



UNIVERSIDADE FEDERAL DO DELTA DO PARNAÍBA
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
BACHARELADO EM BIOMEDICINA

WESLEY RODRIGUES DA SILVA

AVALIAÇÃO DE FATORES DE PAGENICIDADE DE FUNGOS NEGROS
ORIUNDOS DA AREIA DA PRAIA DA PEDRA DO SAL, LITORAL DO PIAUÍ

PARNAÍBA - PI

2021

WESLEY RODRIGUES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DE FATORES DE PATOGENICIDADE DE FUNGOS NEGROS
ORIUNDOS DA AREIA DA PRAIA DA PEDRA DO SAL, LITORAL DO PIAUÍ**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal do Delta do
Parnaíba como requisito para a obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra. Tatiane Caroline Daboit

Coorientadora: Profa. Dra. Belize Rodrigues Leite

PARNAÍBA – PI

2021

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Delta do Parnaíba
Biblioteca Prof. Cândido Athayde Serviço de
Processamento Técnico

S586a Silva, Wesley Rodrigues da
Avaliação de fatores de patogenicidade de fungos negros oriundos da
areia da praia da Pedra do Sal, litoral do Piauí [recurso eletrônico] / Wesley
Rodrigues da Silva. – 2021.
1 Arquivo em PDF

TCC (Bacharel em Biomedicina) - Universidade Federal do Delta do
Parnaíba, 2021.

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

Coorientador: Prof^ª. Dr^ª. Belize Rodrigues Leite.

1. Micologia. 2. Micoses. 3. Fungos. 4. Virulência. 5. Enzimas. 6.
Termotolerância. I. Título.

CDD: 579.5

WESLEY RODRIGUES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DE FATORES DE PATOGENICIDADE DE FUNGOS NEGROS
ORIUNDOS DA AREIA DA PRAIA DA PEDRA DO SAL, LITORAL DO PIAUÍ**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal do Delta do Parnaíba - UFDPAr, como requisito obrigatório para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

APROVADO EM: 21/07/2021

BANCA EXAMINADORA

Tatiane C. Daboit

Profa. Dra. Tatiane Caroline Daboit
Presidente

Franciele B. Fernandes Silva

Profa. Dra. Franciele Basso Fernandes Silva
Membro Interno

Káritta Raquel Lustoza da Costa

Profa. Msc. Káritta Raquel Lustoza da Costa
Membro Externo

Aos meus pais, à minha irmã e à minha tia pelo apoio incondicional em todos os momentos difíceis da minha trajetória acadêmica. Este trabalho é dedicado a eles.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a minha mãe (Adriana), meu pai (José Evandro) e minha irmã (Ana Beatriz), que me incentivaram nos momentos difíceis e compreenderam a minha ausência enquanto me dedicava à realização deste trabalho. Devo a eles minha vida e todas as oportunidades que nela recebi. Espero que um dia (e que seja em breve) eu possa lhes retribuir tudo isso.

Aos meus avós (Claudionor e Raimunda) e minha tia (Maria de Nazaré), por todo auxílio, incentivo e hospitalidade durante os anos da graduação.

Aos amigos, especialmente Airton, Ana Clara, Alex, Letícia, Paloma e Vanessa, pela amizade incondicional e pelo apoio demonstrado ao longo de todo o período de tempo em que me dediquei a este trabalho. Foram meu porto seguro nessa jornada, especialmente nos momentos em que a saudade de casa e da minha família batia.

À professora Tatiane Caroline Daboit, por ser minha orientadora e ter desempenhado tal função com dedicação e amizade. Desde os meus primeiros anos de graduação, tive o desejo de adentrar na área da pesquisa, pois ser pesquisador era o meu objetivo desde a infância. No entanto, por diversas vezes tive esse sonho frustrado. Apesar disso, permaneci tentando, até que vi as portas se abrindo para mim, com a professora Tatiane me dando essa oportunidade.

Agradeço a professora Belize, por ser a coorientadora desse trabalho.

Aos professores do curso de Biomedicina da Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAr), que me conduziram com seus ensinamentos e propiciaram minha formação.

Aos meus colegas de curso e do Grupo de Estudos Avançados em Micologia Médica (GEAMICOL), com quem convivi intensamente durante os últimos anos, pelo companheirismo e pela troca de experiências que me permitiram crescer não só no âmbito acadêmico, mas também no pessoal.

À UFDPAr, por possibilitar a realização desse sonho.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que, de algum modo, cruzaram no meu caminho durante esta experiência e contribuíram, de alguma forma, para o seu sucesso.

"O maior inimigo do conhecimento não é a ignorância, é a ilusão do conhecimento."

Stephen Hawking

RESUMO

Os fungos negros são um grupo de ascomicetos melanizados, pleomórficos e ubíquos, apesar de serem encontrados com maior frequência em regiões de clima tropical e subtropical. Embora a maioria não seja patogênica, algumas espécies estão associadas a micoses de grande importância clínica, como a cromoblastomicose, a feohifomicose e o eumicetoma, afetando indivíduos imunocomprometidos e imunocompetentes. Com isso, a investigação da presença desses microrganismos em locais com grande fluxo de pessoas é de interesse da saúde pública. Localizada no município de Parnaíba, a praia da Pedra do Sal tem grande importância para o turismo e realização de atividades laborais como pescar ou mariscar, bem como para prática de esportes. Avaliar a areia desse local é de suma importância, tendo em vista que não há trabalhos realizados com essa temática. Assim, esse estudo teve por objetivo caracterizar a patogenicidade de fungos negros isolados de amostras de areia da Praia da Pedra do Sal, por meio da análise de termotolerância, a halotolerância, e a produção de DNase e de urease. Para a obtenção dos isolados, foi adicionada água peptonada suplementada com cloranfenicol em amostras de areia, sendo inoculadas alíquotas da solução processada em Ágar Sabouraud Dextrose; Ágar Mycobio e Ágar Batata Dextrose. Na análise de termotolerância, os isolados foram cultivados em Ágar Sabouraud e incubados a temperatura de 37 °C por 15 dias. O crescimento foi classificado como ótimo quando a área ocupada pela colônia foi maior que 20mm, intermediário quando foi de aproximadamente 20mm e baixo quando ocupou uma área inferior a 20mm. A halotolerância foi investigada em meio líquido (Caldo Sabouraud) disposto em placas de 96 poços, com as concentrações de NaCl: 2,5%; 5%; 7,5%; 10%; 15% e 20%. Para a avaliação da produção de DNase e de urease foram utilizadas, respectivamente, placas de Ágar de Teste de DNase suplementado com o corante azul de toluidina e meio de ureia-ágar-base, com cada isolado sendo inoculado e incubado a 30 °C por 15 dias. Todos os testes foram realizados em duplicata. Foram obtidos e testados 29 isolados oriundos da praia da Pedra do Sal, dos quais 15 (51,7%) permaneceram com aspecto leveduriforme e 14 (48,3%) demonstraram dimorfismo (fungos tipo-levedura). Todos os isolados cresceram na temperatura de 37 °C no período de 15 dias, sendo 20 (69%) com o crescimento ótimo, 4 (13,8%) com crescimento intermediário e 5 (17,2%) com crescimento baixo. Na avaliação de halotolerância, todos os isolados foram capazes de crescer a 20% de NaCl, a maior concentração testada. Com relação à produção de enzimas, 10 isolados (34,5%) foram positivos para a produção de urease, enquanto apenas 2 (6,9%) isolados demonstraram capacidade de hidrolisar DNA. Portanto, observa-se que os fungos negros isolados da areia da praia Pedra do Sal podem expressar fatores de virulência e apresentam alta capacidade de persistência no ambiente. Acreditamos que tais resultados possam auxiliar no entendimento das questões referentes à inclinação destes fungos em causar infecções em humanos e animais que circulem em regiões litorâneas, visto que, atualmente, a literatura carece de estudos que avaliem essa correlação.

Palavras-chave: Micologia. Micoses. Fungos. Virulência. Enzimas. Termotolerância.

ABSTRACT

Black fungi are a group of melanized, pleomorphic and ubiquitous ascomycetes, despite being found with greater frequency in regions with a tropical and subtropical climate. Although not pathogenic, some species are associated with mycoses of great clinical importance, such as chromoblastomycosis, phaeohyphomycosis and/or eumycetoma, affecting immunocompromised and immunocompetent individuals. Thus, to investigate the presence of microorganisms in locations with a large flow of people and of interest in public health. Located in the municipality of Parnaíba, Praia da Pedra do Sal is of great importance for tourism and the performance of labor activities such as fishing or shellfish, as well as for sports practice. Valuing local area is extremely important, considering that no work has been carried out on this theme. Also, this study has the objective of characterizing the pathogenicity of isolated black fungi from samples of the Praia da Pedra do Sal area, by means of thermotolerance analysis, halotolerance, and the production of DNase and urease. To obtain two isolates, peptone water supplemented with chloramphenicol was added in samples of areia, being inoculated aliquots of the solution processed in Sabouraud Dextrose Agar; Ágar Mycobio and Ágar Batata Dextrose. In a thermotolerance analysis, the isolates grown in Ágar Sabouraud and incubated at a temperature of 37 ° C for 15 days. Growth was classified as the last when the area occupied by the colony was greater than 20mm, intermediate when it was approximately 20mm and lower when it occupied an area less than 20mm. A halotolerância was investigated in liquid medium (Sabouraud Broth) 3-disposed in 96-well plates, with NaCl concentrations: 2.5%; 5%; 7.5%; 10%; 15% and 20%. For the evaluation of the production of DNase and urease foram used, respectively, DNase Test Agar plates supplemented with toluidine blue dye and ureia-agar-base medium, with each isolate being inoculated and incubated at 30 ° C for 15 days. All the tests were carried out in duplicate. Forms obtained and tested 29 isolates from Praia da Pedra do Sal, two quais 15 (51.7%) remain with a leveduriform appearance and 14 (48.3%) demonstrate dimorphism (yeast-type fungi). All isolated cresceram at a temperature of 37 ° C in a period of 15 days, with 20 (69%) as the optimum growth, 4 (13.8%) as intermediate growth and 5 (17.2%) as low growth. With a halotolerance assessment, all isolates are capable of increasing to 20% NaCl, at a higher concentration tested. Regarding the production of enzymes, 10 isolates (34.5%) were positive for urease production, while only 2 (6.9%) isolated demonstrated the ability to hydrolyze DNA. Therefore, it is observed that the isolated black fungi of the Pedra do Sal beach area can express virulence factors and show a high non-environmental persistence capacity. We certify that these results may help us not understand the questions regarding the inclination of these fungi to cause infections in humans and animals that circulate in coastal regions, since, at present, the literature lacks studies that validate this correlation.

