

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane

INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE/ FIOCRUZ
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE, SOCIEDADE
E ENDÊMIAS NA AMAZÔNIA

ESTUDO DE FUNGOS MELANIZADOS EM AMOSTRAS
AMBIENTAIS DE ÁREAS RURAIS DO AMAZONAS E
AVALIAÇÃO DA SUA RELAÇÃO COM OS FUNGOS
MELANIZADOS CAUSADORES DE MICOSES

MARLA JALENE ALVES

MANAUS - AM

2015

INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE/ FIOCRUZ
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE, SOCIEDADE
E ENDÊMIAS NA AMAZÔNIA

MARLA JALENE ALVES

ESTUDO DE FUNGOS MELANIZADOS EM AMOSTRAS
AMBIENTAIS DE ÁREAS RURAIS DO AMAZONAS E
AVALIAÇÃO DA SUA RELAÇÃO COM OS FUNGOS
MELANIZADOS CAUSADORES DE MICOSES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na
Amazônia como parte das exigências do
Programa para a obtenção do título de Mestre.
Linha de pesquisa: Biologia de Agentes
Infecciosos e Parasitários

Orientadora: Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura

MANAUS - AM

2015

Ficha Catalográfica

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

A474e Alves, Marla Jalene
Estudo de fungos melanizados em amostras ambientais de áreas rurais do Amazonas e avaliação da sua relação com os fungos melanizados causadores de micoses / Marla Jalene Alves. 2015
102 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura
Dissertação (Mestrado em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Fungos melanizados. 2. amostras ambientais. 3. fontes de infecção. 4. Amazonas. I. Matsuura, Dra. Ani Beatriz Jackisch II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

MARLA JALENE ALVES

ESTUDO DE FUNGOS MELANIZADOS EM AMOSTRAS
AMBIENTAIS DE ÁREAS RURAIS DO AMAZONAS E
AVALIAÇÃO DA SUA RELAÇÃO COM OS FUNGOS
MELANIZADOS CAUSADORES DE MICOSES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia como parte das exigências do Programa para a obtenção do título de Mestre.
Linha de pesquisa: Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários

Aprovada em 29 de outubro de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura (Orientadora)
Instituto Leônidas e Maria Deane/FIOCRUZ Amazônia

Dra. Ormenzinda Celeste Cristo Fernandes (Membro)
Instituto Leônidas e Maria Deane/FIOCRUZ Amazônia

Dr. João Vicente Braga de Souza (Membro)
Instituto Nacional de pesquisas da Amazônia

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que guiou minha jornada e me manteve forte para alcançar meus objetivos.

Ao ILMD/FIOCRUZ AMAZÔNIA e a CAPES por todo o auxílio físico e financeiro, fundamentais para o cumprimento deste projeto.

A Minha família, em especial minha mãe, pela compreensão durante minha ausência, pela força e pelo apoio.

Ao Ricardo Alexandre, por toda a ajuda, companheirismo e incentivo desde as provas para seleção do Mestrado até o cumprimento deste.

A Dr^a. Ani Beatriz Jackisch Matsuura, pela compreensão, pela orientação e confiança.

A Dr^a Zeli Frota, a MsC Katia Cruz, ao Dr. Mauricio Ogusko e Dr. João Vicente pela disponibilidade de uso dos isolados clínicos.

A Prof^a Dr^a. Karen Regina Carim da Costa pela orientação do estágio de docência.

As minhas colegas e parceiras de laboratório Rosi, Jusse, Vivian, Gleica e Duda por toda a ajuda.

A todos os amigos queridos que conquistei no ILMD e companhia em todas as horas, fossem elas boas ou ruins, especialmente Uziel, Kenny, Rosi, Jusse, Vivian, Debora, Dana, Val, Vani, Marcelo e Sebastião.

Ao Msc. Victor Souza e ao Dr. Felipe Gomes Naveca pela ajuda e disposição durante as etapas de Biologia Molecular.

