Alimentar**, v.15, p.68-72, 2001.

LINTON, C. J., BORMAN, A. M.; CHEUNG, G.; HOLMES, A. D.; SZEKELY, A.; PALMER, M. D.; BRIDGE, P. D.; CAMPBELL, C. K.; JOHNSON, E. M. Molecular identification of unusual pathogenic yeast isolates by large ribosomal subunit gene sequencing: 2 years of experience at the United kingdom mycology reference laboratory. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 4, p. 1152-1158, apr. 2007.

LIZ RRAGA-PARTIDA, M.L.; CÁRDENAS, G.V. Influence of water circulation on marine and fecal bact ria in mussel-growing area. *Marine Pollution Bulletin*, New York, 32(2): 196-201, 1996.

LODDER, J. **The Yeast : a taxonomic study**. Oxford : North Holland Publishing Company, 1385p, 1970.

- LOPES, S.G.B.C. Levantamento das espécies de Gastropoda e bivalvia do Saco da Ribeira e estudos da Taxocenose dos Bivales da praia do Saco da Ribeira, Ubatuba, SP. Dissertação de Mestrado. Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, 160p, 1983.
- LOPEZ-MARTINEZ, R. ; MANZANO-GAYOSSO, P. ; MIER, T. ; MENDEZ-TOVAR, L. J. ; HERNANDEZ-HERNANDEZ, F. Exoenzymes of dermatophytes isolated from acute and chronic tinea. **Rev Latinoam Microbiol.** 36(1):17-20, 1994.
- LOUWS, F.J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F.J. Assessing genetic diversity of microbes using repetitive-sequence-based PCR (rep-PCR). In: TORANZOS, G. (Ed.) **Nucleic Acid Amplifications Methods for the Analysis of Environmental Samples.** Lancaster: Technomic Publishing Co., p. 63-94, 1996.
- LUNARDI, L. W.; AQUINO, V. R.; ZIMERMAN, R. A.; GOLDANI L. Z. Epidemiology and outcome of *Rhodotorula* fungemia in a tertiary care hospital. **Clin. Infect Dis**, Vol. 43, Issue 6: 60-3, 2006.
- LUPSKI, J.R.; WEINSTOCK, G.M. Short, Interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 4525-4529, 1992.
- MACÊDO, D.P.C.; SILVA, V.K.A.; FARIAS, A. M. A.; MELO, L.R.B.; WILHEIM, A.B.; NEVES, R.P. *Candida glabrata* esophagitis: new case reports and management. **Brazilian Journal of Microbiology** 39:1-7, 2008.
- MADARIAGA, M.G.; TENORIO, A.; PROIA, L. *Trichosporon inkin* peritonitis treated with caspofungin. **J Clin Microbiol.** 41(12):5827-9, 2003.
- MAHIQUES, M.M. Dinâmica sedimentar atual nas enseadas da região de Ubatuba, Estado de São Paulo. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, v. 43, n. 2, p. 111-122, 1995.
- MAIA, M. L. S., DOS SANTOS, J. I. ; VIANI, F. C. ; LARSSON, C. E. ; PAULA, C. R. ; GAMBALE, W. ; Phenotypic characterization of *Microsporium canis* isolates from cats and dogs. **Mycoses**, v.44,n.11/12, p.480-486, dez. 2001.
- MARKOULATOS, P.; SIAFAKAS, N.; MONCANY, M. *Multiplex* polymerase chain reaction: a practical approach. **J. Clin. Lab. Anal.**, v. 16, n.1, p. 47-51., 2002.
- MARR, K. A.; RUSTAD, T. R.; REX, J. H. WHITE, T. C. The trailing endpoint phenotype in antifungal susceptibility testing in pH dependent. **Antimicrob. Agentes Chemother.**, v. 43, p. 1383-1386, 1999.
- MARTINEZ-LACASA, J.; NIUBO, R.; RUFÍ, G.; SAEZ, A.; FERNANDEZ-NOGUEZ, F. Long-term survival of a patient with prosthetic valve endocarditis due to *Trichosporon beigelli*. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 10, p. 756-758, 1991.

- MARTINS, M. T.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R.; PELLIZARI, V. H. Utilização de Bactérias e fungos como indicadores na avaliação de fatores fisiográficos que interferem nos processos de auto-depuração de um córrego sub-tropical, **Rev. Microbiol., São Paulo**, **20(30)**: 278-291, 1989.
- MARTY, F. M.; BAROUCH, D. H.; COAKLEY, E. P.; BADEN, L. R. Disseminated *Trichosporon*osis caused by *Trichosporon loubieri*. **J. Clin. Microbiol.** 41: 5317-20, 2003.
- MASCARENHAS, T. C. Coleta e análise bacteriológica da água das praias no Município de Ilha Comprida – RJ, em abril/97. Cadernos, v.3, p.68-69, 1997.
- MCGINNIS, M. R.; PASARELL, L.; SUTTON, D. A.; FOTHERGILL, A. W.; COOPER, C. R. Jr.; and RINALDI, M. G.. In vitro evaluation of voriconazole against some clinically important fungi. **Antimicrob. Agents Chemother.** 41:1832-1834, 1997.
- MCGINNIS, M.R.; PASARELL, L.; SUTTON, D. A.; FOTHERGILL, A. W.; COOPER, C. R. JR.; RINALDI, M. G. In vitro activity of voriconazole against selected fungi. **Med. Mycol.**, v.36, p. 239-242, 1998.
- MCMANUS, E. J.; JONES, J. M. Detection of a *Trichosporon beigeli* antigen cross-reactive with *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide in serum from a patient with disseminated *Trichosporon* infection. **Journal of Clinical Microbiology** 21 : 681-685, 1985.
- MEIS J., PETROU M., BILLE J., ELLIS D., Global Antifungal Surveillance Group. A global evaluation of the susceptibility of *Candida* species to Fluconazole by disk diffusion. **Diagnostc. Microbiol. Infec. Diseases**, 36: 215 – 223, 2000.
- MELO, G.A.S. Taxonomia e padrões distribucionais e ecológicos dos Brachyura (Crustacea: Decapoda) do Litoral sudeste do Brasil. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, 215p, 1985..
- MENDES, B.; NASCIMENTO M. J.; OLIVEIRA J. S.; Preliminary characterisation and proposal of microbiological quality standart of sand beaches. **Water Science and Tecnology**. 27 (3-4) 453-456, 1993.
- MENDES, B. *et al.* **Sanitary Quality of Sands From Beaches of Azores Islands**. **Wat. Sci. Tech.** Elsevier Science Ltd, Great Britain. v.35. N°11–12. p.147-150, 1997.
- MENDONÇA-HAGLER, L.C.; VIEIRA, R.H.S.F.; HAGLER, A.N. Microbial quality of water, sediment, fish and shellfish in some brazilian coastal regions. In: FARIA, B.M.; FARJALLA, V.F.; ESTEVES, F.A. (Eds). *Aquatic microbial ecology in Brazil*, Rio de Janeiro, (9): 197-216, 2001.
- MENNA, P., PEREIRA, A.A.; BANGEL, E.V.; HUNGRIA, M. rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and pHylogenetic tool. **Symbiosis**, v. 48, p. 1-3, 2009.

MEYER, M. H.; LETSCHER-Bru, V.; WALLER J.; LUTZ, P.; MARCELLIN, L.; HERBRECHT, R. Chronic disseminated *Trichosporon asahii* infections in a leukemic child. **Clin. Infect. Dis.**; v. 35, p. 22-25, 2002.

MEYERS, S.P.; AHEARN, D. G. e ROTH, F. J. JR. Mycological investigations of the Black Sea. **Bull.Mar. Sci.** v.17. p. 576-596, 1967.

MEYERS, S.P.; AHEARN, D. G. Implications of yeasts and yeast-like fungi in marine processes. **Veroff. Inst. Meeresforsch Bremerhaven, Suppl.**, v.5, p.321-328, 1974.

MIDDELHOVEN, W.J. Identification of clinically relevant *Trichosporon* species. **Mycoses**, v.46, p.7-11, 2003.

MIDDELHOVEN, W.J.; SCORZETTI, G. 7 FELL, J.W. Systematics of the anamorphic basidiomycetous yeast genus *Trichosporon Behrend* with the description of five novel species: *Trichosporon vadense*, *T. smithiae*, *T. dehoogii*, *T. scarabaeorum* and *T. gamsii*. **Inst. J. Syst. Evol. Microbiol.** v.54, p.975-986, 2004.

MIRANDA, L.B. Análise de massas de água da plataforma continental e da região oceânica adjacente: Cabo de São Tomé (RJ) à Ilha de São Sebastião. Tese de Livre-Docente, Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, 194 p, 1982.