Keywords: Mycology. Mycosis. Fungi. Virulence. Enzymes. Thermolerance.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Membro inferior direito evidenciando típico acometimento por eumicetoma na região medial do tornozelo **18.**
- Figura 2 – Lesões nodulares com superfície elevada e cobertas por crostas tipo couve-flor causada pela cromoblastomicose em membro superior direito **19.**
- Figura 3 – Feohifomicose na forma de cisto subcutâneo em membro superior direito..... **20.**
- Figura 4 – Fotomicrografia de células da espécie *Exophiala sideris* de cultura em ágar de extrato de malte apresentando morfologia de levedura **22.**
- Figura 5 – Fotomicrografia de células da espécie *Exophiala sideris* de cultura em ágar de extrato de malte na morfologia de hifa **22.**
- Figura 6 – Coleta em ponto de amostragem de areia seca na Praia da Pedra do Sal..... **28.**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados das características associadas à patogenicidade dos isolados de fungos demáceos testados.....	31.
--	------------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAD1	Blastomyces adhesin-1
CBP1	Calcineurin Binding Protein 1
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNase	Desoxirribonuclease
NETs	Neutrophil extracellular traps
TH1	T helper 1
TNF-α	Tumour Necrosis Factor alpha
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UV	Radiação ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
3.1 FUNGOS NEGROS	17
3.2 A IMPORTÂNCIA CLÍNICA DOS FUNGOS NEGROS	18
3.3 A PATOGENICIDADE DOS FUNGOS NEGROS	20
3.3.1 Halotolerância e halofilia	20
3.3.2 Termotolerância	21
3.3.3 Dimorfismo	22
3.3.4 Melanina	23
3.3.5 Urease	25
3.3.6 DNase	26
3.4 PRESENÇA DE FUNGOS NEGROS POTENCIALMENTE PATOGÊNICOS NA AREIA DA PRAIA	27
4 METODOLOGIA	28
4.1 COLETA DE AMOSTRAS DE AREIA NA PRAIA DA PEDRA DO SAL	28
4.1 ISOLAMENTO	28
4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS QUANTO À MORFOLOGIA	29
4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS QUANTO À MELANIZAÇÃO	29
4.4 AVALIAÇÃO DE TERMOTOLERÂNCIA	29
4.5 AVALIAÇÃO DE HALOTOLERÂNCIA E HALOFILIA	29
4.6 DETECÇÃO DE PRODUÇÃO DE UREASE	30
4.7 DETECÇÃO DE PRODUÇÃO DE DNASE	30
5 RESULTADOS	31
6 DISCUSSÃO	32

7 CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS.....	37

1 INTRODUÇÃO

Majoritariamente pertencentes às ordens Dothideales e Chaetothyriales, os fungos negros formam um grupo de fungos ascomicetos bastante heterogêneo filogeneticamente e taxonomicamente (DE HOOG, 1993; DE HOOG, 1997). Reproduzem-se por meio de brotamento unilateral ou polar, e podem apresentar crescimento pleomórfico, ocorrendo tanto na forma de levedura, de fungo filamentosos e fungo tipo-levedura (do inglês yeast-like, os quais apresentam dimorfismo celular) ou aglomerados meristemáticos. A melanina confere pigmentação escura à parede celular complexa e espessa, sendo essa a principal característica desse grupo de fungos (STERFLINGER, 2006).

Embora sejam mais comumente encontrados em regiões de clima tropical e subtropical, os fungos negros são excepcionalmente ubíquos, tendo sido isolados de amostras de solo, de areia da praia, de frutos, de folhas, de matéria orgânica em decomposição, de rochas, de desertos, de biofiltros, de salinas, de permafrost ou, até mesmo, de máquinas de lavar louças, de água encanada e de borras de óleo (GUNDE-CIMERMAN et al., 2000; SUDHADHAM et al., 2008; VICENTE et al., 2008; SABINO et al., 2011; ZALAR; GUNDE-CIMERMAN, 2014; ZUPANČIČ et al., 2016).

Tal ubiquidade é proporcionada por uma série de características que os fungos negros possuem, além das adaptações que sofrem de acordo com o nicho em que se encontram, o que também tem efeito importante em sua patogenicidade (GOSTINČAR; MUGGIA; GRUBE, 2012). Alguns desses fatores incluem a presença de melanina e de caroteno, presença de parede celular espessa, de corpos meristemáticos, pleomorfismo, termotolerância, osmotolerância, hidrofobicidade, assimilação de hidrocarbonetos aromáticos, sideróforos, adesão e formação de biofilmes (SEYEDMOUSAVI et al., 2014).

As espécies mais importantes clinicamente pertencem a família Herpotrichiellaceae, ordem Chaetothyriales (MATSUMOTO; PADHYE; AJELLO, 1987; REVANKAR; SUTTON, 2010). Essa família compreende fungos filamentosos assexuados diversos, incluindo sapróbios de detritos de plantas, que podem ser agentes etiológicos de doenças distintas, tanto em humanos quanto em animais. As principais micoses causadas por esses fungos são a feohifomicose, a cromoblastomicose e o micetoma (DE HOOG, 1997; SEYEDMOUSAVI et al., 2014).

Tendo em vista que as praias estão entre os locais mais importantes para recreação aquática, servindo para banhos, para a prática de esportes aquáticos e para apreciação do

ambiente em geral, é de suma importância que a água e a areia banhada por ela sejam de boa qualidade (WEISKERGER; BRANDÃO, 2020). Assim, em praias com areia contaminada com patógenos fúngicos, é de se esperar que o risco de exposição do público e consequente desenvolvimento de infecções aumente, especialmente através do contato direto com a pele e membranas mucosas ou pela inalação de esporos (EFSTRATIOU; VELEGRAKI, 2010; ROMÃO et al., 2015; DE LEO et al., 2019; WEISKERGER; BRANDÃO, 2020).

A praia de Pedra do Sal, inserida entre as coordenadas 02° 48' 14,9'' de Latitude Sul e 41° 43' 43,5'' de Longitude Oeste, localiza-se na Ilha Grande de Santa Isabel e pertence ao município de Parnaíba, estando a 18 km do centro da cidade e cerca de 318 km de Teresina, capital do estado do Piauí. É dividida em duas partes: o lado Manso e o lado Bravo (DA SILVA, 2016). Enquanto o lado Manso é geralmente utilizado para pescaria e descanso, devido as poucas ondas e baixa movimentação, o lado Bravo é procurado com maior frequência para prática de esportes radicais como surf e kitesurf (ROCHA; DE SOUZA; DA SILVA, 2015).

A realização de análises microbiológicas em ambientes costeiros com grande circulação de pessoas é de interesse da saúde pública, visto que avaliam a qualidade do local. No entanto, a literatura atual carece de investigações como esta no Piauí, especialmente na praia da Pedra do Sal, região de grande importância não só para a população residente, mas também para o turismo, prática de esportes e atividades laborais, como pesca e coleta de mariscos. Embora a presença de fungos negros na praia seja algo esperado, devido à ubiquidade desses fungos e alta capacidade adaptativa, a patogenicidade desses fungos é imprevisível.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar a patogenicidade de fungos negros oriundos de amostras de areia da praia da Pedra do Sal, pertencente a costa do litoral do Estado do Piauí.

2.2 Objetivos específicos

- Recuperar isolados de fungos negros obtidos a partir de amostras de areia da praia da Pedra do Sal.
- Avaliar os isolados quanto às características associadas a patogenicidade, tais como crescimento na temperatura corporal humana; tolerância ao NaCl; atividade das enzimas DNase e urease.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 FUNGOS NEGROS

Fungos negros, também conhecidos como fungos demáceos, são designações genéricas dada a um grupo diversificado de ascomicetos, de crescimento lento e reprodução predominantemente assexuada, cuja principal característica é a pigmentação escura na parede celular das células vegetativas e reprodutivas, sendo esta proporcionada por compostos do complexo melanínico (STERFLINGER, 2006). Os mesmos são compostos por espécies das ordens Dothideales e Chaetothyriales, sendo, portanto, bastante heterogêneo do ponto de vista taxonômico e em relação à origem filogenética (DE HOOG, 1997; VICENTE et al., 2008).

Os fungos demáceos compartilham características como a plasticidade fenotípica e revestimento da parede celular contendo melanina, carotenoides e micosporinas (GORBUSHINA; KOTLOVA; SHERSTNEVA, 2008). Tais propriedades são adaptações fisiológicas que permitem que esses fungos habitem ambientes com condições extremas, como temperaturas elevadas ou extremamente baixas; baixa umidade; elevadas concentrações de sal; concentrações diversas de pH; deficiência de nutrientes e altos índices de radiação (GOSTINČAR; GRUBE; GUNDE-CIMERMAN, 2011). O termo 'poliextremotolerância' tem sido associado a esses fungos (GOSTINČAR; MUGGIA; GRUBE, 2012).

A morfologia microscópica é caracterizada pela presença de conídios, hifas e coloração escura da parede celular. Os fungos demáceos apresentam pleomorfismo, ou seja, morfologia microscópica variável na mesma espécie fúngica, podendo apresentar as fases leveduriforme, filamentosa e corpos meristemáticos. Alguns desses fungos produzem formas hifais na natureza, mas existem quase exclusivamente como corpos meristemáticos (células muriformes) no tecido infectado, enquanto outros são hifais tanto na natureza quanto no tecido (DE HOOG, 1993). Contudo, apresentar-se ou não na fase leveduriforme depende do nicho ecológico no qual eles estão inseridos (ZHAO, 2010; SEYEDMOUSAVI et al., 2014).

Devido a tais características possuem importantes implicações na prevalência desses fungos nos mais variados ambientes, o contato deles com o homem e com outros animais não é incomum, e tais relações podem tornar-se de caráter não harmônico em certas situações (REVANKAR; SUTTON, 2010; SEYEDMOUSAVI et al., 2014).

3.2 A IMPORTÂNCIA CLÍNICA DOS FUNGOS NEGROS

Embora a maioria dos fungos negros não seja patogênica, alguns estão associados a doenças, e afetam tanto indivíduos imunocomprometidos quanto imunocompetentes (KIRCHHOFF et al., 2019). Estes fungos são particularmente importantes como agentes da feohifomicose, da cromoblastomicose e do eumicetoma, em humanos e animais (SEYEDMOUSAVI et al., 2014). As espécies mais importantes clinicamente pertencem a família Herpotrichiellaceae, dentro da ordem Chaetothyriales, em gêneros como *Exophiala*, *Cladophialophora*, *Coniosporium*, *Cyphellophora*, *Fonsecaea*, *Phialophora* e *Rhinocladiella* (MATSUMOTO; PADHYE; AJELLO, 1987; MATSUMOTO et al., 1994; REVANKAR; SUTTON, 2010).

O eumicetoma é uma infecção cutânea ou subcutânea crônica que afeta principalmente as extremidades inferiores (**Figura 1**), tendo como principal característica a presença de grânulos micóticos, sendo mais frequente entre trabalhadores rurais, em países tropicais e subtropicais (REVANKAR; SUTTON, 2010). Essa infecção geralmente inicia-se com uma pequena lesão subcutânea, seguindo para uma progressiva destruição dos tecidos conjuntivos, podendo invadir músculos, ossos, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos (ESTRADA et al., 2012). Pode ser causado por diversos fungos, com as espécies *Madurella mycetomatis*, *Madurella grisea* e *Scedosporium apiospermum* sendo os agentes causais mais comuns. *Exophiala*, *Cladophialophora* e *Phialophora* também já foram descritos como agentes etiológicos dessa doença (THAMMAYYA; SANYAL, 1980; TURIANSKY et al., 1995; WERLINGER; YEN MOORE, 2005).

Figura 1 – Membro inferior direito evidenciando típico acometimento por eumicetoma na região medial do tornozelo.



Fonte: Estrada et al., 2012.

A Cromoblastomicose (**Figura 2**) é uma micose de caráter crônico, gerada por fungos melanizados que afligem a pele e a camada subcutânea, provocando lesões com coloração marrom. Embora possua distribuição cosmopolita, é mais frequente em países de clima tropical e subtropical. Todos os fungos causadores desta infecção pertencem à ordem Chaetothyriales, na família Herpotrichiellaceae, sendo o *Fonsecaea pedrosoi* o principal agente etiológico (QUEIROZ-TELLES, 2015; CASTRO et al., 2017). Trata-se de uma micose de implantação, a qual sucede especialmente a partir de uma lesão, que serve como porta de entrada para os fungos no tecido da pele. Após instalados, estes desenvolvem-se de forma progressiva e se apresentam na forma de células muriformes, que são patognomônicas da doença. Tais lesões são polimórficas, sendo mais habitual uma hiperplasia granulomatosa crônica com úlceras e exsudação (QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

Figura 2 – Lesões nodulares com superfície elevada e cobertas por crostas tipo couve-flor causada pela cromoblastomicose em membro superior direito.