Aos funcionários e técnicos da Fiocruz Amazonas, em especial os do laboratório.

RESUMO

Os fungos melanizados estão amplamente distribuídos no ambiente e têm sido comumente relacionados à doenças em seres humanos tais como a Cromoblastomicose, a Feomicose e o Eumicetoma, porém na região Amazônica, que possui clima favorável para a proliferação de microrganismos, há raros estudos realizados sobre estes fungos e pouco se sabe a respeito da sua distribuição neste ambiente e do seu potencial patogênico. Desta forma, na presente pesquisa foram estudados fungos melanizados em amostras ambientais de áreas rurais do Amazonas e a relação desses isolados ambientais com os fungos melanizados causadores de micoses. As amostras ambientais foram obtidas em áreas rurais dos municípios de Iranduba e Presidente Figueiredo, no Amazonas (AM). Também entraram no estudo amostras clínicas depositadas em Coleções Fúngicas do AM. Foram coletadas 213 amostras de diferentes substratos ambientais: solo, partes de plantas vivas, material vegetal em decomposição e água de consumo humano. Dessas amostras, 58 isolados foram submetidos a identificação por sequenciamento da região ITS, 7 espécies de fungos melanizados que foram identificados já foram citadas na literatura como agentes etiológicos de micoses em humanos: *Cladophialophora immunda*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Exophiala oligosperma*, *Exophiala jeanselmei*, *Hortaea werneckii* e *Curvularia lunata*. A maioria dos isolados foi obtida de espinhos. Alguns destes isolados apresentaram crescimento à temperatura de 37°C. A identificação molecular dos isolados clínicos mostrou similaridade com *Fonsecaea pedrosoi*, *Cladosporium sphaerospermum* e *Knufia epidermidis*. Dessas espécies clínicas somente a espécie *C. sphaerospermum* foi isolada do ambiente. Este trabalho evidencia que os substratos ambientais estudados são fontes potenciais de infecção de fungos melanizados que podem vir a causar micoses.

Palavras-chave: Fungos melanizados, amostras ambientais, fontes de infecção, Amazonas.

ABSTRACT

The melanized fungi are widely distributed in the environment and has been commonly related in human diseases such as Chromoblastomycosis, Phaeomycosis and Eumycetoma, but in the Amazon region, which have a favorable weather for the proliferation of microorganisms, there are few studies about these fungi and little is known about their distribution in this environment and its pathogenic potential. Thus, in this study were studied melanized fungi in environmental samples from rural areas of the Amazon and the relationship of these environmental isolates with melanized fungi that cause mycoses. Environmental samples were obtained in rural areas of Iranduba and Presidente Figueiredo – Amazonas (Brazil). Also entered in the study, clinical specimens deposited in Fungal Collections from Amazonas. Two hundred thirteen samples of various environmental substrates were collected: soil, parts of living plants, decaying plant material and drinking water. Of these samples, 45 isolates were subjected to identification by sequencing the ITS region, 7 species of melanized fungi that were identified have been described in the literature as etiological agents of mycoses in humans: *Cladophialophora immunda*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Exophiala oligosperma*, *Exophiala jeanselmei*, *Hortaea werneckii* and *Curvularia lunata*. Most isolates were obtained from thorns. Some isolates grown at 37°C temperature. The molecular identification of clinical isolates showed similarity with *Fonsecaea pedrosoi*, *Cladosporium sphaerospermum* and *Knufia epidermidis*. Of these clinical specimens, only the species *C. sphaerospermum* was isolated from the environment. This study shows that the studied environmental substrates are potential sources of infection of melanized fungi that may cause mycoses.