MONTROCHER, R.; VERNER, M. C.; BRIOLAY, J.; GAUTIER, C.; MARMEISSE, R. Phylogenetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* group based on polymorphisms of rDNA spacer sequences. **Internacional Journal of Systematic Bacteriology**. V.48, p.295-303, 1998.

MOREIRA, M. E. L. Controvérsia a respeito da sepse fúngica no pré-termo extremo: profilaxia e esquemas terapêuticos. **J. Pediatr.**, v.81, p. S52-S58, 2005.

MORETTI-BRANCHINI, M. L.; FUKUSHIMA, K.; SCHREIBER, K. N. *et al.* *Trichosporon* species infection in bone marrow transplanted patients. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. V.39, p.161-164, 2001.

MORRIS, E. O. Yeasts of marine origin. **Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.**, v.6. p.201-230, 1968.

MORRIS, E. O. Yeasts from the marine environment. **J. Appl. Bacteriol.**, v.38. p.211-223, 1975.

MOYLETT, E.H., CHINEN, J.; SHEARER, W. T. *Trichosporon pullulans* infection in 2 patients with chronic granulomatous disease: an emerging pathogen and review of the literature. **J Allergy Clin Immunol.**, 6:1370-1374, 2003.

MUEHE, G. de C. O Litoral Brasileiro e sua Compartimentação IN: CUNHA, S. B. e GUERRA, A. **Geomorfologia do Brasil**, Rio de Janeiro, Bertrand Brasileiro, 2001.

MÜHSIN, T. M.; AUBAID, A. H., AL-DUBOON A. H. Extracellular enzyme activities of dermatophytes and yeast isolates on solid media. **Mycoses**; v.40, p.465-469, 1997.

MÜHSIN, T. M.; SALIH, T. H. Exocellular enzyme activity of dermatophytes and other fungi isolated from ruminants in Southern Iraq. **Mycopathologia**, v. 150, n.2, p. 49-52, fev., 2000.

MULLIS, K.B. e FALOONA, F.A.. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed reaction. **Methods Enzymol.**155:335-50, 1987.

MUSSA, A. Y.; SINGH, V. K.; RANDHAWA, H. S. *et al.* - Disseminated fatal *Trichosporonosis*: First case due to *Trichosporon inkin*. **J. Mycol Med.**, 8:196-199, 1998.

NAGAI, H., Y.; YAMAKAMI, A.; HASHIMOTO, I.; TOKIMATSU, and M. NASU. PCR detection of DNA specific for *Trichosporon* species in serum of patients with disseminated *Trichosporonosis*. **J Clin Microbiol.** 37:694-699, 1999.

NAGLIK, J.; ALBRECHT, A.; BADER, O.; *et al.* *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. **Cell Microbiol.**: 6:915-26, 2004.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard NCCLS document. **M27-S3**, Wayne, Pa., v.28 n.15, 2008.

NCCLS. *Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada—Segunda Edição.* Norma M27-A2 do NCCLS (ISBN 1-56238-469-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.

NESS, M. J.; MARKIN, R. S.; WOOD, R. P. *et al.* Disseminated *Trichosporon beigellii* infection after orthotopic liver transplantation. **Am J Clin Pathol**; v.92, p.119-23, 1989.

NETTLES, R. E., NICHOLS, L. S.; BELL-MCGUINN, K.; PIPELING, M. R.; SCHEEL, P. J. JR.; MERZ, W. G. Successful treatment of *Trichosporon mucoides* infection with fluconazole in a heart and kidney transplant recipient. **Clin. Infect. Dis.**, v.36, p.E63-E66, 2003.

NISHIURA, Y.; NAKAGAWA-YOSHIDA, K., SUGA, M.; SHINODA T.; GUÉHO, E.; ANDO, M. Assignment and serotyping of *Trichosporon species*: the causative agents of Summer-type hypersensitivity pneumonitis. **J. Med. Vet. Mycol.** 35: 45-52, 1997.

NUCCI, M.; PULCHERI, W.; SPECTOR, N.; BUENO, A. P.; BACHA, P. C.; CAIUBY, M. J.; DEROSI, A.; COSTA, R.; MORALS, J. C.; OLIVEIRA, H. P. Fungal infections in neutropenic patients. A 8-year prospective study. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de S.P.**, vol 37 n° 5 São Paulo sept./Oct., 1995.

ODDS, F. C.; JACOBSEN, M. D. Multilocus sequence typing of pathogenic *Candida* species. **Eukaryot. Cell.**, v. 7, n. 7, p. 1075-1084, jul. 2008.

OGAWA, H.; SUMMERBELL, R. C. CLEMONS, K. V. KOGAS, T., RAN, Y. P.; RASHID, A.; SOHNLE, P. G.; STEVENSM, D. A.; TSUBOI, R. Dermatophytes and host in cutaneous mycoses. **Medical Mycology**, v. 36, suppl.I, p.166-173, 1998.

OLIVEIRA, J.A.A.; BARROS, J.A.; CORTEZ, A. C. A.; OLIVEIRA, J. S. R. L. Micoses Superficiais na cidade de Manaus, AM, entre março e novembro de 2003. **An.Bras. Dermatol.**; 81(3):238-43, 2006.

PADHYE, A. A.; VERGHESE S., RAVICHANDRAN P.; BALAMURUGAN G.; HALL, L.; PADMAJA, P.; FERNANDEZ, M. C.. *Trichosporon loubieri* infection in a patient with adult polycystic kidney disease. **J. Clin. Microbiol.** 41: 479-82, 2003.

PALMER, C. M. A composite rating of algae tolerating organic pollutin. **J. PHYcol.**, v.5, p.78-82, 1969.

PAPHITOU, N. I.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PAETZNICK, V.L.; RODRIGUEZ, J. R.; CHEN, E.; REX, J. H. In vitro antifungal susceptibilities of *Trichosporon* species. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46,p. 1144-1146, 2002.

PAPINI, R.; MANCIANTI, F.Extracellular enzymatic activity of *Microsporum canis* isolates. **Mycopathologia**. V.132, n.3, p.129-132, out. 1995.

PASQUALOTTO, A. C.; ANTUNES, A. G. V.; SEVERO, L. C. *Candida guilliermondi* as the aetiology of candidosis. **Rev. Inst. Med. Trop.** De São Paulo, v. 48, p. 123127, 2006.

PAULA, C. R. **Contribuição ao estudo das leveduras em praias da Baixada Santista**. Tese de Mestrado. Instituto de Microbiologia, USP, 1978.

PAULA, C. R., PURCHIO A., GAMBALE, W. - Yeasts from beaches in the Southern area of São Paulo, Baixada Santista, Brazil. **Rev Microbiol** São Paulo; v.14, p.136-43, 1983.

PAULSON, C. A. e SIMPSON, J. J.. "Irradiance Measurements in the Upper Ocean". *Journal of Physical Oceanography*, vol.7, pp: 952-956, 1977.

PÉREZ, M. A.; GALLEGRO, F. J.; HIDALGO, P. Evaluation of molecular techniques for the genetic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains. **FEMS Microbiology Letters**. V. 205, p. 375-378, 2001.

PERFECT, J. R.; WONG, B.; CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. e WILLIAMSON, P. R. **Med. Mycol.** 36, Suppl.1, p.79-86, 1998.

PERPARIM, K.; NAGAI, H.; HASHIMOTO, A.; GOTO, Y.; TASHIRO, T.; NASU, M. *In vitro* susceptibility of *Trichosporon beigelli* of antifungal agents. **J. Chemother.** 8: 445-8, 1996.