Fonte: López Martínez; Méndez Tovar, 2007.

A feohifomicose é um termo geralmente reservado para o restante das síndromes clínicas causadas por fungos melanizados. Pode se manifestar de forma superficial, subcutânea (**Figura 3**) ou disseminada, podendo formar cistos (TEIXEIRA et al., 2017). Apesar de ser mais comum em pacientes imunodeprimidos, especialmente aqueles onde tal estado é induzido por medicamentos usados no transplante de órgãos, também pode afetar pacientes imunocompetentes. Dentre os agentes etiológicos mais comuns estão os do gênero *Exophiala* e *Phialophora*, sendo reportados também casos do gênero *Cladophialophora* (FERNANDES et al., 2007; REVANKAR; SUTTON, 2010; SABBAGA et al., 1994).

Figura 3 – Feohifomicose na forma de cisto subcutâneo em membro superior direito.



Fonte: Isa-Isa et al., 2012.

3.3 A PATOGENICIDADE DOS FUNGOS NEGROS

O metabolismo dos fungos negros funciona de maneira distinta entre as espécies que formam o grupo, e tais características estão ligadas a sobrevivência desses fungos no ambiente e no seu potencial patogênico, visto que por meio das reações metabólicas os fungos são capazes de adquirir os nutrientes necessários para o crescimento e reprodução (GOSTINČAR; MUGGIA; GRUBE, 2012). Dentre essas características estão a capacidade de assimilação de nitrato, hidrólise da ureia e decomposição de tirosina (ESPINEL-INGROFF et al., 1988; GUGNANI; OKEKE, 1989; ZHAO, 2010).

Além disso, embora os fungos demáceos sejam bastante heterogêneos, algumas características comuns à grande maioria possuem implicações na patogenicidade, sendo as principais: presença de melanina e caroteno; formação de paredes celulares espessas; crescimento meristemático; presença de fases semelhantes a levedura (pleomorfismo); termotolerância; osmotolerância; hidrofobicidade; produção de sideróforos; adesão e formação de biofilmes (DE HOOG et al., 2007; SEYEDMOUSAVI et al., 2014; SAV et al., 2016).

3.3.1 Halotolerância e halofilia

Utilizado há séculos como conservante de alimentos, o sal cristalino (NaCl), aplicado em concentrações elevadas, é considerado hostil à grande parte das formas de vida. Porém, existem microrganismos que toleram ou preferem ambientes com altas concentrações desse mineral, sendo denominados halotolerantes os microrganismos que toleram concentrações de NaCl entre 1 e 6%, e halofílicos os que resistem a concentrações maiores que 6% (ZALAR et

al., 2007). Já foram isoladas bactérias e fungos em ambientes hipersalinos (concentração acima de 3,5% de NaCl), como as salinas, ou em ambientes moderadamente salinos, como os pântanos salgados, o solo salino, a água e a areia do mar (GUNDE-CIMERMAN et al., 2000; DYALL-SMITH; DANSON, 2001; GUNDE-CIMERMAN; RAMOS; PLEMENITAŠ, 2009).

A maioria das bactérias e organismos eucarióticos usa a estratégia de acúmulo de “solutos compatíveis” para manter suas concentrações intracelulares de Na⁺ abaixo dos níveis tóxicos para as células (DIJKSTERHUIS; DE VRIES, 2006). Estas moléculas acumulam-se nas células e equilibram a diferença osmótica entre o meio que rodeia a célula e o citosol, funcionando como um agente de tamponamento fisiológico (JENNINGS; BURKE, 1990). Os fungos geralmente acumulam diferentes polióis, aminoácidos livres e derivados. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, sensível ao NaCl usa quase exclusivamente glicerol como osmólito. Outras leveduras acumulam polióis do ambiente, como eritritol, ribitol, arabinitol, xilitol, sorbitol, manitol e galacticol (HOHMANN STEFAN, 2002).

3.3.2 Termotolerância

Além das altas concentrações de NaCl, fungos residentes da praia são expostos ao calor. A termotolerância é a capacidade de se ajustar fisiologicamente ao estresse térmico, sendo comumente associada a seres capazes de permanecerem vivos diante de uma elevação de temperatura do ambiente em que estão inseridos (BHABHRA; ASKEW, 2005). Da ótica da micologia médica, um limite importante é o da temperatura média do corpo humano, que é de aproximadamente 37 °C. Assim, visto que a capacidade de resistir à temperatura de 37°C é um pré-requisito para o desenvolvimento de micoses em mamíferos, a presença de fungos termotolerantes em ambientes com grande circulação de pessoas tem sido associada a uma maior incidência de casos dessas infecções (ROBERT; CASADEVALL, 2009).

A termotolerância é uma característica polifilética, pois surge através de diferentes filios, gêneros e até mesmo cepas fúngicas (ROBERT; CARDINALI; CASADEVALL, 2015). Dentre as 38 diferentes espécies do gênero *Cryptococcus*, por exemplo, somente as espécies patogênicas *C. neoformans* e *C. gattii* são capazes de crescer a temperaturas iguais ou superiores a 37 °C, reiterando o papel da termotolerância como fator de virulência em fungos (PERFECT, 2006)

Sabe-se que a expressão de algumas proteínas é crucial para o estabelecimento da termotolerância. Em *C. neoformans*, isolados incapazes de sintetizar calcineurina fosfatase dependente de Ca²⁺/calmodulina e proteína RAS1 não crescem *in vitro* a 37 °C (ODOM et al.,

1997; ALSPAUGH et al., 2000). Além disso, por não apresentarem crescimento à temperatura corporal em modelo de infecção animal, esses isolados mutantes foram considerados avirulentos, enfatizando a importância da termotolerância para o estabelecimento da infecção (WAUGH et al., 2002).

As espécies sem termotolerância tendem a ser sapróbias, sem habilidades infecciosas, ou patógenos de seres que habitam ambientes com temperaturas mais baixas, como mares profundos ou oceanos polares, onde a temperatura permanece abaixo de 33 °C. Exemplos são epizootias de *Exophiala psychrophila* em salmão do Atlântico (PEDERSEN; LANGVAD, 1989) e *Exophiala salmonis* em truta (CARMICHAEL, 1966).

3.3.3 Dimorfismo

O termo dimorfismo refere-se à capacidade de certos fungos crescerem em duas morfologias distintas, levedura (**Figura 4**) e hifa (**Figura 5**), dependendo das condições ambientais locais. Este fenômeno atraiu intensa investigação científica, principalmente porque o dimorfismo é um fator de virulência crítico para muitos dos fungos que são patogênicos para humanos, incluindo os fungos demáceos agentes da feohifomicose, cromblastomicose e eumicetoma (LÓPEZ MARTÍNEZ; MÉNDEZ TOVAR, 2007; ARENAS; MORENO-COUTIÑO; WELSH, 2012; GAUTHIER, 2015; HATTA et al., 2021).

Figura 4 – Fotomicrografia de células da espécie *Exophiala sideris* de cultura em ágar de extrato de malte apresentando morfologia de levedura.



Fonte: Seyedmousavi et al., 2011.

Figura 5 – Fotomicrografia de células da espécie *Exophiala sideris*

de cultura em ágar de extrato de malte na morfologia de hifa.



Fonte: Seyedmousavi et al., 2011.

A temperatura é o principal fator que interfere na alteração morfológica desses fungos (caracterizados como termicamente dimórficos), embora existam fungos dimórficos que independem dela, podendo ter como agentes indutores a concentração ambiental de dióxido de carbono ou oxigênio e a presença de cisteína ou estradiol (ERNST; SCHMIDT, 2000). Os fungos termicamente dimórficos geralmente desenvolvem-se como filamentosos quando a temperatura ambiental gira entre 22 e 25°C, reproduzindo-se assim por meio de esporos. Já em temperaturas mais elevadas, entre 35 e 40°C, a morfologia de levedura é a mais comumente encontrada. Por conta disso, quando associados a patologias em humanos, os fungos dimórficos normalmente encontram-se na forma de levedura (GAUTHIER, 2015).

Assim como qualquer agente etiológico, os fungos precisam superar as barreiras estruturais, térmicas e imunológicas a fim de causarem infecções em humanos. A pele intacta é uma das principais barreiras estruturais, sendo bastante resistente a patógenos cutâneos. Já foi demonstrado que, para adentrar as camadas superficiais da epiderme, as leveduras da espécie *Malassezia furfur* necessitam crescer na forma de hifa, para deixarem de ser comensais e causarem a micose conhecida como pitiríase versicolor (BONIFAZ et al., 2010). Os mecanismos que explicam essa transição ainda são desconhecidos.

3.3.4 Melanina

As melaninas são uma classe ubíqua de pigmentos biológicos tipicamente castanho-escuros ou negros, com carga negativa e alto peso molecular (HILL, 1992). Possuem insolubilidade em solventes aquosos e orgânicos. Em fungos causadores de micoses, podem

agir como sequestradores de radicais oxidativos de oxigênio e derivados de nitrogênio, além de promover proteção contra enzimas hidrolíticas produzidas por macrófagos e reduzir a fagocitose, aumentando a resistência ao sistema imune e também a ação dos antifúngicos (ROZENTAL; ALVIANO; DE SOUZA, 1994). Devido a essas propriedades, a melanina tem sido considerada o principal fator de virulência dos fungos demáceos (LANGFELDER et al., 2003; NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003; VICENTE et al., 2008).

A termotolerância também tem sido associada à melanização dos fungos demáceos. A melanina pode aumentar a capacidade de absorver e dissipar o excesso de calor, evitando danos celulares causados por altas temperaturas (ROSAS; CASADEVALL, 1997). Ademais, devido às fortes propriedades antioxidantes dessa proteína, há proteção contra os radicais livres que surgem a partir de estresse térmico (FLANAGAN; MOSELEY; BUETTNER, 1998; MCGRAW, 2005).

Rosas e Casadevall (1997) observaram que, ao serem colocadas em banho-maria ou freezer e sofrerem choque térmico, células melanizadas de *C. neoformans* obtiveram maiores taxas de sobrevivência do que células não melanizadas. Observação semelhante foi feita em estudo de Rehnstrom e Free (1996), onde conídios de *Monilinia fructicola* deficientes em melanina tendiam a ser mais facilmente mortos por estresse de calor ou frio.

Ademais, já foi demonstrado que as melaninas podem ligar-se a diversos medicamentos (LARSSON, 1993). Há evidências de que a melanina afeta a suscetibilidade de *C. neoformans* a certos compostos, como anfotericina B, trifluoroperazina e peptídeos microbicidas (WANG Y; CASADEVALL A, 1994, 1996; DOERING et al., 1999). Foi proposto que a atenuação da susceptibilidade de *C. neoformans* à anfotericina B promovida pela melanina ocorre tanto pela diminuição da permeabilidade da parede celular ao fármaco quanto pela eliminação de radicais livres liberados pela membrana celular danificada pelo fármaco (GÓMEZ; NOSANCHUK, 2003).