Keywords: Melanized fungi, environmental samples, sources of infection, Amazonas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Substratos ambientais coletados para o estudo de fungos melanizados.....	37
Figura 02: Comunidade de São Sebastião da Serra Baixa.....	38
Figura 03: Comunidade do Lago do Limão.....	39
Figura 04: Placas com crescimento fúngico em Ágar Mycosel após processamento das amostras ambientais.....	46
Figura 05: Colônias em meio de cultura.....	54
Figura 06: Micromorfologia dos isolados.....	54
Figura 07: Gel de Agarose dos isolados clínicos provenientes da FUAM.....	56
Figura 08: Gel de Agarose dos isolados clínicos provenientes da FMT-HVD e isolados ambientais.....	56
Figura 09: Gel de Agarose dos isolados ambientais.....	56
Figura 10: Teste de termotolerância para <i>Hortaea werneckii</i> (A1)	67
Figura 11: Árvore filogenética dos fungos melanizados ambientais e clínicos a partir do Espaço Transcrito Interno (ITS).....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Substratos coletados e respectivos fungos isolados.....	47
--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 01: Substratos coletados, total de amostras analisadas e número de amostras positivas para fungos melanizados.....	45
Quadro 02: Isolados clínicos provenientes de Coleções Micológicas do Amazonas.....	55
Quadro 03: Fungos melanizados ambientais e clínicos identificados em nível de espécie por sequenciamento da região ITS.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

AM – Amazonas

ASD – Ágar Sabouraud Dextrose

BDA – Ágar Batata Dextrose

CBM - Cromoblastomicose

CBS - Centraalbureau voor Schimmelcultures

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CNS - Conselho Nacional de Saúde

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DNAr - DNA ribossomal

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra- acético

et al. - e colaboradores

FMT-HVD – Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado

FUAM - Fundação Alfredo da Matta

g - Gramas

ILMD/FIOCRUZ - Instituto Leônidas e Maria Deane – Fiocruz Amazônia

INPA - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

MEA - Ágar Extrato de Malte

min - Minuto

ml - Mililitro

MOPS - ácido Morfolinopropanosulfônico

NaCl - Cloreto de Sódio

NCBI - Centro Nacional de Informações Biotecnológicas

ng - Nanograma

ITS - Região Espaçadora Interna Transcrita

PCR - Reação de Cadeia da Polimerase

RPM - Rotações por minuto

SNC - Sistema Nervoso Central

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UFAM - Universidade Federal do Amazonas

UV - Ultravioleta

µg - Micrograma

µl - Microlitro

LISTA DE SÍMBOLOS

cm^2 - Centímetros cuadrados

$^{\circ}\text{C}$ - Graus *Celsius*

% - Por cento

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO.....	17
2.1 FUNGOS MELANIZADOS E SUA IMPORTÂNCIA CLÍNICA	17
2.1.1 Micetoma.....	21
2.1.2 Feomicose.....	22
2.1.3 Cromoblastomicose.....	25
2.2 FUNGOS MELANIZADOS EM FONTES AMBIENTAIS.....	28
2.3 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS MELANIZADOS DE INTERESSE CLÍNICO	30
2.4 USO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS MELANIZADOS.....	33
2.5 CRESCIMENTO FÚNGICO EM DIFERENTES TEMPERATURAS	34
3. OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
4. METODOLOGIA	37
4.1 MODELO DE ESTUDO.....	37
4.2 UNIVERSO DE ESTUDO.....	37
4.2.1 Local de estudo e coleta de amostras	37
4.3 PROCEDIMENTOS	39
4.3.1 Isolamento dos fungos.....	39
4.3.2 Identificação morfológica dos fungos isolados.....	40
4.3.3 Identificação molecular dos isolados	41
4.3.3.1 Cultura monospórica.....	41
4.3.3.2 Extração de DNA.....	41
4.3.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase	42
4.3.3.4 Reação de Sequenciamento	42
4.3.4 Análise do crescimento a 37°C e 40°C	43
4.4 ANÁLISE DOS RESULTADOS OBTIDOS E CORRELAÇÃO ENTRE OS ACHADOS AMBIENTAIS E CLÍNICOS	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1 ISOLAMENTO DE FUNGOS MELANIZADOS DE AMOSTRAS AMBIENTAIS 45	
5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS MELANIZADOS AMBIENTAIS E DE ORIGEM CLÍNICA.....	53
5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FUNGOS MELANIZADOS QUANTO AO CRESCIMENTO EM TEMPERATURA DE 37 E 40°C.....	66
5.4 FUNGOS MELANIZADOS AMBIENTAIS X FUNGOS MELANIZADOS CLÍNICOS	69
6. CONCLUSÃO	76