- PFALLER, M. A. Epidemiology of nosocomial candidiasis: the importance of molecular typing. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 4, n. 4, p. 161-167, 2000.
- PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; HOLLIS, R. J.; HONES, R. N.; DIEKEMA, D. J. In vitro activities of ravuconazole and coriconazole compared with those of four approved systemic antifungal agents against 6970 clinical isolates of *Candida* spp. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.46,p. 1723-1727, 2002.
- PHILPOT, C. M. Some aspects of the epidemiology of tinea. **Mycopathologia**, v.62, n.1, p.3-13, jan., 1977.
- PINHEIRO-JUNIOR, A. A.; OLIVEIRA, L. A. T.; FRANCO, R. M. e CARVALHO, J. C. A. P. Colimetria de água marinha em áreas de cultivo e extrativismo de mexilhões no Município de Niterói, RJ. **Arq. Bras.Med. Vet. Zoot.**, v.54, p.432-440, 2002.
- POFFO, I. R. F. **Vazamentos de óleo no Litoral Norte do Estado de São Paulo: análise histórica.** Dissertação de Mestrado – Programa de Pós Graduação em Ciências Ambientais, Universidade de São Paulo, 2000.
- PONTES Z.B.V.S., RAMOS A.L., LIMA E. O., GUERRA M. F. L., OLIVEIRA N. M. C., SANTOS J. P. Clinical and Mycological Study of Scalp White Piedra in the State of Paraíba, Brazil. *Mem. Ins. Oswaldo Cruz.* 97: 747-50, 2002.
- PRICE , M. F. e CAWSON R. A. PHOSPHOLIPASE ACTIVITY.In *Candida albicans*. **Saboraudia**, v.15. p.179-195, 1977.
- PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate methods for detection of pHospholipase in *Candida albicans*. *Saboraudia*. v.20, p.15-20, 1982.
- PURCHIO, A.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R. Molds from some beaches in the Southern area of São Paulo state. (Baixada Santista). **Rev. Microbiol. São Paulo**, v.19, p.166-71, 1988.
- QUEIROZ, L. E. **Análise Quanti-Qualitativa de leveduras isoladas de algas marinhas.** I-Recife, Instituto de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, publ. 677, 1972.
- QUINDÓS, G.; ALONSO-VARGAS, R.; HELOU, S.; ARECHAVALA, A.; MAZUELOS, E.M.; NEGRONI R. Evaluación de un nuevo medio de cultivo cromógeno (Candida ID) para el aislamiento e identificación presuntiva de *Candida albicans* y otras levaduras de interés médico. **Rev Iberoam Micol** 18: 23-28, 2001.
- RADEMAKER, J.L.W.; de BRUIJN, F.J. Characterization and classification microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. In: CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P.M. (Ed.). **DNA Markes:** protocols, applications and overviews. New York: J. Wiley e Sons, p. 151-171, 1997.

RADEMAKER, J. L.W.; SAVELKOUL, P.H.M. PCR Amplification based microbial typing. In: PERSHING, D.H.; TENOVER, F.C.; VERSALOVIC, J.; TANG, Y.W.; UNGER, E.R.; RELMAN, D.A.; WHITE, T.J. (Ed.). **Diagnostic Molecular Microbiology Principles and Applications**. Washington: ASM Press, p. 197-221, 2004.

RAMANI, R.; GROMADZKI, S.; PINCUS, D.H.; SALKIN, I.F.; CHATURVEDI, V. Efficacy of API 20C and ID 32C systems for identification of common and rare clinical yeast isolates. **J Clin Microbiol.** 36(11):3396-8, 1998.

RAMOS, J. P.; ROSA, C. A.; CARVALHO, E. M.; LEONCINI, O.; VALENTE, P. Heteroduplex mobility assay of the 26S rDNA D1/D2 region for differentiation of clinically relevant *Candida* species. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 89, n. 1, p. 39-44, jan. 2006.

RAN, Y.; YOSHIKE, T.; OGAWA, H. Lipase of *M. furfur*: some properties and their relationship to cell growth. **J. Med. Vet. Mycol.** V.31, p. 77-85, 1993.

RAY, G. C. Coastal-zone Biodiversity Patterns. **BioScience**, v. 41, p. 490-498, 1991.

REGAN, P.M.; MARGOLIN, A.B.; WATKINS, W.D. Evaluation of microbial indicators for the determination of the sanitary quality and safety of shellfish. *Journal of Shellfish Research*, Connecticut, 12(1): 95-100, 1993.

RIEDEL, D. J.; JOHNSON, J. K.; FORREST, G. N. *Rhodotorula glutinis* fungemia in a liver-kidney transplant patient. **Transpl Infect Dis.**: 10(3):197-200, 2007.

RIPPON, J. W. Medical Mycology: The pathogenic fungi and the pathogenic *Actinomycetes*. 2a. ed. Philadelphia, Saunders, 1982.

RIVERA, I. G.; CHOWDHURY, M. A. R.; HUQ, A.; JACOBS, D.; MARTINS, M. T.; COLWELL, R. R. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequences and the PCR to Generate Fingerprints of Genomic DNAs from *Vibrio cholerae* O1, O139, and Non-O1 Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 08, p. 2898-2904, 1995.

RIVERA, I.N.G.; MARTINS, M.T. Bactérias enteropatogênicas no ambiente aquático. **Revista de Ciências farmacêuticas**, (UNESP), v.17, p.115-136, 1996.

RIVERA, I.N.G.; PAULA, C. R.; SOUZA, C. P. Microbiologia Aquática Marinha. In: Microbiologia Ambiental. Melo, I. S.; Azevedo, J.L. (Ed). 2ª. Ed. Jaguariuna: Embrapa Meio Ambiente, p.609-627, 2008.

ROCHA, A. A. e BRANCO, S. M. A eutrofização e suas implicações na ciclagem de nutrientes. **Acta Limnológica Brasileira**, v.1, p.201-242, 1986.

RODRIGUES-TUDELA, J. L.; DIAS-GUERRA, M. T.; MELLADO E.; CANO, V.; TAPIA, C.; PERKINS, A. GOMEZ-LOPEZ, A.; RODERO, L.; CUENCA-ESTRELA, M. Susceptibility Patterns and Molecular Identification of *Trichosporon* species. **Antim. Agentes and Chemotherapy**, v.49, p.4026-4036, 2005.

ROMERO, P.; BORREGO, J.; MORINOGO, M.; DE VICENTE, A. CORNAX, R. Coliphages as an indicator of fecal pollution in Water. Their survival and productive infectivity in natural aquatic environments. **Wat. Res.** 24, 111-116, 1990.

ROSA, C. A.; RESENDE, M. A.; FRANZOT, S. P.; P. B. MORAIS, P. B. e BARBOSA, F. A. R. Distribuição de leveduras e coliformes em um lago do karst do Planalto de Lagoa Santa-MG, Brasil. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, 21: 19–24, 1990.

ROSE A. H. e HARRISON J. S. **The yeasts**. 2^a. ed. Vols 1 e 2 (Caps1,2,3) Academic Press-USA, 423p, 1987.

ROTH, F. J. Jr.; AHEARN, D. G.; FELL, J. W.; MEYERS, S. P.; MEYERS, S. A. Ecology and taxonomy of yeasts isolated from various marine substrates. **Limnol. Oceanogr.**, v.7, p.178-185, 1962.

RÜCHEL, R.; TEGELER, R.; TROST, M.A. Comparison of secretory proteinase from different strains of *Candida albicans*. **Saboraudia** v.20, p.233-244, 1982.

RÜCHEL, R.; BONING, B. M. Characterization of a secretory proteinase of *Candida parapsilosis* and evidence for the absence of enzyme during infection in vitro. **Infection and immunity**. V.56.p.411-419, 1986.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.

SÁLAN, E.O. 2005 *Tratamento térmico de mexilhões Perna perna como forma de assegurar a qualidade – avaliação do crescimento do Bacillus cereus e de Staphylococcus aureus*. Piracicaba. 60p. (Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP), 2005.

SAMARANAYAKE, L. P.; RAESIDE, J. M.; MACFARLANE, T. W. Factors affecting the pHospholipase activity of *Candida* species in vitro. **Saboraudia**, v.22.p.201-207, 1984.

SANTOS, A. R. **A Grande Barreira da Serra do Mar: da trilha dos Tupiniquins à Rodovia dos Imigrantes** Editora Nome da Rosa, São Paulo (SP), 2004.

SANTOS, D. A.; HAMDAN, J. S. Evaluation of broth microdilution antifungal susceptibility testing conditions for *Trichophyton rubrum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n.4., p. 1917-1920, abr., 2005.

SASSI, R. Variação sazonal de fitoplâncton e fatores ecológicos básicos da região do Saco da Ribeira, Ubatuba. São Paulo. Dissertação de Mestrado, Instituto Oceanográfico. Universidade de São Paulo, 147p, 1978.

SATO, M. I. Z.; BARI, M.; GALVANI, A. T.; COELHO, M. C. L. S.; PADULA, J. A.; HACHICH, M. E. Estudo preliminar para avaliação das condições sanitárias de areias das praias do litoral Paulista. Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental – ABES, 1998.

- SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Alguns aspectos ecológicos e analíticos da população de *Anomalocardia brasiliana*, na praia do Saco da Ribeira, Ubatuba, Estado de São Paulo. Tese de doutorado. Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, 119p., 1976.
- SCHIFF, K. C.; MORTON, J. e WEISBERG, S. B. Retrospective evaluation of shoreline water quality along Santa Monica Bay beaches. **Mar. Environ. Res.** v.56, p.248-252, 2003.
- SCHLOTTFELDT, F. S.; TRAMONTIN, S. W. ; NAPPI, PAGANI, B.; DOS SANTOS, J. I.. Reclassificação taxonômica de espécies do gênero *Malassezia*:. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, Rio de Janeiro, v. 38, n. 3, p. 199-204, 2002.
- SHIBATA, T.; SOLO-GABRIELE, H.M.; FLEMING, L.E.; ELMIR, S. Monitoring marine recreational water quality using multiple microbial indicators in a urban tropical environment. **Water Res.**, v. 38, p. 3119-3131, 2004.
- SHIGEHARA, K., TAKAHASHI, K.; TSUNEMATSU, K. *et al.*. A case of *Trichosporon pullulans* infection of the lung with adult T-cell leukemia. *Jpn. J. Med.*, 30: 135-7, 1991.
- SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 388p. 2004.
- SILVA, A.I.M.; VIEIRA, R.H.S.F.; MENEZES, F.G.R.; FONTELES-FILHO, A.A.; TORRES, R.C.O.; SANT'ANNA, E. Bactéria of fecal origin in Mangrove oysters (*Crassostrea rhizophorae*) in the Cocó river estuary, Ceará state, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, 34: 126- 130, 2003.
- SILVA, N.; CANTUSIO NETO, R.; JUNQUEIRA, V.C.A.. *Manual de métodos de análise microbiológica da água*. Campinas: ITAL, 99p, 2000.
- SIMARD, R.E. Yeasts as a indicator of pollution. **Marine Pollution Bulletin**, v.2, p.123-125, 1971.
- SIMPANYA, M. F.;BAXTER, M. Multiple proteinases from two *Microsporum* species. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 34, n.1, p 31-36, jan. 1996.
- SINDRIM J.J.C.; Moreira J.L.B. *Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
- SLAVIKOVA, E. AND R. VADKERTIOVA (1992). Ecological studies on yeasts in fish-ponds. **Ceska Mykologie** 46(3-4) : 272-281, 1993..
- SMAYDA, T. J. Harmful algal blooms: Their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. **Limnol. Oceanogr.**, v. 42, p. 1137–1153, 1997.
- SOUZA, K. M. C. Qualidade microbiológica de água de lastro de navios, água e bivalves da região portuária brasileira, com ênfase na detecção de *Vibrio cholerae* O1. 198 f.

Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

SPENCER, J. E. T.; GOUN, J. e GARDNER, N. R. Yeasts isolated from the South Saskatchewan a polluted river. **Can. J. Microbiol.**, v.16.p.1051-1057, 1970.

STEENBERGEN, J.N. e CASADEVALL, A. - The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Microbes Infec.**, **5**: 667-675, 2003.

STRYER, L. **Bioquímica**. 4 ed. Reverté: Barcelona. 458 p., 2001.

SUGITA, T.; NISHIKAWA O. F. *Trichosporon cutaneum* by DNA relatedness by using the spectrophotometric method and the chemiluminometric method. **J. Gen. Appl. Microbiol.** v.40, p.397-408, 1994.

SUGITA, T.; NISHIKAWA, A.; SHINODA, T.; KUME, H. Taxonomic position of deepseated, mucosa-associated, and superficial isolates of *Trichosporon cutaneum* from Trichosporonosis patients. **J Clin Microbiol.** 33: 1368-70, 1995.

SUGITA, T.; MAKIMURA, K.; NISHIKAWA, A. Partial sequences of large subunit ribosomal DNA of a new yeast species, *Trichosporon domesticum* and related species. **Microbol. Immunol.** 41: 571-3, 1997.

SUGITA, T. e NAKASE T. *Trichosporon japonicum* SP. Nov. isolated from the air. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v.48, p.1425-1429, 1998a.

SUGITA, T.; NISHIKAWA, A.; SHINODA, T. Rapid Detection of Species of the Opportunistic Yeast *Trichosporon* by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 1458-1460, vol.36-5, 1998b.

SUGITA, T.; NISHIKAWA NISHIKAWA A.; IKEDA R.; Identification of medically relevant *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for *Trichosporon* identification. **J Clin Microbiol**, v.37, p.1985-1993, 1999.

SUGITA, T.; NISHIKAWA, A.; ICHIKAWA, T.; IKEDA, R.; SHINODA, T. Isolation of *Trichosporon asahii* from environmental materials. **Med. Mycol.** V.38, p. 27-30, 2000.

SUGITA T., ICHIKAWA T., MATSUKURA M., SUEDA M, TAKASHIMA M, IKEDA R, NISHIKAWA A, SHINODA T. Genetic diversity and biochemical characteristics of *Trichosporon asahii* isolated from clinical specimens, houses of patients with summer-type-hypersensitivity pneumonitis, and environmental materials. **J Clin Microbiol**; 39(7):2405-11, 2001.

SUGITA, T.; NAKAJIMA, M.; IKEDA, R.; NIKI, Y.; MATSUSHIMA, T.; e SHINODA, T. Sequence analysis of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 regions of *Trichosporon* species. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, p.1826-1830, 2002.

SUGITA, T.; KIKUCHI, K.; MAKIMURA, K.; URATA, K.; SOMEYA, T.; KAMEI, K.; NIIMI, M.; UEHARA, Y. *Trichosporon* species isolated from guano samples obtained from Bat-inhabited Caves in Japan. **Applied and Envir. Microbiology**, p.7626-7629, 2005.

SULLIVAN, D.; COLEMAN D. *Candida dubliniensis*: characteristic and identification. *J Clinical Microbiol* 36: 329-334, 1998.

SULLIVAN, D.J.; WESTERNENG, T.J.; HAYNES, K.A.; BENNET D.E.; COLEMAN, D.C. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. **Microbiology** 141: 1507-1521, 1995.

TALHARI S., NEVES R. N. *Dermatologia Tropical*. Rio de Janeiro: MEDSI; p.122-3, 1995.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TARAZOOIE, B.; KORDBACHEH, P.; ZAINI, F.; ZOMORODIAN, K.; SAADAT, F.; ZERAATI, H.; HALLAJI, Z.; REZAIE, S. Study of the distribution of *Malassezia* species in patients pityriasis versicolor and healthy individuals in Tehran, Ira. **BMC Dermatol.**, 4, 1-46, 2004.

THÉRIZOL-FERLY, M.; KOMBILA, M.; GOMEZ, D.M.; DOUCHET, C.; SALAUN, Y.; BARRABES, A.; DUONG, T.H.; RICHARD-LENOBLE, D. White piedra and *Trichosporon* species in equatorial Africa. II Clinical and mycological associations: an analysis of 449 superficial inguinal specimens. **Mycoses**. 37: 255-60, 1994.

TORTORANO, A. M.; RIGONI, A. L.; BIRAGHI, E. PRIGITANO, A. VIVIANI, M. A. The European Confederation of Medical Mycology (ECMM) survey of candidaemia in Italy: antifungal susceptibility patterns of 261 *non-albicans Candida* isolates from blood. **J. Antimicrob. Chemother.** v.52, p.679-682, 2003.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 568p., 1999.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4 ed. São Paulo, Atheneu, 2004, 718 p.

TROST, A.; GRAF, B.; EUCKER, J.; SEZER, O.; POSSINGER, K.; GÖBEL, U. B.; ADAM, T. Identification of clinically relevant yeasts by PCR/RFLP. **J. Microbiol. Methods**, v. 56, n. 2, p. :201-211, feb. 2004.

TUNDISI, J. G. e MATSURA TUNDISI, T. Eutrophications of lakes and reservoirs: A comparative analysis, case studies perspectives. In: CORDEIRO-MARINHO, M.; AZEVEDO, M. T. P.; SANT'ANNA, C. L.; TOMITA, N. Y.; PLASTINO, E. M., Eds *Algae*

and Environment: a general approach. São Paulo, Sociedade Brasileira de Ficologia, CETESB, p.1-33, 1992.

UCHIDA, K.; MATSUZAKA, A.; AOKI, K.; and YAMAGUCHI, H.. In vitro antifungal activity of itraconazole, a new triazole antifungal agent, against clinical isolates from patients with systemic mycoses. **Jpn J Antibiot.** 44:562-70, 1991.

UNITED NATIONS. **Water: a shared responsibility. The United Nations world water development report 2.** UNESCO-WWAP. 584 p, 2006.

UNITED NATIONS. 2008. **Atlas of Oceans.** Disponível em: <<http://www.oceansatlas.org>>. Acesso em: 10 mar., 2008.

UZUN, O.; KOCAGOZ, S.; CETINKAYA, Y.; ARIKAN, S; UNAL, S. In vitro activity of a new echinocandin, LY303366, compared with those of amphotericin B and fluconazole against clinical yeast isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:1156-1157, 1997.

UZUN, O.; ARIKAN, S.; KOCAGOZ, S.; SANCAK, B.; UNAL, S. Susceptibility testing of voriconazole, fluconazole, itraconazole and amphotericin B against yeast isolates in a Turkish university Hospital and effect of time of reading. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 38: 101-7, 2000.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Res.**, v. 19, p. 6823-6831, 1991.