Embora seja conhecida a existência de vários tipos de melanina no reino fúngico, a maioria é derivada do 1,8-diidroxinaftaleno (DHN) e são conhecidas como DHN-melaninas. A via biossintética que catalisa a DHN foi denominada via do policetídeo e reside principalmente nos ascomicetos e deuteromicetos (BELL; WHEELER, 1986). Dentre os patógenos fúngicos humanos que formam os precursores da melanina pela via do policetídeo podem ser citados *Aspergillus nidulans*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *Alternaria alternata*, *Cladophialophora carrionii*, *Exophiala dermatitidis*, *Exophiala jeanselmei*, *F. pedrosoi*, *Hendersonulla toruloidii*, *Phaeoannellomyces werneckii*, *Phialophora richardsiae*, *P. verrucosa*, *Cladophialophora*

bantiana (WHEELER, 1983; BELL; WHEELER, 1986; TAYLOR; WHEELER; SZANISZLO, 1987; TSAI et al., 2001).

Embora a melanina seja considerada o principal fator de virulência dos fungos negros, a produção de enzimas extracelulares também tem sido associada à patogenicidade de tais organismos, através da facilitação da invasão tecidual, eliminação ou evasão de mecanismos do sistema imune e obtenção de nutrientes (SOUZA et al., 2008). Dentre essas enzimas estão as ureases.

3.3.5 Urease

As ureases (EC 3.5.1.5, ureia amidohidrolase) são metaloenzimas dependentes de Ni^{2+} que catalisam a hidrólise da ureia para formar amônia e ácido carbâmico, com a hidrólise espontânea de ácido carbâmico em ácido carbônico, gerando uma outra molécula de amônia (COX et al., 2000; SUMNER, 2013). São importantes na história da enzimologia, visto que foram as primeiras enzimas a serem purificadas e cristalizadas. As ureases são encontradas em plantas, fungos e bactérias, possuindo semelhanças nas sequências de aminoácidos, indicando que as ureases possuem estruturas terciárias e mecanismos catalíticos equivalentes (MOBLEY; ISLAND; HAUSINGER, 1995).

Substrato da urease, a ureia é gerada em humanos após a quebra de aminoácidos, sendo uniformemente distribuída por todo o corpo, incluindo no sistema nervoso central, no tecido adiposo subcutâneo, no soro sanguíneo e no fluido de revestimento epitelial (RONNE-ENGSTRÖM et al., 2001).

Por meio das ureases, vários microrganismos utilizam a ureia como fonte de nitrogênio e, a exemplo da criptococose e da coccidioidomicose, como fator de virulência para doenças humanas e de animais (OLSZEWSKI et al., 2004; MIRBOD-DONOVAN et al., 2006a). A produção de urease já foi encontrada nos fungos patogênicos *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii* e espécies de *Trichosporon* e *Aspergillus* (MIRBOD; SCHALLER; COLE, 2002), bem como nos agentes da cromoblastomicose *Cladophialophora carrionii* e *Fonsecaea pedrosoi* (MONTROYA et al., 2020).

Já foi demonstrado que as cepas urease-positivas da levedura *C. neoformans* promovem, em detrimento de uma resposta imunológica fungicida Tipo 1 (Th1), uma resposta imune potente do Tipo 2 (Th2) no tecido pulmonar, mas não protetora. Com isso, há um aumento significativo na carga fúngica e nos danos teciduais, em comparação com cepas

urease-negativas (OSTERHOLZER et al., 2009). Além disso, a resposta Th2 pode acarretar em um processo de feedback positivo, tendo em vista que pode fornecer ureia adicional derivada do hospedeiro ao patógeno à medida que macrófagos ativados convertem arginina em ornitina e ureia (GORDON, 2003).

Estudos de *C. neoformans* e *Coccidioides posadasii* sugerem que mudanças de pH dependentes de urease estão envolvidas na evasão do sistema imunológico e que a toxicidade da amônia para as células hospedeiras promove doença sistêmica (RUTHERFORD, 2014). No entanto, tem sido observado que as ureases não são as únicas enzimas envolvidas na evasão dos fungos patogênicos do sistema imunológico.

3.3.6 DNase

As nucleases são enzimas que catalisam a clivagem das pontes internucleotídicas sem a liberação de fosfato inorgânico. Essas pontes são extremamente resistentes à hidrólise química e são necessárias para a estabilidade e integridade de moléculas, como os ácidos nucleicos (DNA e RNA) (LANDRY; LEVIN, 2014). Dentre as nucleases estão as desoxirribonucleases (DNases), uma classe heterogênea de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações fosfodiéster na estrutura do ácido desoxirribonucleico (DNA), sendo classificadas ao longo do tempo em diversos grupos com base nas várias propriedades bioquímicas que exibem (LASKOWSKI, 1967).

Foi relatado que a levedura *Candida albicans* pode escapar da captura e morte das armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) através da secreção de DNase, devido ao seu potencial de danificar a estrutura do DNA dos neutrófilos além de atenuar a produção de espécies reativas de oxigênio pelos mesmos (ZHANG et al., 2017).

A produção de DNase extracelular também foi testada e comprovada em isolados clínicos e ambientais de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* por Sánchez e Colom (2010). Os isolados clínicos de *C. neoformans* produziram significativamente mais DNase extracelular do que os isolados ambientais. Desta forma, tais resultados indicam que a DNase de *Cryptococcus* pode contribuir para a virulência, por meio da degradação do DNA do hospedeiro (SÁNCHEZ; COLOM, 2010).

A atividade da DNase foi descrita como necessária para a progressão da infecção por *Streptococcus* spp. do Grupo A, aumentando a evasão do sistema imunológico inato, especificamente evitando a morte causada por neutrófilos (SUMBY et al., 2005). Ademais, já foram encontrados neutrófilos na resposta inflamatória à infecção por *C. neoformans*,

possuindo estreita associação com o tecido infectado, o que leva a crer que é possível que a DNase criptocócica atue de uma forma semelhante à DNase de *Streptococcus* (SÁNCHEZ; COLOM, 2010).

3.4 PRESENÇA DE FUNGOS NEGROS POTENCIALMENTE PATOGÊNICOS NA AREIA DA PRAIA

Frequentemente procuradas para fins recreativos em todo o mundo, as praias são importantes ambientes de lazer. Assim, para que sejam utilizadas de maneira segura e sem riscos potenciais à saúde, é de fundamental importância que tanto a água quanto a areia desses locais estejam em boas condições de higiene (SABINO et al., 2011). No entanto, tendo em vista que as praias são diariamente abastecidas com grandes quantidades de matéria orgânica pela água do mar, pelas plantas e pelas algas na orla e também por atividades humanas e animais frequentes, tais condições podem tornar-se inadequadas (MUDRYK; PODGORSKA, 2007).

Sousa (2017) em análise microbiológica das águas da Praia de Atalaia, localizada no município de Luís Correia no Estado do Piauí, observou a presença de microrganismos, com a contagem dentro dos parâmetros estabelecidos pela Portaria nº 2914/2011 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011). No entanto, uma análise dos parâmetros relacionados à virulência e patogenicidade não foi realizada.

O acúmulo de matéria orgânica na areia das praias proporciona condições apropriadas para o desenvolvimento de microrganismos heterotróficos, incluindo os fungos demáceos, que desempenham um papel importante na degradação da matéria orgânica acumulada nos ecossistemas de praias arenosas (SABINO et al., 2011). Assim, a areia da praia representa um ambiente mais adequado para o desenvolvimento de microrganismos do que a água.

A presença de fungos demáceos - dentre eles os gêneros *Exophiala*, *Hortaea*, *Aureobasidium* e *Cladophialophora* - já foi observada em amostras de areia da praia em estudos anteriores (DE LEO et al., 2019; EFSTRATIOU; VELEGRAKI, 2010; ROMÃO et al., 2015; WEISKERGER; BRANDÃO, 2020).

Dessa forma, apesar desses fungos serem saprófitos encontrados no ambiente da praia, é importante lembrar que algumas espécies são passíveis de causarem doenças e podem agir como patógenos oportunistas, especialmente em pacientes imunocomprometidos (CHEN et al., 2014; DE HOOG et al. 2000). Deste modo, atividades recreativas habituais na praia que envolvem sentar, deitar, passear e construir castelos de areia podem representar riscos à saúde para alguns banhistas (YEE et al., 2016).

4 METODOLOGIA

4.1 COLETA DE AMOSTRAS DE AREIA NA PRAIA DA PEDRA DO SAL

As coletas foram realizadas no dia 26 de outubro de 2020. Segundo dados da AccuWeather (2021), a temperatura nesse dia variou entre 25 °C e 33 °C. As amostras foram coletadas em sacos plásticos estéreis (**Figura 6**).

Figura 6 – Coleta em ponto de amostragem de areia seca na Praia da Pedra do Sal.



Fonte: Os autores.

Os pontos de amostragem estavam localizados nas áreas de recreação distribuídos pela praia, tanto no lado Bravo quanto no lado Manso. Os pontos de coleta encontram-se nas proximidades das calçadas, chuveirinhos e bares. Foram coletadas amostras de areia úmida e areia seca.

4.2 ISOLAMENTO

Foram retiradas 5g de cada amostra de areia, sendo posteriormente homogeneizada por vórtex durante 2 minutos em 25mL de água peptonada suplementada com cloranfenicol (200 mg/L). Alíquotas de 0,1 mL dessa solução foram semeadas, com auxílio de uma alça de Drigalski, em placas de Petri com 2 meios de cultura distintos: Ágar Sabouraud Dextrose e Ágar Batata Dextrose (suplementado com cloranfenicol 0,1%). As placas com Ágar Sabouraud Dextrose permaneceram incubadas em estufa por 10 dias, enquanto as com Ágar Batata Dextrose permaneceram por 7 dias, ambas em temperatura de 28 °C. Tal procedimento foi realizado em duplicata.

Ademais, foi utilizada também a técnica de flotação em óleo. Nesta, foram retiradas 5g de areia das amostras para homogeneização com água peptonada suplementada com cloranfenicol e 2 mL de óleo vegetal estéril, seguido de agitação vigorosa por 5 min. Após esse processo, os frascos foram deixados em repouso por 20 min, sendo coletada cuidadosamente uma alíquota de 0,1mL da interface óleo-água, a qual foi inoculada em Ágar Mycobio. As

placas permaneceram incubadas por 4 semanas a 28 °C, sendo o procedimento realizado em duplicata (DIXON; SHADOMY; SHADOMY, 1980; IWATSU; MIYAJI; OKAMOTO, 1981). Após o tempo de crescimento, as colônias de coloração escura foram isoladas e armazenadas em Ágar Sabouraud Dextrose (cultivo de até 10 dias, a 28°C). O presente projeto tem o código de cadastro SisGen A22E225.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS QUANTO À MORFOLOGIA

A caracterização dos isolados quanto a morfologia, diferenciando-os em levedura ou filamentosos (hifa), foi feita através da observação micromorfológica e macromorfológica. A análise micromorfológica foi realizada por meio de microscopia de luz. Na avaliação macromorfológica, com base no crescimento em Ágar Sabouraud Dextrose e Ágar Mycobio, foi avaliado o aspecto das colônias no verso e reverso, com colônias aveludadas e pulverulentas caracterizando morfologia filamentosas; e cremosa caracterizando morfologia leveduriforme (DE HOOG, 1997).

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS QUANTO À MELANIZAÇÃO

A caracterização dos isolados quanto à melanização deu-se por meio da observação visual da pigmentação em Ágar Sabouraud Dextrose. Os fungos demáceos produzem um pigmento de coloração escura, variando do preto ao marrom.

4.5 AVALIAÇÃO DE TERMOTOLERÂNCIA

A termotolerância foi testada de acordo com De Hoog e colaboradores (2006). Os isolados foram cultivados em Ágar Sabouraud, em uma área de 20mm, e incubados a temperatura de 37 °C por 15 dias.