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
ANEXO I.....	91
ANEXO II.....	94
ANEXO III.....	99
ANEXO IV	101

1. INTRODUÇÃO

Os fungos melanizados pertencem a um grupo heterogêneo de fungos que possuem pigmentação escura pela presença de complexo melanínico em sua parede celular o que constitui um fator de virulência nas espécies patogênicas e os torna extremamente resistentes a condições extremas, inclusive altas temperaturas e radiação ultravioleta (UV) (Badali, 2010; Zolnerkevic, 2011; Najafzadeh et al. 2011). São fungos capazes de se apresentar na forma leveduriforme durante uma parte do seu ciclo de vida, podendo ser chamados de leveduras negras (de Hoog et al. 2000a).

Estes fungos têm distribuição mundial, sendo mais frequentes em regiões de clima tropical e subtropical e são normalmente encontrados na natureza, em solo, em material vegetal morto, plantas em decomposição e em madeira envelhecida (Vicente, 2000; Satow et al. 2008).

A importância clínica desses microrganismos tem aumentado ao longo dos anos, pela constante associação destes com infecções que podem se apresentar de forma cutânea, subcutânea e até sistêmica, causando risco de morte (Horré & de Hoog, 1999; Esterre & Queiroz-Telles, 2006; Revankar, 2007; Revankar, 2012). Mais de 70 gêneros deste grupo têm sido relacionados a doenças, sendo os mais importantes *Fonsecaea*, *Exophiala*, *Cladophialophora*, *Phialophora* e *Rhinocladiella* (Vicente et al. 2001; Afsarian et al. 2012).

A principal porta de entrada ocorre por meio de inoculação traumática do fungo na pele do hospedeiro (Vicente et al. 2008). Entre as infecções mais comuns estão a Feomicose, o Micetoma e a Cromoblastomicose (Espinel-Ingroff et al. 1989; Vicente et al. 2008; Alviano et al. 2004). Estas doenças raramente se apresentam na forma disseminada ou invasiva, mas causam importante impacto na saúde pública por serem de difícil controle e

apresentarem recidivas, necessitando de um diagnóstico eficaz para a eficiência do tratamento (Queiroz-Telles et al. 2011).

Embora haja avanços quanto ao tratamento destas infecções, ainda há poucos estudos sobre a susceptibilidade desses fungos aos antifúngicos utilizados, e o tratamento ideal contra estes microrganismos ainda é desconhecido (Duarte et al. 2013).

Apesar destes fungos serem encontrados no ambiente, seu isolamento a partir de amostras ambientais não é fácil e técnicas clássicas muitas vezes identificam apenas uma limitada variedade de espécies. Além disso, há insuficiência de dados relacionados ao seu habitat natural (Vicente et al. 2001; Satow et al. 2008; Vicente et al. 2008), e à distinção entre homólogos ambientais e agentes causadores de doença (Vicente et al. 2013).

A relação entre os genótipos identificados de isolados ambientais e de isolados clínicos é um dos principais questionamentos para a compreensão deste grupo de fungos, e continua a ser avaliada. A maior parte das espécies já identificadas são anamorfos e acredita-se que o isolamento destas espécies a partir de seu habitat natural é de extrema importância para essa questão (Vicente et al. 2013), pois a evolução adaptativa destes fungos é dirigida pela interação com o ambiente em que se encontra (de Hoog, 2014). Além disso, o isolamento dos fungos melanizados do ambiente pode auxiliar o entendimento das fontes e a rota de infecção destes fungos (Nascimento, 2013).