VERSALOVIC, J.; de BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. Repetitive sequence-based PCR (rep-PCR) DNA fingerprinting of bacterial genomes. In: de BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R.; WEINSTOCK, G.M. (Ed.). **Bacterial Genomes: physical structure and analysis.** New York: Chapman and Hall, p. 437-454, 1998.

VIDOTTO, V.; KOGA-ITO, C. Y.; CANELLA, D.; SINICCO, A.; DIPERRI, G.; AOKI, S.; ITO-KUWA, S. Extracellular activity in *Cryptococcus neoformans* strains isolated from AIDS patients and from environmental sources. **Rev. Iberoam. Micol.**, v.17, p.14, 2000.

VIEIRA, R. H. S. F.; SILVA, P. R. F. G.; LEHUGEUR, L. G. e SOUSA, O. V. Colimetria da água da praia da Barra do Ceará – Fortaleza – Ceará. **Arq. Ciên.Mar**, Fortaleza, v.32, p.119-122, 1999.

VILJOEN, J. J.; MITHA, I.; HEEP, M.; GHANNOUM M. Efficacy, safety, and tolerability of three different dosing regimes of BAL8557 vs. fluconazole in a double-blind, randomized, multicenter trial for the treatment of esophageal candidiasis in immunocompromised adults. 45th ICAAC. Late Breaker Poster LB2-32, 2005.

VOLLENWEIDER, R. A. Eutrophication – A global problem. **Water Qual. Bull.** v.6, p.59-62, 1981.

VOLZ, P.A.; JERGER, D.E.; WORZBURGER, A.J.L. A preliminary survey of yeasts isolated from marine habitats at Abaco Island, the Bahamas. **Mycopathol. Mycol. Appl.**, 54: 313-316, 1974.

VON KONELL, G. Caracterização fenotípica de amostras de *Trichosporon rubrum* isoladas de pacientes imunocomprometidos (portadores de HIV). Dissertação (Mestrado em Microbiologia e Imunologia). Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

WALSH, T. J.; NEWMAN, K. R.; MOODY, M., WHARTON, R. C.; WADE, J. C. Trichosporonosis in patients with neoplastic disease. **Medicine**, v. 65, p. 268-279, 1986.

WALSH, T. J. *Trichosporonosis*. **Infect. Dis. Clin. North. Am.** 3:43-52, 1989.

WALSH, T.J.; MELCHER, G.P.; RINALDI, M.G.; LECCIONES, J.; McGOUGH, D.A.; KELLY, P.; LEE, J.; CALLENDER, D.; RUBIN, M.; PIZZO, P.A. *Trichosporon beigelli*, an emerging pathogen resistant to amphotericin B. **J Clin Microbiol.** 28: 1616-22, 1990.

WALSH, T. J.; MELCHER, G. P.; LEE, J. W.; PIZZO, P. A. Infectious due *Trichosporon* species: new concepts in mycology, pathogenesis, diagnosis and treatment. **Curr. Top. Med. Mycol.**, v.5, p. 79-113, 1993.

WALSH T.J.; HIEMENS J.W. Anaissie E. Recent progress and current problems in treatment of invasive fungal infections in neutropenic patients. **Infect Dis Clin North Am.** v.10, p.365-400, 1996.

WALSH, T.J.; GROLL, A.; HIEMENZ, J.; FLEMING, R.; ROILIDES, E.; ANAISSIE, E. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. **Clin Microbiol Infect.** 10 (Suppl):48-66. Review, 2004.

WALZMAN, M.; LEEMING, J. G. White piedra and *Trichosporon beigellii*: the incidence in patients attending a clinic in genitourinary medicine. **Genitourin. Med.**, v. 65, p.331-334, 1989.

WANG, Q. M.; LI, J.; WANG, S. A.; BAI, F. Y. Rapid differentiation of phenotypically similar yeast species by single-strand conformation polymorphism analysis of ribosomal DNA. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 74, n. 9, p. 2604-2611, may 2008.

WATSON, K.C.; KALLICHURUM, S. BRAIN abscess due to *Trichosporon cutaneum*. **J Med Microbiol.** 3(1):191-3.1970.

WEITZMAN, L.; SUMMERBELL, R. C. The Dermatophytes. **Clinical Microbiology Reviews**, v.8, p. 240-259, abr. 1995.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols. A guide to Methods and applications. In: Ed. INNIS, A. M.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. San Diego: Academic Press, Inc. :38, p. 315-322, 1990.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for Safe Recreational **Water Environments**. Geneva, 2003. V.1.Coastal and Fresh Waters.

WOOLLETT, L. L.; HENDRICK, L. R. Ecology of yeasts in polluted water. Ant. van Leeuwenh. **J. Microbiol. Serol.** 36: 427- 435, 1970.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, Regional Office for Europe. **Development of WHO Guidelines for Safe Recreational Water Environments**. Report on a WHO Expert Consultation. St Helier, Jersey, United Kingdom, p.23-30 May 1997. Disponível em <<http://www.euro.who.int/document/e58484.pdf>> Acesso em 12 ago. 2004.

YAN, L.; ZHANG, J.; LI, M.; CAO, Y.; XU, Z.; CAO, Y.; GAO, P.; WANG, Y.; JIANG, Y. DNA microarray analysis of fluconazole resistance in a laboratory *Candida albicans* strain. **Acta Biochim. Biophys. Sin.** (Shanghai), v. 40, n. 12, p. 1048-1060, dec. 2008.

YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. **In The Yeasts, a Taxonomic Study**, 4th edn, p.77-100. Edited by KURTZMAN, C.P. e FELL J. W. Amsterdam:Elsevier,1998.

YOO, C.G.; KIM, Y.W.; HAN, S.K.; NAKAGAWA, K.; SUGA, M.; NISHIURA, Y.; ANDO, M.; SHIM, Y.S. Summer-type hypersensitivity pneumonitis outside Japan: a case report and the state of the art. **Respirology** 2: 75-7, 1997.

YOUNG, A. e FUSCO, W.. Espaços de vulnerabilidade sócio-ambiental para a população da Baixada Santista: identificação e análise de áreas críticas. XV Encontro Nacional de estudos populacionais, Caxambu, MG., 2006.

ZAITZ C., CAMPBELL I., MARQUES A. S., LUIZ L. R. B., SOUZA V.M. Compêndio de micologia médica. Rio de Janeiro: MEDSI; p.72-4, 1998.

ZIETZ, B. P.; NORDHOLD, G.; KETSERIDIS, G. e PFEIFFER, E. H. Mutagenicity of Baltic seawater and the relation to certain chemical and microbiological parameters. **Mar. Poll. Bull.**, v. 42, p.845-851, 2001.

ZO, G.; RIVERA, I.N.G.; RUSSEK-COHEN, E; ISLAM, M.S.; SIDDIQUE, A.K.; YUNUS, M.; SACK, R.B; HUQ, A.; COLWELL, R.R. Genomic profiles of clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae* O1 in cholera endemic areas of Bangladesh. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 19, p. 12409–12414, 2002.

ZOBEL, C. E. e FELTHAM, C. B. Preliminary studies on the distribution and characteristics of marine bacteria. **Scripps Institutes of Oceanography Bulletin**, tech. serv., v. 3, p. 279, 1935.

ZOBEL, C. E. **Marine microbiology**. A monograph on hydrobacteriology, 240 pp. Waltham, Massachusetts: Chronic Botanic Co, 1946.

ANEXOS

ANEXO A - Meios de cultura e soluções utilizadas no estudo

1. Água de diluição

Acrescentar 1,25 mL de solução estoque A e 5 mL de solução estoque B para um volume de 1000 mL de água destilada. A solução é autoclavada a 121°C por 15 minutos.

Solução estoque A: 34 g de fosfato monopotássico (KH_2PO_4) são dissolvidos em 500 mL de água destilada. O pH é ajustado para 7,2 com solução de hidróxido de sódio 1N e o volume é completado para 1000 mL com água destilada. Esta solução é esterilizada em autoclave a 121 °C por 15 minutos e estocada em geladeira.

Solução estoque B: 81,1 g de cloreto de magnésio ($\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) são dissolvidos em 500 mL de água destilada e o volume é completado para 1000 mL com água destilada. Esta solução é esterilizada em autoclave a 121 °C por 15 minutos e estocada em geladeira.

2. Agar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol

Agar – ASD (Difco)	65g
Cloranfenicol (INLAB)	100 mg
Água destilada	1000 mL

a) Dissolver 100mg de cloranfenicol em 10 mL de álcool 98%, adicionar ao meio e homogeneizar.

b) Autoclavar entre 115 °C a 118 °C por 15 minutos e distribuir em placas de Petri ou tubos.