O crescimento dos isolados foi classificado como ótimo quando a área ocupada pela colônia foi maior que 20 mm, bom quando foi de aproximadamente 20 mm e razoável quando ocupou uma área inferior a 20 mm.

4.6 AVALIAÇÃO DE HALOTOLERÂNCIA E HALOFILIA

Todos os isolados fúngicos foram inicialmente repicados em tubos contendo Ágar Batata e incubados em estufa a 28 °C de 2 a 7 dias. As suspensões dos fungos foram preparadas em solução salina estéril e padronizadas em espectrofotômetro com $\lambda = 530$ nm, até se obter um valor de transmitância de 90 %, afim de atingir uma concentração final de microrganismos entre 1×10^6 a 5×10^6 UFCs/mL.

O teste com NaCl foi realizado em meio líquido (Caldo Sabouraud Dextrose) disposto em placas de 96 poços. Foram testadas as seguintes concentrações de NaCl: 2,5%; 5%; 7,5%; 10%; 15% e 20%, sendo classificados como halotolerantes os microrganismos que toleraram concentrações inferiores a 5% e halofílicos os que resistem a concentrações maiores que 5%. As suspensões padronizadas dos isolados fúngicos foram testadas em duplicata em cada concentração e incubadas em estufa a 28 °C por 15 dias. O resultado positivo foi visualizado com a turvação do meio, decorrente do crescimento da cultura.

4.7 DETECÇÃO DE PRODUÇÃO DE UREASE

Foi determinada a partir da inoculação dos isolados em tubos contendo meio de ureia-ágar-base e incubados a 30 °C por 7 dias (CHRISTENSEN, 1946; SEELIGER, 1956). A produção da enzima foi confirmada pela mudança de cor devido à utilização da ureia e consequente formação de amônia, a qual leva à alcalinização do meio, passando de amarelo para rosa ou vermelho devido a presença do indicador de pH vermelho de fenol.

4.8 DETECÇÃO DE PRODUÇÃO DE DNASE

Foram utilizadas placas de Ágar DNase suplementado com azul de toluidina. Cada isolado foi inoculado na superfície do meio, em uma área de 20 mm, em duplicata, e incubado a 30 °C por 15 dias. As leveduras capazes de despolimerizar o DNA contido no meio exibiram zonas róseas ou claras (halos) ao redor das colônias, enquanto os microrganismos sem atividade não alteraram o meio.

5 RESULTADOS

Dentre os isolados de fungos demáceos obtidos, 11 (37,9%) foram isolados com auxílio da técnica de flotação em óleo, utilizada para o processamento das amostras inoculadas em Ágar Mycobio, e 18 (62,1%) foram obtidos das amostras inoculadas em Ágar Sabouraud Dextrose e Ágar Batata Dextrose. Ademais, 15 (51,7%) isolados permaneceram com aspecto leveduriforme e 14 (48,3%) alteraram a morfologia para fungo filamentoso com o passar dos dias, após apresentaram-se primeiramente como levedura.

Todos os isolados cresceram na temperatura de 37 °C no período de 15 dias, sendo 20 (69%) com o crescimento classificado como ótimo, 4 (13,8%) com crescimento bom e 5 (17,2%) com desenvolvimento razoável. Na avaliação de halotolerância, todos os isolados foram capazes de crescer na maior concentração de NaCl testada (20%). Já em relação a produção de urease, 10 (34,5%) isolados foram positivos, enquanto 19 (65,5%) não apresentaram produção da enzima. Apenas 2 (6,9%) isolados demonstraram capacidade de hidrolisar DNA extracelular. Os resultados encontram-se resumidos na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Dados das características associadas à patogenicidade dos isolados de fungos demáceos testados.

	Positivo	Negativo
Crescimento a 37°C	29 (100%)	-
Tolerância a NaCl 20%	29 (100%)	-
Produção de urease	10 (34,5%)	19 (65,5%)
Produção de DNase	2 (6,9%)	27 (93,1%)

6 DISCUSSÃO

Embora a existência de microrganismos na areia da praia seja algo previsível, tendo em vista que a areia possibilita o acúmulo deles durante os ciclos das marés, a presença de espécies com potencial patogênico pode representar um perigo para a saúde (VOGEL et al., 2007). Este estudo é o primeiro a fornecer dados sobre populações de fungos negros em areia de praia no litoral do Piauí.

O pleomorfismo é uma característica fundamental tanto para a resistência dos fungos demáceos no ambiente quanto para o sucesso na infecção do hospedeiro (ERNST; SCHMIDT, 2000). Neste estudo, observou-se que 14 isolados (48%) mudaram a morfologia no decorrer dos testes, apresentando-se primeiramente como levedura e posteriormente com aspecto filamentosos, o que reitera a capacidade de tais fungos adaptarem-se às condições do ambiente em que se encontram e sugerem seu potencial patogênico.

Por meio da morfologia filamentosos, o crescimento das hifas permite a rápida expansão e penetração no substrato, facilitando assim a absorção de nutrientes e colonização do ambiente (STERFLINGER; KRUMBEIN, 1995; VICENTE et al., 2014). Tais propriedades são essenciais para fungos de origem semelhante aos que foram testados neste estudo, denominados oligotróficos, provenientes de um ambiente escasso de matéria orgânica e deficiente em nutrientes.

Em relação à transição para a morfologia de levedura, embora a literatura careça de estudos com fungos demáceos, houveram avanços substanciais nos últimos anos na compreensão desse processo. Para *Blastomyces dermatitidis* e *H. capsulatum*, fungos dimórficos não demáceos, já foi demonstrado que a histidina quinase híbrida codificada pelo gene DRK1 (quinase reguladora de dimorfismo-1) é essencial no processo de transição para morfologia de levedura que ocorre a 37 °C, além de ser importante na virulência desses fungos. No entanto, quando houve deleção do DRK1, observou-se que *B. dermatitidis* e de *H. capsulatum* cresceram como hifa a 37 °C, além de torná-las avirulentas (NEMECEK; WÜTHRICH; KLEIN, 2006).

Alguns trabalhos já demonstraram que a transição para a morfologia de levedura propicia a expressão de genes críticos para a evasão imunológica, para a sobrevivência intracelular e para a disseminação (KEATH E J et al., 1989; WEST BATANGHARI et al., 1998; ENGLE; GOLDMAN, 2000; HUNG CHIUNG-YU et al., 2002; SEBGHATI BOHSE MEGAN L.; WOODS JON P., 2005). Os genes BAD1 e CBP1, por exemplo, são transcritos apenas na fase de levedura. Em *B. dermatitidis*, BAD1 codifica uma adesina que liga a levedura

às células hospedeiras, além de promover a evasão imunológica ao bloquear a produção de TNF- α e inibir a ativação de linfócitos T CD4 + (BRANDHORST et al., 2013). Já no *H. capsulatum*, a CBP1 codifica uma proteína que atua ligando-se ao cálcio e lipídeos, cuja ação é essencial para a sobrevivência desses fungos dentro dos macrófagos (BECK et al., 2009).

Levando-se em consideração que as coletas foram realizadas entre os meses de outubro e novembro de 2020, período este de estiagem em grande parte do Estado do Piauí, percebe-se que tais fungos possuem uma resistência considerável ao calor, baixa umidade e radiação ultravioleta (GOSTINČAR; MUGGIA; GRUBE, 2012). Tendo em vista que os isolados desse estudo são fungos demáceos, a melanina pode ter exercido um papel crucial na resistência a esses fatores ambientais.

A avaliação da termotolerância ratificou a resistência dos isolados, visto que todos foram capazes de crescer a 37 °C. Em um trabalho anterior de Paolo et al. (2006), o papel da melanina na proteção contra o estresse por calor foi observado para a espécie *Exophiala dermatitidis*, onde mutantes deficientes em melanina produziram conídios que eram mais suscetíveis a altas temperaturas, sendo incapazes de crescer ao aquecimento até 40 °C. Além disso, um estudo comparativo de Sun et al. (2011) entre cepas de *Fonsecaea monophora* albinas (desprovidas de melanina na parede celular) e não albinas, mostrou que as cepas albinas possuíam uma maior susceptibilidade ao pH ácido, à alta radiação UV e ao estresse oxidativo.

O papel da melanina na proteção contra a radiação ultravioleta solar (fotoproteção) em fungos já é bem conhecido. Enquanto outros pigmentos biológicos só são capazes de absorver uma faixa estreita de frequências de luz, a estrutura complexa das melaninas propicia a absorção e dissipação de toda a porção UV-visível do espectro eletromagnético (MEREDITH; SARNA, 2006). Além disso, Eisenman e Casadevall (2012) relataram propriedades radioprotetoras da melanina por meio da sua população estável de radicais livres, que elimina radicais livres gerados pela radiação.

Tem-se o conhecimento de que a melanina contribui na halotolerância de fungos demáceos (KOGĚJ et al., 2004) e que tal característica é de suma importância para virulência desses fungos (DE HOOG, 1993), embora não esteja totalmente elucidado. A hipótese mais aceita é de que sua presença favoreça a integridade da parede celular, o que dificulta a perda do conteúdo intracelular (KEJŽAR et al., 2013). Neste estudo, todos os isolados foram capazes de crescer em concentração de 20% de NaCl. Já foi demonstrado que níveis ligeiramente elevados de sal determinam a ocorrência de *Exophiala dermatitidis* nos pulmões de pacientes com fibrose cística (DE HOOG, 1993).

Além do papel da melanina na resistência a fatores ambientais, já foi observada a sua importância para patogênese de fungos demáceos. Uma avaliação comparativa de Poyntner et al. (2018) entre cepas selvagens de *E. dermatitidis* e cepas mutantes deficientes em melanina, em um modelo de cultura de pele *ex vivo*, mostrou que os fungos do tipo selvagem eram mais invasivos, visto que foram capazes de colonizar completamente o estrato córneo, invadir a pele e infectar os queratinócitos, enquanto os mutantes cobriram apenas parcialmente a pele e não apresentavam capacidade de invasão.

Por meio da técnica de flotação em óleo, utilizada para o processamento das amostras inoculadas em Ágar Mycobio, foram obtidos 11 isolados (37,9%). Devido à utilização de óleo vegetal nesta técnica, assume-se que tais isolados são hidrofóbicos. Tal característica é de suma importância para microrganismos patogênicos, pois facilita a adesão desses no tecido do hospedeiro, possibilitando a colonização, a consolidação da infecção e, possivelmente, a formação de biofilmes (HAZEN, 1989; RAUT; RATHOD; KARUPPAYIL, 2010; YOSHIJIMA et al., 2010).

A atividade da urease está diretamente ligada à patogênese de fungos. No presente estudo, foi confirmada a presença da enzima em 10 dos 29 isolados testados (34,5%). No estudo de Montoya et al. (2020) com 29 isolados clínicos de *Cladophialophora carrionii* e 11 de *Fonsecaea pedrosoi*, a produção de urease foi avaliada e obteve resultados com valores mais expressivos, sendo positiva em 26 (89,6%) dos isolados de *C. carrionii* e 10 (90%) de *F. pedrosoi*. Tais resultados corroboram com a hipótese de que o contato com o hospedeiro pode estimular a produção de urease, e reafirma a sua importância para patogênese dos fungos negros.