Por meio de estudos de caracterização molecular por sequenciamento da região espaçadora interna transcrita (ITS) do DNA ribossomal, tornou-se possível a realização de estudos da filogenia e da evolução dos fungos melanizados, além da identificação de novas espécies (Vicente, 2000; Satow et al. 2008; Guerra, 2010; Afsarian et al. 2012).

No Brasil, Vicente et al. (2001) realizaram um estudo para identificar fontes de infecção de fungos melanizados no estado do Paraná, que é uma região endêmica para Cromoblastomicose e, compararam as amostras ambientais com cepas clínicas fazendo

sequenciamento da região ITS. Outras regiões são consideradas endêmicas para algumas espécies de fungos melanizados no Brasil, inclusive a região Amazônica (Bona et al. 2010; Correia et al. 2010). Mas, para Manaus (Amazonas) os relatos científicos são raros. Entre os poucos estudos existentes está o de Parente et al. (2009) que isolaram *Exophiala jeanselmei* e *Cladophialophora carrionii* de pacientes imunocomprometidos com Feomicose subcutânea. Assim, no estado do Amazonas, cujo clima é favorável ao desenvolvimento desses microrganismos patogênicos faz-se necessária a busca por maiores informações a respeito destes fungos, possibilitando visar sua distribuição no ambiente, compreender seu comportamento e importância clínica.

2. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

2.1 FUNGOS MELANIZADOS E SUA IMPORTÂNCIA CLÍNICA

Os fungos melanizados são um complexo grupo fúngico com vasta distribuição no ambiente e que podem ocasionalmente (algumas espécies) causar infecções em seres humanos (Vicente, 2000; Burjack, 2010). Este grupo tem como diferenciais a coloração escura, pela presença de melanina (dihidroxi-naftaleno), pigmento oriundo da oxidação de compostos fenólicos, realizada pelas enzimas fenoloxidasas, em sua parede celular (Dixon & Polak-Wyss, 1991; Zolnerkevic, 2011; Najafzadeh et al. 2011) e o crescimento sob condições ambientais extremas (Vicente, 2000; Vicente et al. 2001; Zolnerkevic, 2011).

A parede celular permite o contato da célula fúngica com o meio externo e a protege contra o stress ambiental, com tolerância reforçada pela presença de melanina (Pinto, Barreto-Bergter & Taborda, 2008). Desta forma, alguns fungos melanizados são extremamente resistentes e crescem em locais onde nenhum outro microrganismo consegue sobreviver, locais com pouca disponibilidade de nutrientes, com elevadas temperaturas, radiação UV, stress osmótico, presença de compostos aromáticos, em locais com repetidos ciclos de congelamento e descongelamento (Vicente, 2000; Zolnerkevic, 2011). Assim, estes microrganismos podem crescer em ambientes com baixas tensões de oxigênio, tendo maior habilidade competitiva frente a fungos hialinos esporulantes (Vicente, 2000).

Kejžar et al. (2013) estudaram os efeitos de inibidores da biossíntese de melanina para mensurar a importância da melanina para o crescimento da levedura negra *Hortaea werneckii* em ambiente com elevada concentração de NaCl (Cloreto de Sódio), mostrando que inibidores mais potentes (ex: triciclazol) restringiam o crescimento da levedura e que a melanina presente em sua parede celular minimiza a perda de glicerol neste ambiente,

especulando-se que a ausência de melanina perturba a integridade da parede celular do fungo afetando sua divisão celular e deixando-o exposto aos efeitos nocivos da hipersalinidade.

Além disso, o complexo melanínico é um significativo fator de virulência desses fungos (Vicente et al. 2008; Badali, 2010), pois os protegem contra a defesa de seus hospedeiros (Langfelder et al. 2003). Na forma parasitária do fungo, no tecido do hospedeiro, a melanina pode agir como um sequestrador de radicais oxidativos do oxigênio e reduzir a fagocitose aumentando a resistência do fungo contra os mecanismos de defesa do hospedeiro e ação das drogas antifúngicas (Rozental, Alviano & Souza, 1994).