3. Caldo YEPD

Extrato de levedura (Difco)	5,0 g
Dextrose (Difco)	10,0 g
Bacto peptona (Difco)	500 mL

Dissolver todos os ingredientes em água destilada. Distribuir 20 mL em tubos e autoclavar a 121°C por 15 minutos.

4. Agar fubá + Tween 80

Tween 80 (INLAB)	10 mL
Fubá (Yoki)	40,0 g
Agar (Difco)	20,0 g
Água destilada	1000 mL

a) Num balão colocar 500 mL de água destilada acrescida do fubá. Aquecer até engrossar. Filtrar (com gaze) até obter o mínimo de resíduo. Completar o volume com 500 mL de água destilada.

b) Em outro balão, fundir o Agar com 500 mL de água juntar o fubá filtrado e o Agar fundido, homogeneizar e colocar o tween 80.

5. Meio Uréia de Christensen (CRISTENSEN, 1946)**Solução A**

Peptona (Difco)	1 g
Glicose (Difco)	1 g
Cloreto de Sódio (Merck)	5 g
Fosfato de Potássio Monobásico	2 g
Fenol Vermelho (Merck)	12 mg
Agar (Difco)	20 g
Água destilada	1000 mL

Solução B

Uréia (Difco)	2 g
Água destilada	10 mL

Preparo

- Dissolva a peptona, o cloreto de sódio, fosfato de potássio e o fenol vermelho em 1000 mL de água. Ajustar o pH para 6,8.
- Adicionar o agar e dissolver completamente, em banho-Maria. Acrescentar a glicose.
- Distribuir 4,5mL em cada tubo e autoclavar a 115°C por 15 minutos.
- Deixar o meio esfriar a 65 °C e adicionar 0,5 mL da solução B, previamente esterilizada por filtração em 0,22 micras.

6.CHROMagar Candida

CHROMagar (Difco)	47,7 g
Água destilada estéril	1000 mL

Não autoclavar, fundir o meio em microondas, homogeneizar;
 Não aquecer mais que 100 °C;

7.Meio de prova de assimilação de Carbono (LODDER e KREGER-Van RIJ, 1952)

Sulfato de amônio (NH ₄) ₂ SO ₄ (Synth)	5 g
Fosfato potássio monobásico KH ₂ PO ₄ (Merck)	1 g
Sulfato de magnésio MgSO ₄ 7H ₂ O (Synth)	0,5 g
Agar (Difco)	20,0 g
Água destilada estéril	1000 mL

Técnica de preparo:

- Dissolver o agar em água destilada, aquecendo-o em Banho- Maria;
- Adicionar os sais, agitar e distribuir alíquotas de 18-20 mL por tubo.
- Autoclavar a 120 °C durante 15 minutos.

8. Meio de prova de assimilação de Nitrogênio (LODDER e KREGER-Van RIJ, 1952)

Dextrose (Difco)	20 g
Fosfato de potássio monobásico KH_2PO_4 (Merck)	1 g
Sulfato de magnésio $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Synth)	0,5 g
Agar (Difco)	20 g
Água destilada	1000 mL

Técnica de preparo:

- d) Dissolver o agar em água destilada, aquecendo-o em Banho- Maria;
- e) Adicionar a dextrose e os sais, agitar e distribuir alíquotas de 18-20 mL por tubo;
- f) Autoclavar a 120 °C durante 15 minutos.

9. Meio para o preparo do E-test® (teste de sensibilidade aos antifúngicos)

Ágar RPMI

RPMI com L-glutamina sem bicabornato	10,4 g
MOPS (Boeringer)	34,54 g
Glicose (Difco)	20 g
Ágar (Difco)	15 g

- a) Dissolver o RPMI e o MOPS em 500 mL de água deionizada. Esterelizar por filtração.
- b) Dissolver o Agar e a glicose em 500 mL de água deionizada. Autoclavar a 121 °C por 15 minutos. Resfriar o meio (b) a aproximadamente 50 °C e acrescentá-lo ao meio (a). Agitar e ajustar o pH 7,0 com NaOH 1M.

Distribuir 60 mL do meio em placas de Petri esterilizadas de 150 mm. Nestas condições, a profundidade do Agar deverá alcançar entre 3,5-4,0 mm.

Pesquisa de Exoenzimas

10. LIPASE (MÜHSIN, 1997)

Meio para detecção da atividade lipolítica

Solução A

Peptona (Difco)	10 g
NaCl (Merck)	5 g
CaCl ₂ (Merck)	0,1 g

Solução B

Tween 20 (Research Fine Chemical-Becto)

A solução A deve ser ajustada para o pH de 5,5. As soluções A e B devem ser autoclavadas por 15 minutos a 120 °C, misturadas e distribuídas assepticamente em placas de Petri.

11. DNAses (LOPEZ-MARTINEZ, 1994)

DNase Test agar (Difco)	42 g
Quemacetina (INLAB)	0,1 g
Cicloheximida (Sigma)	0,5 g
Água destilada	1000 mL

- O meio deve ser autoclavado por 15 minutos a 120 °C e distribuído assepticamente em placas de Petri.

12. **Proteinase** (RÜCHEL *et al.*, 1982)

Meio Agar-proteinase

Meio A (meio básico)

Agar (Difco)	18,0 g
Água destilada	900 mL

O meio foi esterilizado por autoclavação a 121 °C por 15 minutos.

Meio B (meio albumina para pesquisa de proteinase)

Yeast carbon base (Difco)	11,7 g
Albumina bovina fração V (Sigma)	2,0 g
Protovit (Roche)	2,5 g
Água destilada	100,0 mL

O meio B foi esterilizado por filtração (filtro 0,22µm – Millipore) e, após resfriado à 55/56 °C, misturado com o meio A e distribuído em placas de Petri estéreis, em volume de 20 mL.

13. **Fosfolipase** (PRICE *et al.*, 1982 e WILLIANSON *et al.*, 1986)

Meio de emulsão de ovo

Gema de ovo	80 g
Solução fisiológica (ADV)	80 mL

Os ovos foram colocados em álcool iodado 70% durante uma hora. Em seguida as gemas foram separadas e colocadas em recipiente previamente esterilizado. Foi adicionado volume de solução fisiológica estéril correspondente ao peso das gemas, sendo a solução agitada vigorosamente.

Meio Agar-fosfolipase

Peptona (Difco)	10 g
Glicose (Difco)	20 g
Cloreto de sódio (Reagen)	57,3 g
Cloreto de cálcio (Reagen)	0,55 g
Ágar (Difco)	20 g
Água destilada	1000 mL

O meio foi esterilizado por autoclavação (121 °C/por 15 minutos), resfriado a 55 °C/56 °C e a emulsão de ovo foi adicionada ao mesmo. Em seguida a mistura foi distribuída em placas de Petri estéreis com volume de 20 mL.

Reagentes utilizados nas metodologias moleculares**14. TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA)**

Adicionar 20 mL de TAE 50X em 980 mL de água ultrapura.

TAE 50X: pesar 242 g de Tris e dissolver, por agitação, em 700 mL de água ultrapura. Uma vez dissolvido todo o Tris, adicionar nesta solução 57,1 mL de ácido acético glacial e 100 mL de EDTA 0,5 M (pH 8.0). Completar com água ultrapura até o volume de 1000 mL, homogeneizar e conservar a temperatura ambiente.

15. Tampão TE 1M, pH 8.0 (Tris-EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 e 1 mM EDTA, pH 8.0)

Adicionar 10 mL de solução estoque de Tris-HCl 1M, pH 8.0 e 2 mL de solução estoque de EDTA 0.5 M, pH 8.0, para um volume de 1000 mL de água ultrapura.

16. Tampão SET (Tampão Sacarose – EDTA - Tris-HCl)

Preparado com 20% de sacarose, 100 mL de solução estoque de EDTA 0.5 M e 50 mL de solução estoque de Tris-HCl 1M, pH 7,6 para um volume de 1000 mL de água ultrapura.

17. Brometo de Etídio

Solução estoque (Concentração final=10mg/mL)

Brometo de Etídio (Boeringer Mannheim)	1,0 g
Água destilada	100mL

Estocar à temperatura ambiente e em frasco escuro.

18.Solução de uso de Brometo de etídio – para corar gel

Brometo de Etídio (Boeringer Mannheim)	15µL
Água destilada	300mL

19.Tampão TBE estoque (5X concentrado)

Trizma base (Sigma)	54,0 g
Ácido Bórico (Sigma)	27,5 g

20. Gel para Corrida

TBE 0,5X	100 mL
Agarose ultrapura (Invitrogen)	1 g

17.Solução de uso Tampão TBE para corrida (0,5X concentrado)

TBE 5X	200 mL
Água destilada	1800 mL

ANEXO B. Avaliação do número de isolados de *Trichosporon* spp., que tiveram 9mm de crescimento em diferentes tempos e incubados a duas temperaturas, com leituras entre 48h a 15 dias.