A virulência da urease está ligada a diversos fatores, incluindo: alteração do pH, que reduz a acidificação e a maturação dos fagolisossomos nas células fagocíticas, prejudicando a morte do patógeno e a apresentação do antígeno; perturbação da resposta imunológica fungicida Th1, tornando-a ineficaz; utilização da ureia como fonte de nitrogênio pelo fungo e produção de amônia, a qual é tóxica para as células do hospedeiro (GORDON, 2003; MIRBOD-DONOVAN et al., 2006b; OSTERHOLZER et al., 2009; RUTHERFORD, 2014).

As DNases, por sua vez, já demonstraram ter papel importante na virulência de fungos patogênicos, auxiliando-os na evasão da resposta imune inata mediada por neutrófilos e atuando na degradação do DNA do hospedeiro (SÁNCHEZ; COLOM, 2010; ZHANG et al., 2017). No nosso estudo, a enzima foi pouco detectada, sendo apresentada em apenas 2 isolados (6,9%). Resultados semelhantes foram encontrados por Sav et al. (2016) em um estudo com 8 cepas

clínicas e 218 ambientais de *Exophiala* spp., no qual apenas três cepas expressaram DNase. Nossos achados também corroboram com o estudo de Montoya et al. (2020), com 29 isolados clínicos de *Cladophialophora carrionii* e 11 de *Fonsecaea pedrosoi*, em que todos foram negativos para produção de DNase.

O conhecimento sobre a ecologia e a evolução é essencial para um melhor entendimento da patogenicidade e do oportunismo de fungos ambientais. Logo, é notável a importância do desenvolvimento de pesquisas como esta, que analisam a diversidade fisiológica desses fungos, assim como o seu perfil de virulência. Contudo, a futura caracterização dos isolados quanto a espécie possibilitará uma melhor comparação com outros estudos. Além disso, a comparação entre isolados clínicos e ambientais deverá trazer uma visão mais ampla da importância dos fatores relacionados à patogenicidade. Deste modo, a análise comparativa desses fatores em isolados ambientais e clínicos pode ser uma vertente notável de pesquisas futuras.

7 CONCLUSÃO

A presença de fungos demáceos em amostras de areia sugere um potencial risco à saúde dos usuários das praias, principalmente porque muitos isolados apresentaram importantes fatores de virulência. É consenso que as características avaliadas neste estudo – melanização, dimorfismo, hidrofobicidade, termotolerância, produção de urease e DNase – são essenciais para a colonização do hospedeiro. Portanto, nossos resultados apontam que os fungos isolados da areia da costa litorânea do Piauí podem expressar fatores de patogenicidade e apresentam alta capacidade de persistência no ambiente. Desta forma, espera-se que tais resultados possam auxiliar no entendimento das questões referentes à tendência destes fungos em causar infecções em humanos e animais, pois a literatura atual carece de estudos que avaliam essa correlação.

REFERÊNCIAS

- ALSPAUGH, J. A., CAVALLO, L. M., PERFECT, J. R., *et al.* "RAS1 regulates filamentation, mating and growth at high temperature of *Cryptococcus neoformans*", **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 352–365, 1 abr. 2000. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2000.01852.x.
- ARENAS, R., MORENO-COUTIÑO, G., WELSH, O. "Classification of subcutaneous and systemic mycoses", **Subcutaneous Mycoses**, v. 30, n. 4, p. 369–371, 1 jul. 2012. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2011.09.006.
- BECK, M. R., DEKOSTER, G. T., CISTOLA, D. P., *et al.* "NMR structure of a fungal virulence factor reveals structural homology with mammalian saposin B", **Molecular Microbiology**, v. 72, n. 2, p. 344–353, 1 abr. 2009. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2009.06647.x.
- BELL, A. A., WHEELER, M. H. "Biosynthesis and functions of fungal melanins", **Annual review of phytopathology**, v. 24, n. 1, p. 411–451, 1986.
- BHABHRA, R., ASKEW, D. S. "Thermotolerance and virulence of *Aspergillus fumigatus*: role of the fungal nucleolus", **Medical Mycology**, v. 43, n. Supplement_1, p. S87–S93, 1 jan. 2005. DOI: 10.1080/13693780400029486.
- BOHSE MEGAN L., WOODS JON P. "Surface Localization of the Yps3p Protein of *Histoplasma capsulatum*", **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 4, p. 685–693, 1 abr. 2005. DOI: 10.1128/EC.4.4.685-693.2005.
- BONIFAZ, A., GÓMEZ-DAZA, F., PAREDES, V., *et al.* "Tinea versicolor, tinea nigra, white piedra, and black piedra", **Mycology**, v. 28, n. 2, p. 140–145, 1 mar. 2010. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2009.12.004.
- BRANDHORST, T. T., ROY, R., WÜTHRICH, M., *et al.* "Structure and Function of a Fungal Adhesin that Binds Heparin and Mimics Thrombospondin-1 by Blocking T Cell Activation and Effector Function", **PLOS Pathogens**, v. 9, n. 7, p. e1003464, 11 jul. 2013. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003464.
- BRASIL, P. N. "2914/2011, do Ministério da Saúde", **Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União, Brasília**, v. 12, 2011.
- CARMICHAEL, J. W. "Cerebral mycetoma of trout due to a phialophora-like fungus", **Sabouraudia**, v. 5, n. 2, p. 120–123, out. 1966. DOI: 10.1080/00362176785190211.
- CASTRO, R. J. A. de, SIQUEIRA, I. M., JERÔNIMO, M. S., *et al.* "The Major Chromoblastomycosis Etiologic Agent *Fonsecaea pedrosoi* Activates the NLRP3 Inflammasome", **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1572, 2017. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01572.
- CHEN, Y.-C., SU, Y.-C., TSAI, C.-C., *et al.* "Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Exophiala jeanselmei*", **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 47, n. 6, p. 546–549, 1 dez. 2014. DOI: 10.1016/j.jmii.2012.06.006.

CHRISTENSEN, W. B. "Urea Decomposition as a Means of Differentiating *Proteus* and *Paracolon* Cultures from Each Other and from *Salmonella* and *Shigella* Types", **Journal of bacteriology**, v. 52, n. 4, p. 461–466, out. 1946. DOI: 10.1128/JB.52.4.461-466.1946.

COX, G. M., MUKHERJEE, J., COLE, G. T., *et al.* "Urease as a Virulence Factor in Experimental Cryptococcosis", **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 443, 1 fev. 2000. DOI: 10.1128/IAI.68.2.443-448.2000.

DA SILVA, B. R. V. "Geoturismo como Estratégia de Geoconservação para a praia de Pedra do Sal, Parnaíba/PI", **Revista de Geociências do Nordeste**, v. 2, p. 1211–1220, 2016.

DE HOOG, G. S. "Evolution of black yeasts: possible adaptation to the human host", **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 63, n. 2, p. 105–109, 1 fev. 1993. DOI: 10.1007/BF00872386.

DE HOOG, G. S. "Significance of fungal evolution for the understanding of their pathogenicity, illustrated with agents of phaeohyphomycosis", **Mycoses**, v. 40, n. s2, p. 5–8, 1 out. 1997. DOI: 10.1111/j.1439-0507.1997.tb00555.x.

DE LEO, F., GIUDICE, A. L., ALAIMO, C., *et al.* "Occurrence of the black yeast *Hortaea werneckii* in the Mediterranean Sea", **Extremophiles**, v. 23, n. 1, p. 9–17, 2019.

DIJKSTERHUIS, J., DE VRIES, R. P. "Compatible solutes and fungal development", **Biochemical Journal**, v. 399, n. 2, 27 set. 2006. DOI: 10.1042/BJ20061229. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BJ20061229>. Acesso em: 16 jun. 2021.

DIXON, D., SHADOMY, H., SHADOMY, S. "Dematiaceous fungal pathogens isolated from nature", **Mycopathologia**, v. 70, n. 3, p. 153–161, mar. 1980. DOI: 10.1007/bf00443026.

DOERING, T. L., NOSANCHUK, J. D., ROBERTS, W. K., *et al.* "Melanin as a potential cryptococcal defence against microbicidal proteins", **Medical Mycology**, v. 37, n. 3, p. 175–181, 1 jan. 1999. DOI: 10.1080/j.1365-280X.1999.00218.x.

DYALL-SMITH, M., DANSON, M. "The life of brine: halophiles in 2001", **Genome Biology**, v. 2, n. 12, p. reports4033.1, 21 nov. 2001. DOI: 10.1186/gb-2001-2-12-reports4033.

EFSTRATIOU, M. A., VELEGRAKI, A. "Recovery of melanized yeasts from Eastern Mediterranean beach sand associated with the prevailing geochemical and marine flora patterns", **Medical Mycology**, v. 48, n. 2, p. 413–415, 1 mar. 2010. DOI: 10.3109/13693780902814294.

EISENMAN, H. C., CASADEVALL, A. "Synthesis and assembly of fungal melanin", **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 931–940, 1 fev. 2012. DOI: 10.1007/s00253-011-3777-2.

ERNST, J. F., SCHMIDT, A. **Dimorphism in human pathogenic and apathogenic yeasts**. Basel, S Karger AG, 2000.

ESPINEL-INGROFF, A., GOLDSON, P. R., MCGINNIS, M. R., *et al.* "Evaluation of proteolytic activity to differentiate some dematiaceous fungi.", **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 301, 1 fev. 1988.

ESTRADA, R., CHÁVEZ-LÓPEZ, G., ESTRADA-CHÁVEZ, G., *et al.* "Eumycetoma", **Subcutaneous Mycoses**, v. 30, n. 4, p. 389–396, 1 jul. 2012. DOI: 10.1016/j.clinidematol.2011.09.009.

FERNANDES, N. C., NACIF, D., AKITI, T., *et al.* "Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Cladophialophora* sp.: a case report", **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, p. 109–112, 2007.

FLANAGAN, S. W., MOSELEY, P. L., BUETTNER, G. R. "Increased flux of free radicals in cells subjected to hyperthermia: detection by electron paramagnetic resonance spin trapping", **FEBS Letters**, v. 431, n. 2, p. 285–286, 17 jul. 1998. DOI: 10.1016/S0014-5793(98)00779-0.

GÓMEZ, B. L., NOSANCHUK, J. D. "Melanin and fungi", **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, 2003. Disponível em: https://journals.lww.com/co-infectiousdiseases/Fulltext/2003/04000/Melanin_and_fungi.5.aspx.

GORBUSHINA, A. A., KOTLOVA, E. R., SHERSTNEVA, O. A. "Cellular responses of microcolonial rock fungi to long-term desiccation and subsequent rehydration", **Black fungal extremes**, v. 61, p. 91–97, 1 jan. 2008. DOI: 10.3114/sim.2008.61.09.

GORDON, S. "Alternative activation of macrophages", **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 1, p. 23–35, 1 jan. 2003. DOI: 10.1038/nri978.

GOSTINČAR, C., GRUBE, M., GUNDE-CIMERMAN, N. "Evolution of Fungal Pathogens in Domestic Environments?", **Black Fungi**, v. 115, n. 10, p. 1008–1018, 1 out. 2011. DOI: 10.1016/j.funbio.2011.03.004.

GOSTINČAR, C., MUGGIA, L., GRUBE, M. "Polyextremotolerant black fungi: oligotrophism, adaptive potential, and a link to lichen symbioses", **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 390, 2012. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00390.

GUGNANI, H. C., OKEKE, C. N. "Physiological Characteristics of Environmental Isolates of Pathogenic Dematiaceous Fungi", **Mycoses**, v. 32, n. 2, p. 78–83, 1 fev. 1989. DOI: 10.1111/j.1439-0507.1989.tb02206.x.

GUNDE-CIMERMAN, N., RAMOS, J., PLEMENITAŠ, A. "Halotolerant and halophilic fungi", **Mycological Research**, v. 113, n. 11, p. 1231–1241, 1 nov. 2009. DOI: 10.1016/j.mycres.2009.09.002.