Os fungos melanizados são comumente encontrados na natureza em material vegetal em decomposição, madeira, rochas e solo, além de serem frequentemente achados em ambientes artificiais como umidificadores de ar, instalações de banho (de Hoog et al. 2000a; Badali et al. 2008) e interior antisséptico de máquinas de lavar louça (de Hoog et al. 2000a; Badali et al. 2008; Zalar et al. 2011). Como exemplo, a espécie *Exophiala dermatitidis* têm sido frequentemente relacionada às instalações de banho a vapor na Ásia e na Europa (Machouart et al. 2011).

A maioria dos fungos melanizados considerados patogênicos pertencem ao Filo *Ascomycota*, ordem *Chaetothyriales*, família *Herpotrichiellaceae*. Espécies da família *Herpotrichiellaceae* são as únicas, cuja associação com infecções encontra-se claramente definida, porém espécies da família *Dothideaceae* (Vicente et al. 2008; Zolnerkevic, 2011) e *Capnodiaceae* (de Hoog et al. 2014) têm mostrado comportamento oportunista dependente do estado imunológico do hospedeiro (Vicente et al. 2008; Zolnerkevic, 2011).

O termo “leveduras negras” é utilizado, pois estes fungos podem pelo menos durante uma parte de seu ciclo de vida reproduzir-se por crescimento unicelular (de Hoog et al. 2000a). Esta fase de levedura pode ou não ocorrer dependendo do nicho ecológico do fungo,

então o crescimento leveduriforme não é um pré-requisito para a participação neste grupo. Como exemplo, espécies que ocupam ambientes dinâmicos intermitentes como poças de água, desenvolvem-se como levedura e quando as condições mudam e se tornam mais hidrofóbicas, uma fase de hifas pode se formar com conidióforos eretos, com os conídios no alto, longe do substrato para que haja dispersão deste no ar. Já outras espécies que vivem em ambientes não aquosos possuem um talo hidrofóbico em todas as fases do seu ciclo de vida (de Hoog, 1993).

Os fungos melanizados pertencentes à família *Dothideaceae* tem habilidade adaptativa para sobreviver em ambientes hostis, como ambientes com baixa atividade de água e com altas concentrações de sal (de Hoog, 1993), e sua pigmentação depende do seu estágio de desenvolvimento ou da condição ambiental em que se encontra (Haase et al. 1999), porém espécies pertencentes a esta família não estão relacionadas a infecções clínicas (de Hoog, 1993; Nascimento, 2013). Já os fungos melanizados pertencentes à família *Herpotrichiellaceae* apresentam talo regular com pigmentação uniforme (Haase et al. 1999) e são considerados patógenos oportunistas de indivíduos imunossuprimidos (Vicente et al. 2008). Talvez as diferenças quanto a melanização seja uma das razões pelas quais as formas potencialmente patogênicas sejam somente relacionadas à ordem *Chaetothyriales* (Haase et al. 1999).

A família *Herpotrichiellaceae* é formada por organismos, cuja história evolutiva tem sido constantemente relacionada ao parasitismo em hospedeiros vertebrados (de Hoog, 1997). A sobrevivência destes fungos em um habitat hostil, como o hospedeiro humano, é facilitada pela presença da melanina e pela termotolerância à 37°C (Ribeiro et al. 2006). Porém, os mecanismos pelos quais a forma filamentosa saprofítica modifica-se para a fase leveduriforme parasítica ainda não foram totalmente elucidados (Ibrahim-granet, Bievre & Jendoubi, 1988).