Local	Amostra	2d		3d		5d		7d		9d		12d		15d	
		25 °C	37 °C												
São Sebastião	água	0	0	8	7	16	5	13	14	6	7	0	3	0	0
	areia	0	0	6	0	3	4	1	1	2	3	0	2	0	0
Santos	água	0	1	3	8	10	2	3	3	6	4	0	0	0	0
	areia	0	0	3	1	1	1	3	2	0	0	0	0	0	1
Ubatuba	água	0	0	1	1	2	2	2	0	3	4	0	0	0	0
	areia	0	0	2	1	0	1	1	2	1	0	0	0	0	0
Subtotais		0	1	23	18	32	15	23	22	18	18	0	5	0	1
Padrões Clínicos	CBS-2479, AC-57, AC-80, AC-101	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0
Padrões Ambientais	75-A, 75-B , 132-B	0	0	1	0	1	0	1	2	0	0	0	2	0	0

ANEXO C. Frequência de assimilação dos substratos no teste auxanograma nos isolados de *Trichosporon* spp. por tipo de amostra.

Local	Amostra	adonitol	celbiose	dulcitol	glicose	inositol	L-arabinose	lactose	maltose	melibiose	rhamnose	rafinose	sacarose	sorbitol	xyilitol	trealose	peptona	KNO ₃
		01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17
SS	Água (44)	84%	43,2%	29,5%	100%	45,4%	100%	52,3%	97,7%	67,9%	34,1%	34,1%	93,2%	97,7%	70,5%	95,4%	100%	9%
	Areia (15)	66,7%	80%	47,7%	100%	73,4%	66,7%	46,7%	86,7%	53,3%	33,3%	53,3%	77,3%	73,7%	53,3%	80%	100%	0%
ST	Água (22)	41%	50%	18,2%	100%	41%	54,5%	45,4%	90,9%	50%	50%	41%	81,8%	68,2%	45,4%	68,2%	100%	4,5%
	Areia (07)	71,4%	100%	28,5%	100%	71,4%	71,4%	71,4%	100%	71,4%	71,4%	100	100%	71,4%	57,1%	71,4%	100%	14,3%
UB	Água (10)	80%	30%	20%	100%	10%	100%	40%	100%	70%	50%	40%	100%	100%	60%	100%	100%	0%
	Areia (04)	100%	100%	50%	100%	50%	100%	50%	100%	75%	50%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%
Total	102	71,5%	54,9%	29,4%	100%	47%	83,3%	50%	96,0%	62%	42,1%	46%	89,2%	86,2%	61,7%	86,2%	1009%	3,9%
Controles																		
Clín.	08	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	0%
Amb.	02	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	50%	100%	50%	50%	100%	100%	0%

Legenda – **SS:** São Sebastião, **ST:** Santos, **UB:** Ubatuba, **Clín.:** Clínicos, **Amb.:** Ambientais.

ANEXO D. Resultados do teste piloto de sensibilidade *in vitro* de dois isolados e os controles, por tipo de antifúngico e por temperatura de incubação.

Isolado	Fluconazol (FL)		Anfotericina-B (AP)		Itraconazol (IT)		Cetoconazol (KE)		Voriconazol (VO)		Caspofugina (CS)			
	25 °C	37 °C												
SS 282	6 (S)	6 (S)	0.032 (S)	0.064 (S)	0.19 (S)	0.047 (S)	0.019 (S)	0.064 (I)	0.125 (S)	0.016 (S)	R	R		
ST 179	4 (S)	4 (S)	0.032 (S)	0.125 (S)	0.047 (S)	0.064 (I)	0.047 (I)	0.032 (I)	0.047 (S)	0.032 (S)	0.25 (S)	R		
Total	S I R													
	2 0 0	2 0 0	2 0 0	2 0 0	2 0 0	1 1 0	1 1 0	2 0 0	2 0 0	2 0 0	2 0 0	1 0 1	1 0 0	2 0 2
<i>C. krusei</i>	R	0.32 (S)	0.125 (S)	0.38 (SDD*)	0.125 (S)	0.25 (SDD*)	0.19 (S)	0.38 (I)	0.094 (S)	0.125 (S)	0.38 (S)	0.25 (S)		
<i>C. parapsilosis</i>	0.25 (S)	1.0 (S)	0.094 (S)	0.38 (SDD*)	0.008 (S)	0.016 (S)	0.004 (S)	0.12 (I)	0.004 (S)	0.004 (S)	0.38 (S)	0.38 (S)		
CBS2479 <i>T. asahii</i>	0.25 (S)	R	0.125 (S)	R	0.125 (S)	R	0.019 (S)	R	0.125 (S)	R	0.38 (S)	R		
Total controle	S I R													
	2 0 1	2 0 1	3 0 0	0 2 1	3 0 0	1 1 1	3 0 0	1 1 1	3 0 0	2 0 1	3 0 0	2 0 1	3 0 0	2 0 1

Legenda - **S**: Sensível; **SDD***: Sensível Dose Dependente, classificados na tabela como Intermediário; **I**: Intermediário; **R**: Resistência.

Anexo E. Resultados obtidos na identificação do gênero *Trichosporon* nos isolados de leveduras de amostras de água do mar e areia, nas três regiões costeiras de São Paulo, por tipo de teste.

Isolado	Fonte	Meio	Data da coleta	Chave de Identificação						PCR	Sequenciamento
				(RODRIGUES -TUDELA, 2005)	(De HOOG, 2000)	(KONEMAN, 1987)	(AHEARN, 1970)	(KURTZMAN, 1998)	API-TEST ID 32C		
ST 31	AgP3	ASD	17.02.06	-	-	<i>T. beigelli</i>	<i>T.cutaneum</i>	<i>T. spp.</i>	NF	P	<i>T. debeurmannianum</i>
ST 82	AgP3	CA	29.03.06	<i>T.cutaneum</i>	-	<i>T. beigelli</i>	<i>T.cutaneum</i>	<i>T. spp.</i>	<i>T. mucoides</i>	P	<i>Saccharomycetales</i>
ST 119	AgP3	CA	29.03.06	<i>T. mucoides</i>	<i>T. mucoides</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T.cutaneum</i>	<i>T. spp.</i>	<i>T. mucoides</i>	P	NF
ST 161	AgP2	ASD	27.04.06	-	-	-	-	<i>T. spp.</i>	<i>T. mucoides</i>	P	<i>Trichosporon dermatis</i>
ST 189	AgP1	CA	01.06.06	-	-	-	<i>T.cutaneum</i>	<i>T. spp.</i>	<i>T. mucoides</i>	P	<i>T. debeurmannianum</i>
ST 195	AgP1	CA	01.06.06	<i>T.japonicum</i>	-	-	-	-	<i>T. mucoides</i>	P	<i>Candida tropicalis</i>
ST 200	AgP2	ASD	01.06.06	<i>T.japonicum</i>	-	-	-	-	<i>T. mucoides</i>	P	<i>Kodamaea ohmeri</i>
ST 217	AgP3	CA	01.06.06	-	-	-	-	-	<i>T. mucoides</i>	P	NF
ST 264	AgP3	CA	24.01.07	-	-	-	-	-	NF	P	<i>T. debeurmannianum</i>
ST 371	AgP3	CA	28.03.07	<i>T. dermatis</i>	-	-	<i>T.cutaneum</i>	<i>T.spp.</i>	NF	P	<i>T. debeurmannianum</i>
ST 131	Areia	ASD	29.03.06	<i>T. dermatis</i>	<i>T.mucoides</i>	-	<i>T.cutaneum</i>	<i>T.spp.</i>	NF	P	<i>T. debeurmannianum</i>
ST 136	Areia	ASD	29.03.06	-	-	-	-	-	NF	P	<i>Trichosporon jirovecii</i>
ST 179	Areia	ASD	27.04.06	-	-	-	-	-	NF	P	NS
ST 182	Areia	CA	27.04.06	<i>T. mucoides</i>	-	<i>T. beigelli</i>	<i>T.cutaneum</i>	<i>T. spp.</i>	<i>T. mucoides</i>	P	<i>T. debeurmannianum</i>
ST 183	Areia	CA	27.04.06	-	-	-	<i>T.cutaneum</i>	<i>T. spp.</i>	NF	P	<i>Trichosporon jirovecii</i>
ST 299	Areia	ASD	13.02.07	-	<i>T.mucoides</i>	-	-	-	NF	P	<i>T. debeurmannianum</i>
SS 17	AgP2	ASD	17.10.05	-	-	<i>T. beigelli</i>	<i>T.cutaneum</i>	<i>T. spp.</i>	NF	P	<i>T. debeurmannianum</i>
SS 31	AgP1	ASD	16.11.05	-	<i>T.mucoides</i>	-	<i>T.cutaneum</i>	<i>T. spp.</i>	NF	P	<i>T. debeurmannianum</i>
SS 247	AgP2	ASD	21.06.06	-	<i>T.mucoides</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T.cutaneum</i>	<i>T. spp.</i>	NF	P	<i>T. debeurmannianum</i>
SS 282	AgP1	CA	13.02.06	<i>T. mucoides</i>	<i>T.mucoides</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T.cutaneum</i>	<i>T. spp.</i>	NF	P	NS