GUNDE-CIMERMAN, N., ZALAR, P., DE HOOG, S., *et al.* "Hypersaline waters in salterns – natural ecological niches for halophilic black yeasts", **FEMS Microbiology Ecology**, v. 32, n. 3, p. 235–240, 1 jun. 2000. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2000.tb00716.x.

HATTA, J., ANZAWA, K., KUBOTA, K., *et al.* "A Case of Recalcitrant Phaeohyphomycosis of the Face Caused by *Exophiala lecanii-corni*", **Medical Mycology Journal**, v. 62, n. 2, p. 35–39, 2021.

HILL, H. Z. "The function of melanin or six blind people examine an elephant", **BioEssays**, v. 14, n. 1, p. 49–56, 1 jan. 1992. DOI: 10.1002/bies.950140111.

HOHMANN STEFAN. "Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts", **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 2, p. 300–372, 1 jun. 2002. DOI: 10.1128/MMBR.66.2.300-372.2002.

HUNG CHIUNG-YU, YU JIEH-JUEN, SESHAN KALPATHI R., *et al.* "A Parasitic Phase-Specific Adhesin of *Coccidioides immitis* Contributes to the Virulence of This Respiratory Fungal Pathogen", **Infection and Immunity**, v. 70, n. 7, p. 3443–3456, 1 jul. 2002. DOI: 10.1128/IAI.70.7.3443-3456.2002.

ISA-ISA, R., GARCÍA, C., ISA, M., *et al.* "Subcutaneous phaeohyphomycosis (mycotic cyst)", **Subcutaneous Mycoses**, v. 30, n. 4, p. 425–431, 1 jul. 2012. DOI: 10.1016/j.clinidermatol.2011.09.015.

IWATSU, T., MIYAJI, M., OKAMOTO, S. "Isolation of *Phialophora verrucosa* and *Fonsecaea pedrosoi* from nature in Japan", **Mycopathologia**, 1981.

JENNINGS, D. H., BURKE, R. M. "Compatible solutes – the mycological dimension and their role as physiological buffering agents", **New Phytologist**, v. 116, n. 2, p. 277–283, 1 out. 1990. DOI: 10.1111/j.1469-8137.1990.tb04715.x.

KEATH E J, PAINTER A A, KOBAYASHI G S, *et al.* "Variable expression of a yeast-phase-specific gene in *Histoplasma capsulatum* strains differing in thermotolerance and virulence", **Infection and Immunity**, v. 57, n. 5, p. 1384–1390, 1 maio 1989. DOI: 10.1128/iai.57.5.1384-1390.1989.

KEJŽAR, A., GOBEC, S., PLEMENITAŠ, A., *et al.* "Melanin is crucial for growth of the black yeast *Hortaea werneckii* in its natural hypersaline environment", **Fungal Biology**, v. 117, n. 5, p. 368–379, 1 maio 2013. DOI: 10.1016/j.funbio.2013.03.006.

KIRCHHOFF, L., OLSOWSKI, M., RATH, P.-M., *et al.* "*Exophiala dermatitidis*: Key issues of an opportunistic fungal pathogen", **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 984–998, dez. 2019. DOI: 10.1080/21505594.2019.1596504.

KOGEJ, T., WHEELER, M. H., LANIŠNIK RIŽNER, T., *et al.* "Evidence for 1,8-dihydroxynaphthalene melanin in three halophilic black yeasts grown under saline and non-saline conditions", **FEMS Microbiology Letters**, v. 232, n. 2, p. 203–209, 1 mar. 2004. DOI: 10.1016/S0378-1097(04)00073-4.

LANDRY, K. S., LEVIN, R. E. "Characterization of a Recently Purified Thermophilic DNase from a Novel Thermophilic Fungus", **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, n. 7, p. 1587–1596, 1 ago. 2014. DOI: 10.1007/s12010-014-0907-1.

LANGFELDER, K., STREIBEL, M., JAHN, B., *et al.* "Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi", **Fungal Genetics and Biology**, v. 38, n. 2, p. 143–158, 1 mar. 2003. DOI: 10.1016/S1087-1845(02)00526-1.

LARSSON, B. S. "Interaction Between Chemicals and Melanin", **Pigment Cell Research**, v. 6, n. 3, p. 127–133, 1 jun. 1993. DOI: 10.1111/j.1600-0749.1993.tb00591.x.

LASKOWSKI, M. "DNases and their use in the studies of primary structure of nucleic acids", **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol**, v. 29, p. 165–220, 1967. DOI: 10.1002/9780470122747.ch4.

LÓPEZ MARTÍNEZ, R., MÉNDEZ TOVAR, L. J. "Chromoblastomycosis", **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 188–194, 1 mar. 2007. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2006.05.007.

MATSUMOTO, T., AJELLO, L., MATSUDA, T., *et al.* "Developments in hyalohyphomycosis and phaeohyphomycosis", **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 32, n. Supplement_1, p. 329–349, 1 dez. 1994. DOI: 10.1080/02681219480000951.

MATSUMOTO, T., PADHYE, A. A., AJELLO, L. "Medical significance of the so-called black yeasts", **European Journal of Epidemiology**, v. 3, n. 2, p. 87–95, 1 jun. 1987. DOI: 10.1007/BF00239744.

MCGRAW, K. J. "The antioxidant function of many animal pigments: are there consistent health benefits of sexually selected colourants?", **Animal Behaviour**, v. 69, n. 4, p. 757–764, 1 abr. 2005. DOI: 10.1016/j.anbehav.2004.06.022.

MEREDITH, P., SARNA, T. "The physical and chemical properties of eumelanin", **Pigment Cell Res**, v. 19, n. 6, p. 572–594, dez. 2006. DOI: 10.1111/j.1600-0749.2006.00345.x.

MIRBOD, F., SCHALLER, R. A., COLE, G. T. "Purification and characterization of urease isolated from the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*", **Medical Mycology**, v. 40, n. 1, p. 35–44, 1 jan. 2002. DOI: 10.1080/mmy.40.1.35.44.

MIRBOD-DONOVAN, F., SCHALLER, R., HUNG, C.-Y., *et al.* "Urease Produced by *Coccidioides posadasii* Contributes to the Virulence of This Respiratory Pathogen", **Infection and Immunity**, v. 74, n. 1, p. 504, 1 jan. 2006. DOI: 10.1128/IAI.74.1.504-515.2006.

MOBLEY, H. L., ISLAND, M. D., HAUSINGER, R. P. "Molecular biology of microbial ureases.", **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 451, 1 set. 1995.

MONTOYA, A. M., MONTESINO, C. A., CARRIÓN-ÁLVAREZ, D., *et al.* "A comparative study of extracellular enzymes from chromoblastomycosis agents reveals the potential association of phospholipase with the severity of the lesions", **Microbial Pathogenesis**, v. 147, p. 104367, 1 out. 2020. DOI: 10.1016/j.micpath.2020.104367.

MUDRYK, Z., PODGORSKA, B. "Culturable microorganisms in sandy beaches in south Baltic Sea", **Polish Journal of Ecology**, v. 55, n. 2, p. 221–231, 2007.

NEMECEK, J. C., WÜTHRICH, M., KLEIN, B. S. "Global Control of Dimorphism and Virulence in Fungi", **Science**, v. 312, n. 5773, p. 583, 28 abr. 2006. DOI: 10.1126/science.1124105.

NOSANCHUK, J. D., CASADEVALL, A. "The contribution of melanin to microbial pathogenesis", **Cellular Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 203–223, 1 abr. 2003. DOI: 10.1046/j.1462-5814.2003.00268.x.

ODOM, A., MUIR, S., LIM, E., *et al.* "Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*", **The EMBO Journal**, v. 16, n. 10, p. 2576–2589, 15 maio 1997. DOI: 10.1093/emboj/16.10.2576.

OLSZEWSKI, M. A., NOVERR, M. C., CHEN, G.-H., *et al.* "Urease Expression by *Cryptococcus neoformans* Promotes Microvascular Sequestration, Thereby Enhancing Central Nervous System Invasion", **The American Journal of Pathology**, v. 164, n. 5, p. 1761–1771, 1 maio 2004. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63734-0. .

OSTERHOLZER, J. J., SURANA, R., MILAM, J. E., *et al.* "Cryptococcal Urease Promotes the Accumulation of Immature Dendritic Cells and a Non-Protective T2 Immune Response within the Lung", **The American Journal of Pathology**, v. 174, n. 3, p. 932–943, 1 mar. 2009. DOI: 10.2353/ajpath.2009.080673.

PAOLO, W. F., DADACHOVA, E., MANDAL, P., *et al.* "Effects of disrupting the polyketide synthase gene WdPKS1 in *Wangiella [Exophiala]* dermatitidis on melanin production and resistance to killing by antifungal compounds, enzymatic degradation, and extremes in temperature", **BMC Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 55, 19 jun. 2006. DOI: 10.1186/1471-2180-6-55.

PEDERSEN, O. A., LANGVAD, F. "*Exophiala psychrophila* sp. nov., a pathogenic species of the black yeasts isolated from farmed Atlantic salmon", **Mycological Research**, v. 92, n. 2, p. 153–156, 1 mar. 1989. DOI: 10.1016/S0953-7562(89)80004-8.

PERFECT, J. R. "*Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot", **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 4, p. 463–468, 1 jun. 2006. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2006.00051.x.

POYNTNER, C., MIRASTSCHUJSKI, U., STERFLINGER, K., *et al.* "Transcriptome Study of an *Exophiala dermatitidis* PKS1 Mutant on an ex Vivo Skin Model: Is Melanin Important for Infection?", **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1457, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01457.

QUEIROZ-TELLES, F., DE HOOG, S., SANTOS, D. W. C. L., *et al.* "Chromoblastomycosis", **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 1, p. 233, 1 jan. 2017. DOI: 10.1128/CMR.00032-16.

REHNSTROM, A. L., FREE, S. J. "The isolation and characterization of melanin-deficient mutants of *Monilinia fructicola*", **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 49, n. 5, p. 321–330, 1 nov. 1996. DOI: 10.1006/pmpp.1996.0057.

REVANKAR, S. G., SUTTON, D. A. "Melanized Fungi in Human Disease", **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 4, p. 884, 1 out. 2010. DOI: 10.1128/CMR.00019-10.

ROBERT, V. A., CASADEVALL, A. "Vertebrate Endothermy Restricts Most Fungi as Potential Pathogens", **The Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 10, p. 1623–1626, 15 nov. 2009. DOI: 10.1086/644642.

ROBERT, V., CARDINALI, G., CASADEVALL, A. "Distribution and impact of yeast thermal tolerance permissive for mammalian infection", **BMC Biology**, v. 13, n. 1, p. 18, 26 fev. 2015. DOI: 10.1186/s12915-015-0127-3.

ROCHA, R. R. N., DE SOUZA, L. I., DA SILVA, K. P. "A histórica territorialização da Ilha Grande de Santa Isabel/PI e Praia da Pedra do Sal/PI", **VII Seminário Internacional Dinâmica Territorial e Desenvolvimento socioambiental**, v. 26, 2015.

ROMÃO, D., SABINO, R., VERÍSSIMO, C., *et al.* "Children and Sand Play: Screening of Potential Harmful Microorganisms in Sandboxes, Parks, and Beaches", **Current Fungal Infection Reports**, v. 9, n. 3, p. 155–163, 1 set. 2015. DOI: 10.1007/s12281-015-0230-5.