A maioria das espécies conhecidas são anamorfos e pouco se sabe a respeito de sua ecologia. Acredita-se que o isolamento de cepas a partir de seu habitat primário é uma das questões-chave para elucidar a evolução deste grupo de fungos (de Hoog et al. 2000b), pois esta predisposição para o crescimento em tecido humano pode ter surgido durante seu período de evolução (Vicente et al. 2013).

Os fungos melanizados têm sido relacionados a infecções da pele, pulmões e do sistema nervoso tanto em indivíduos saudáveis quanto em pacientes com comprometimento imune e a forma de infecção depende de fatores como a quantidade de inóculo, a resistência do hospedeiro e a virulência do fungo (Alviano et al. 2003; Ribeiro et al. 2006). Acredita-se que mais de 150 espécies e 70 gêneros de fungos melanizados podem causar micoses, apresentando-se no tecido lesionado na forma de leveduras, hifas, pseudohifas, ou combinações destas formas (Revankar & Sutton, 2010).

As infecções ocorrem pela inoculação do fungo através de traumatismos diversos, podendo este, permanecer no local lesionado, interiorizar-se causando lesão subcutânea ou se espalhar para os tecidos adjacentes por meio de via hematogênica ou linfática. A forma subcutânea é a apresentação clínica mais comum (Esterre & Queiroz-Telles, 2006; Vicente, 2000). Alguns estudos indicam a inalação (de Hoog, 1993; Menezes et al. 2004; Kurup, Zacharisen & Fink, 2005) e a ingestão como possíveis fontes de infecção por estes fungos em casos onde não ocorreu o episódio do trauma (de Hoog et al. 2005).

Os gêneros considerados mais importantes são *Fonsecaea*, *Exophiala*, *Cladophialophora*, *Phialophora* e *Rhinocladiella*, responsáveis por infecções como o Micetoma, Feohifomicose e a Cromoblastomicose (Vicente et al. 2008; Alviano et al. 2004; Afsarian et al. 2012). Estes fungos são encontrados em todo o mundo, mais comumente em regiões tropicais e subtropicais (Vicente, 2000, Vicente et al. 2008), como a região Amazônica (Bona et al. 2010; Correia et al. 2010).

No período de 1973 a 1978, Talhari et al. (1980), fizeram um levantamento dos casos de micoses profundas diagnosticados nos ambulatórios dermatológicos da cidade de Manaus (Amazonas) e identificaram 22 casos de Cromoblastomicose e 8 casos de Micetoma. Alguns anos depois, Talhari et al. (1988), publicou um estudo com os casos diagnosticados em clínicas dermatológicas de Manaus entre os anos de 1973 a 1983, relatando a Cromoblastomicose como a terceira micose mais frequente, dentre as micoses subcutâneas e profundas, perdendo apenas para a Doença de Jorge Lobo e Paracoccidioidomicose. O Eumicetoma apareceu em quarto lugar. Os casos eram oriundos de vários estados da região Amazônica, como Amazonas, Pará, Acre, Rondônia e Roraima.

2.1.1 Micetoma

O Micetoma é caracterizado por inflamação localizada, granulomatosa, supurativa e progressiva do tecido subcutâneo, sendo chamado de Actinomicetoma quando causado por bactérias (actinomicetos) e de Eumicetoma quando ocasionado por fungos (Sidrim & Rocha, 2004), cuja principal característica é a presença do fungo sob a forma de grânulos (microcolônias do agente infeccioso) escuros nos tecidos (Sidrim & Rocha, 2004; Revankar, 2010). É mais comum nas extremidades inferiores do corpo, em especial nos pés (Revankar, 2010).

É uma infecção comum no Continente Africano, particularmente no Sudão e Senegal e na Ásia, principalmente na Índia, com alguns casos registrados em países da América Latina, como Colômbia, Argentina, Venezuela e Brasil (Queiroz-Telles et al. 2011).