Isolado	Fonte	Meio	Data da coleta	(RODRIGUES -TUDELA, 2005)	(De HOOG, 2000)	(KONEMAN, 1987)	(AHEARN, 1970)	(KURTZMAN, 1998)	API-TEST ID 32C	PCR	Sequenciamento
SS 290	AgP1	ASD	18.07.06	<i>T. mucoides</i>	<i>T. mucoides</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T. cutaneum</i>	<i>T. spp.</i>	<i>T. mucoides</i>	P	<i>T. debeurmannianum</i>
SS 294	AgP1	CA	18.07.06	-	-	<i>T. beigelli</i>	<i>T. cutaneum</i>	<i>T. spp.</i>	<i>T. mucoides</i>	P	<i>Selenophoma eucalypti</i>
SS 295	AgP1	CA	18.07.06	-	<i>T. cutaneum</i>	-	<i>T. pullulans</i>	-	<i>T. mucoides</i>	P	<i>Selenophoma eucalypti</i>
SS 296	AgP1	CA	18.07.06	-	-	<i>T. beigelli</i>	<i>T. cutaneum</i>	<i>T. spp.</i>	<i>T. mucoides</i> (2ªOP)	P	NF
SS 299	AgP2	ASD	18.07.06	<i>T. mucoides</i>	<i>T. mucoides</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T. cutaneum</i>	<i>T. spp.</i>	<i>T. mucoides</i>	P	<i>T. montevidense</i>
SS 426	AgP2	CA	19.09.06	<i>T. mucoides</i>	<i>T. mucoides</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T. cutaneum</i>	<i>T. spp.</i>	NF	P	<i>T. debeurmannianum</i>
SS 524	AgP2	CA	21.11.06	-	-	<i>T. beigelli</i>	<i>T. cutaneum</i>	<i>T. spp.</i>	NF	P	<i>T. debeurmannianum</i>
SS 591	AgP1	ASD	23.01.07	-	-	-	-	-	<i>T. mucoides</i>	P	<i>T. debeurmannianum</i>
SS 603	AgP1	ASD	23.01.07	-	-	-	<i>T. cutaneum</i>	-	<i>T. mucoides</i> 2ªOp.	P	<i>Candida parapsilosis</i>
SS 617	AgP2	CA	23.01.07	-	<i>T. mucoides</i>	-	-	-	<i>T. mucoides</i> 2ªOp.	P	<i>Trichosporon jirovecii</i>
SS 304	AreiaP1	ASD	18.07.06	-	-	-	-	<i>T. spp.</i>	NF	P	<i>T. debeurmannianum</i>
SS 308	AreiaP1	ASD	23.01.07	<i>T. japonicum</i>	-	-	-	-	<i>T. mucoides</i>	P	<i>T. debeurmannianum</i>
SS 624	AreiaP1	CA	23.01.07	-	-	-	-	-	<i>T. mucoides</i>	P	<i>Candida parapsilosis</i>
SS 625	AreiaP1	CA	23.01.07	-	<i>T. mucoides</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T. cutaneum</i>	<i>T. spp.</i>	<i>T. mucoides</i>	P	<i>Trichosporon mucoides</i>
SS 626	AreiaP1	ASD	23.01.07	-	<i>T. mucoides</i>	-	-	-	<i>T. mucoides</i>	P	<i>T. debeurmannianum</i>
SS 627	AreiaP1	ASD	23.01.07	-	-	<i>T. beigelli</i>	<i>T. cutaneum</i>	<i>T. spp.</i>	<i>T. mucoides</i>	P	<i>T. debeurmannianum</i>
SS630	AreiaP1	ASD	23.01.07	-	-	-	-	-	<i>T. mucoides</i>	P	NF
UB 57	AgP1	CA	23.01.07	-	-	-	-	-	<i>T. mucoides</i>	P	<i>Candida parapsilosis</i>
UB 57	AgP1	CA	23.01.07	-	-	-	-	-	<i>T. mucoides</i>	P	<i>Candida parapsilosis</i>
UB 59	AgP2	ASD	23.01.07	<i>T. dermatis</i>	<i>T. mucoides</i>	-	<i>T. cutaneum</i>	<i>T. spp.</i>	<i>T. mucoides</i>	P	<i>Trichosporon faecale</i>
UB 13	Areia	ASD	13.02.06	-	-	<i>T. beigelli</i>	<i>T. cutaneum</i>	<i>T. spp.</i>	NF	P	<i>T. debeurmannianum</i>
UB 118	Areia	ASD	15.03.07	<i>T. mucoides</i>	<i>T. mucoides</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T. cutaneum</i>	<i>T. spp.</i>	NF	P	<i>T. debeurmannianum</i>

Controle Ambiental	Fonte	Meio	Data da coleta	(RODRIGUES -TUDELA, 2005)	(De HOOG, 2000)	(KONEMAN, 1987)	(AHEARN, 1970)	(KURTZMAN, 1998)	API-TEST ID 32C	PCR	Sequenciamento
75-A	Água	-	-	-	-	-	-	<i>T. spp.</i>	<i>C. parapsilosis</i>	P	<i>Trichosporon jirovecii</i>
75-B	Água	-	-	-	-	-	-	<i>T. spp.</i>	<i>S. ciferrii</i>	P	<i>Trichosporon jirovecii</i>
132-A	Água	-	-	-	-	-	-	<i>T. spp.</i>	NF	P	<i>T. debeurmannianum</i>
132-B	Água	-	-	-	-	-	-	<i>T. spp.</i>	<i>C. humicola</i>	P	NF
143-A	Água	-	-	-	-	-	-	-	NF	P	NF
Controle Clínico	Fonte	Meio	Data da coleta	(RODRIGUES -TUDELA, 2005)	(De HOOG, 2000)	(KONEMAN, 1987)	(AHEARN, 1970)	(KURTZMAN, 1998)	API-TEST ID 32C	PCR	Sequenciamento
143-B	Água	-	-	<i>T. dermatis</i>	<i>T. mucooides</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T. cutaneum</i>	<i>T. spp.</i>	NF	P	<i>Trichosporon terricola</i>
<i>T. asahii</i>	Clínica	-	-	<i>T. asahii</i>	<i>T. asahii</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T. cutaneum</i>	<i>T. spp.</i>	NF	P	<i>T. debeurmannianum</i>
<i>T. inkin</i>	Clínica	-	-	<i>T. inkin</i>	<i>T. inkin</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T. cutaneum</i>	<i>T. spp.</i>	NF	P	<i>T. debeurmannianum</i>
<i>T. mucooides</i>	Clínica	-	-	<i>T. mucooides</i>	<i>T. mucooides</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T. cutaneum</i>	<i>T. spp.</i>	NF	P	<i>T. akiyoshidainum</i>
<i>T. ovoides</i>	Clínica	-	-	<i>T. ovoides</i>	<i>T. ovoides</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T. cutaneum</i>	<i>T. spp.</i>	NF	P	<i>T. debeurmannianum</i>
CBS 2479	Clínica	-	-	<i>T. asahii</i>	<i>T. asahii</i>	<i>T. beigelli</i>	<i>T. cutaneum</i>	<i>T. spp.</i>	<i>T. asahii</i>	P	<i>Trichosporon asahii</i>
AC-57	Clínica	-	-	-	-	<i>T. beigelli</i>	<i>T. cutaneum</i>	<i>T. spp.</i>	<i>T. mucooides</i>	P	<i>Trichosporon asahii</i>
AC-80	Clínica	-	-	-	-	<i>T. beigelli</i>	<i>T. cutaneum</i>	<i>T. spp.</i>	NF	P	<i>Trichosporon asahii</i>
AC-101	Clínica	-	-	-	-	<i>T. beigelli</i>	<i>T. cutaneum</i>	<i>T. spp.</i>	<i>T. asahii</i>	P	<i>Trichosporon asahii</i>

Legenda- **NF**: Não foi feito o seqüenciamento; **NS**: Nenhuma similaridade significativa encontrada; **NE**: Não editada, seqüência ruim; **2ºOP.**: 2ª Opção da leitura do teste API ID 32 C; **P**: Positivo.