RONNE-ENGSTRÖM, E., CESARINI, K. G., ENBLAD, P., *et al.* "Intracerebral microdialysis in neurointensive care: the use of urea as an endogenous reference compound", **Journal of Neurosurgery**, v. 94, n. 3, p. 397–402, 1 jan. 2001. DOI: 10.3171/jns.2001.94.3.0397. .

ROSAS, Á. L., CASADEVALL, A. "Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold", **FEMS Microbiology Letters**, v. 153, n. 2, p. 265–272, 1 ago. 1997. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1997.tb12584.x.

ROZENTAL, S., ALVIANO, C. S., DE SOUZA, W. "The in vitro susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* to activated macrophages", **Mycopathologia**, v. 126, n. 2, p. 85–91, 1 maio 1994. DOI: 10.1007/BF01146200.

RUTHERFORD, J. C. "The Emerging Role of Urease as a General Microbial Virulence Factor", **PLOS Pathogens**, v. 10, n. 5, p. e1004062, 15 maio 2014. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004062.

SABBAGA, E., TEDESCO-MARCHESI, L. M., LACAZ, C. S., *et al.* "Feo-hifomicose subcutânea por *Exophiala jeanselmei*: registro de casos em transplantados renais", **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 36, p. 175–183, 1994.

SABINO, R., VERÍSSIMO, C., CUNHA, M. A., *et al.* "Pathogenic fungi: An unacknowledged risk at coastal resorts? New insights on microbiological sand quality in Portugal", **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 7, p. 1506–1511, 1 jul. 2011. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2011.04.008.

SÁNCHEZ, M., COLOM, F. "Extracellular DNase activity of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*", **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 27, n. 1, p. 10–13, 1 jan. 2010. DOI: 10.1016/j.riam.2009.11.004.

SAV, H., OZAKKAS, F., ALTINBAS, R., *et al.* "Virulence markers of opportunistic black yeast in *Exophiala*", **Mycoses**, v. 59, n. 6, p. 343–350, 1 jun. 2016. DOI: 10.1111/myc.12478.

SEBGHATI, T. S., ENGLE, J. T., GOLDMAN, W. E. "Intracellular Parasitism by *Histoplasma capsulatum*: Fungal Virulence and Calcium Dependence", **Science**, v. 290, n. 5495, p. 1368, 17 nov. 2000. DOI: 10.1126/science.290.5495.1368.

SEELIGER, H. P. "Use of a urease test for the screening and identification of cryptococci", **Journal of bacteriology**, v. 72, n. 2, p. 127–131, ago. 1956. DOI: 10.1128/JB.72.2.127-131.1956.

SEYEDMOUSAVI, S., BADALI, H., CHLEBICKI, A., *et al.* "Exophiala sideris, a novel black yeast isolated from environments polluted with toxic alkyl benzenes and arsenic", **Black Fungi**, v. 115, n. 10, p. 1030–1037, 1 out. 2011. DOI: 10.1016/j.funbio.2011.06.004.

SEYEDMOUSAVI, S., NETEA, M. G., MOUTON, J. W., *et al.* "Black Yeasts and Their Filamentous Relatives: Principles of Pathogenesis and Host Defense", **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3, p. 527, 1 jul. 2014. DOI: 10.1128/CMR.00093-13.

SOUSA, T. M. R. R. de. "Análise microbiológica e físico-química das águas da praia de Atalaia na cidade de Luís Correia-PI", 2017.

SOUZA, T. F. de, SCROFERNEKER, M. L., COSTA, J. M. da, *et al.* "Secretion of five extracellular enzymes by strains of chromoblastomycosis agents", **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, p. 269–272, 2008.

STERFLINGER, K., "Black Yeasts and Meristematic Fungi: Ecology, Diversity and Identification". In: PÉTER, G., ROSA, C. (Org.), **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**, Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 2006. p. 501–514. DOI: 10.1007/3-540-30985-3_20. Disponível em: https://doi.org/10.1007/3-540-30985-3_20.

STERFLINGER, K., KRUMBEIN, W. E. "Multiple Stress Factors affecting Growth of Rock-inhabiting Black Fungi", **Botanica Acta**, v. 108, n. 6, p. 490–496, 1 dez. 1995. DOI: 10.1111/j.1438-8677.1995.tb00526.x.

SUDHADHAM, M., PRAKITSIN, S., SIVICHAI, S., *et al.* "The neurotropic black yeast Exophiala dermatitidis has a possible origin in the tropical rain forest", **Black fungal extremes**, v. 61, p. 145–155, 1 jan. 2008. DOI: 10.3114/sim.2008.61.15.

SUMBY, P., BARBIAN, K. D., GARDNER, D. J., *et al.* "Extracellular deoxyribonuclease made by group A *Streptococcus* assists pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response", **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 5, p. 1679, 1 fev. 2005. DOI: 10.1073/pnas.0406641102.

SUMNER, J. B., "The Isolation and Crystallization of the Enzyme Urease. Preliminary Paper". In: LEICESTER, H. M. (Org.), [S.l.], Harvard University Press, 2013. p. 322–327. DOI: 10.4159/harvard.9780674366701.c115. Disponível em: <https://doi.org/10.4159/harvard.9780674366701.c115>.

SUN, J., ZHANG, J., NAJAFZADEH, M. J., *et al.* "Melanization of a Meristematic Mutant of *Fonsecaea monophora* Increases Tolerance to Stress Factors While no Effects on Antifungal Susceptibility", **Mycopathologia**, v. 172, n. 5, p. 373, 26 jun. 2011. DOI: 10.1007/s11046-011-9439-1.

TAYLOR, B. E., WHEELER, M. H., SZANISZLO, P. J. "Evidence for Pentaketide Melanin Biosynthesis in Dematiaceous Human Pathogenic Fungi", **Mycologia**, v. 79, n. 2, p. 320–322, 1987. DOI: 10.2307/3807665.

TEIXEIRA, M. M., MORENO, L. F., STIELOW, B. J., *et al.* "Exploring the genomic diversity of black yeasts and relatives (Chaetothyriales, Ascomycota)", **Studies in Mycology**, v. 86, p. 1–28, 1 mar. 2017. DOI: 10.1016/j.simyco.2017.01.001.

THAMMAYYA, A., SANYAL, M. "*Exophiala jeanselmei* causing mycetoma pedis in India", **Sabouraudia**, v. 18, n. 2, p. 91–95, 1 maio 1980. DOI: 10.1080/00362178085380161.

TSAI, H.-F., FUJII, I., WATANABE, A., *et al.* "Pentaketide Melanin Biosynthesis in *Aspergillus fumigatus* Requires Chain-length Shortening of a Heptaketide Precursor *", **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 31, p. 29292–29298, 1 ago. 2001. DOI: 10.1074/jbc.M101998200.

TURIANSKY, G. W., BENSON, P. M., SPERLING, L. C., *et al.* "*Phialophora verrucosa*: A new cause of mycetoma", **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 32, n. 2, Part 2, p. 311–315, 1 fev. 1995. DOI: 10.1016/0190-9622(95)90393-3.

VICENTE, V. A., ATTILI-ANGELIS, D., PIE, M. R., *et al.* "Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection", **Black fungal extremes**, v. 61, p. 137–144, 1 jan. 2008. DOI: 10.3114/sim.2008.61.14.

VICENTE, V. A., NAJAFZADEH, M. J., SUN, J., *et al.* "Environmental siblings of black agents of human chromoblastomycosis", **Fungal Diversity**, v. 65, n. 1, p. 47–63, 1 mar. 2014. DOI: 10.1007/s13225-013-0246-5.

VOGEL, C., ROGERSON, A., SCHATZ, S., *et al.* "Prevalence of yeasts in beach sand at three bathing beaches in South Florida", **Water Research**, v. 41, n. 9, p. 1915–1920, 1 maio 2007. DOI: 10.1016/j.watres.2007.02.010.

WANG Y, CASADEVALL A. "Growth of *Cryptococcus neoformans* in presence of L-dopa decreases its susceptibility to amphotericin B", **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 11, p. 2648–2650, 1 nov. 1994. DOI: 10.1128/AAC.38.11.2648.

WANG Y, CASADEVALL A. "Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to the melanin-binding compounds trifluoperazine and chloroquine", **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 3, p. 541–545, 1 mar. 1996. DOI: 10.1128/AAC.40.3.541.

WAUGH, M. S., NICHOLS, C. B., DECESARE, C. M., *et al.* "Ras1 and Ras2 contribute shared and unique roles in physiology and virulence of *Cryptococcus neoformans* The GenBank accession number for the RAS2 sequence of *C. neoformans* H99 is AF294349.", **Microbiology**, v. 148, n. 1, p. 191–201, 2002.

WEISKERGER, C. J., BRANDÃO, J. "Fungal contaminants in water and sand: A new frontier for quantitative microbial risk assessment", **Occupational safety and health: Emerging Microbial Contaminants and Human Health effects**, v. 16, p. 73–81, 1 ago. 2020. DOI: 10.1016/j.coesh.2020.03.001.

WERLINGER, K. D., YEN MOORE, A. "Eumycotic mycetoma caused by *Cladophialophora bantiana* in a patient with systemic lupus erythematosus", **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 52, n. 5, Supplement, p. S114–S117, 1 maio 2005. DOI: 10.1016/j.jaad.2004.12.023.

WEST BATANGHARI, J., DEEPE, J., GEORGE S., DI CERA, E., *et al.* "Histoplasma acquisition of calcium and expression of CBP1 during intracellular parasitism", **Molecular Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 531–539, 1 fev. 1998. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1998.00697.x.

WHEELER, M. H. "Comparisons of fungal melanin biosynthesis in ascomycetous, imperfect and basidiomycetous fungi", **Transactions of the British Mycological Society**, v. 81, n. 1, p. 29–36, 1 ago. 1983. DOI: 10.1016/S0007-1536(83)80200-9.

YEE, T. L., TAJUDDIN, R., MOHAMED NOR, N. M. I., *et al.* "Filamentous ascomycete and basidiomycete fungi from beach sand", **Rendiconti Lincei**, v. 27, n. 4, p. 603–607, 1 dez. 2016. DOI: 10.1007/s12210-016-0535-5.

ZALAR, P., DE HOOG, G. S., SCHROERS, H.-J., *et al.* "Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments", **The genus and similar dematiaceous hyphomycetes**, v. 58, p. 157–183, 1 jan. 2007. DOI: 10.3114/sim.2007.58.06.

ZALAR, Polona, GUNDE-CIMERMAN, N., "Cold-Adapted Yeasts in Arctic Habitats". In: BUZZINI, P., MARGESIN, R. (Org.), **Cold-adapted Yeasts: Biodiversity, Adaptation Strategies and Biotechnological Significance**, Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 2014. p. 49–74. DOI: 10.1007/978-3-642-39681-6_3. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-642-39681-6_3.

ZHANG, X., ZHAO, S., SUN, L., *et al.* "Different virulence of *Candida albicans* is attributed to the ability of escape from neutrophil extracellular traps by secretion of DNase", **American journal of translational research**, v. 9, n. 1, p. 50–62, 15 jan. 2017.

ZHAO, J. "Isolation and Identification of Black Yeasts by Enrichment on Atmospheres of Monoaromatic Hydrocarbons", **Microbial ecology**, v. v. 60, n. 1, p. 149–156, jul. 2010. DOI: 10.1007/s00248-010-9651-4.

ZUPANČIČ, J., NOVAK BABIČ, M., ZALAR, P., *et al.* "The Black Yeast *Exophiala dermatitidis* and Other Selected Opportunistic Human Fungal Pathogens Spread from Dishwashers to Kitchens", **PLOS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0148166, 11 fev. 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0148166.