Os principais responsáveis por esta micose são as espécies *Madurella mycetomatis*, *Leptosphaeria senegalensis*, *Madurella grisea* e várias espécies de *Coelomycetes*, com

relatos envolvendo também as espécies *Cladophialophora bantiana* e *Exophiala jeanselmei* (de Hoog et al, 2000; Bonifaz et al. 2009).

O diagnóstico laboratorial baseia-se na observação dos grânulos (Queiroz-Telles et al. 2003; Sidrim & Rocha, 2004) que drenam da lesão ou que são obtidos por punção ou biopsia (Sidrim & Rocha, 2004). Os grânulos do Eumicetoma diferem dos de Actinomicetoma pelo maior diâmetro e pela cor escura (Queiroz-Telles et al. 2003).

Normalmente é necessária terapia antifúngica prolongada (Revankar, 2010). O tratamento é realizado com Cetoconazol, Itraconazol e Fluconazol (Escobar & Castro, 2008).

2.1.2 Feomicose

As Feomicoses (termo atualmente indicado para substituir Feohifomicoses por não excluir as leveduras) são micoses que podem se apresentar na forma cutânea, subcutânea e sistêmica, sem formação de corpos muriformes, podendo ser causadas por espécies dos gêneros *Cladophialophora*, *Phialophora* e mais comumente pelo gênero *Exophiala* (Revankar, 2007; Costa, 2010, Chowdhary, Perfect & de Hoog, 2015). É considerada uma doença esporádica, cosmopolita que acomete tanto indivíduos considerados saudáveis quanto aqueles com sistema imune comprometido (Sidrim & Rocha, 2004).

Os achados clínicos da Feomicose variam quanto ao estado imunológico do hospedeiro, sítio anatômico acometido e espécie fúngica envolvida (Sidrim & Rocha, 2004; Kajishima, 2009).

Na pele, a lesão é mais comum nas extremidades do corpo, apresentando nódulo avermelhado (Refai & El-Yazid, 2014). As micoses superficiais podem atingir a camada superficial da pele, pêlos e unhas, sendo adquiridas no ambiente por *Piedraia hortae*,

Curvularia spp. e *Cladosporium* spp. O acometimento cutâneo ocorre pela introdução do fungo na epiderme com destruição tecidual e reação inflamatória. A forma subcutânea é a mais comum e resulta da inoculação do fungo por um traumatismo ocasionando lesão localizada com nódulos subcutâneos, sendo os principais agentes *Madurella* e *Phaeoacremonium* e representantes de *Pleosporales* e, a forma sistêmica é obtida pela inalação de propágulos fúngicos, normalmente iniciada por lesão pulmonar em pacientes com comprometimento imune, se disseminando por via hematogênica para outros órgãos ou sistemas (Sidrim & Rocha, 2004; Chowdhary, Perfect & de Hoog, 2015).

Harris et al. (2009) avaliaram vários casos de Feomicose com comprometimento cutâneo e subcutâneo, causados pela espécie *Exophiala spinifera* em várias regiões geográficas, demonstrando diferentes manifestações clínicas da doença. Casos de infecção disseminada podem ser fatais em hospedeiros imunocomprometidos (Badali, 2010; Revankar, 2010). As formas sistêmicas da doença podem acometer vários órgãos como o coração, o intestino, os ossos, fígado, rins, baço e especialmente o cérebro (Sidrim & Rocha, 2004).

A doença também se apresenta como Ceratite fúngica, incluindo manifestações clínicas como fotofobia, vermelhidão nos olhos e redução da percepção visual com um infiltrado branco-amarelado que limita a córnea central. Além disso, há comuns relatos de Feomicose na forma de Sinusite em pacientes com histórico de Rinite alérgica ou imunossupressão (Refai & El-Yazid, 2014).

A Feomicose com comprometimento cerebral não é comum, mas acomete principalmente o Sistema Nervoso Central (SNC), podendo ter uma taxa de mortalidade de até 70%. Essa manifestação mais rara e grave desta micose pode ser causada pelas espécies *Cladophialophora bantiana*, *Exophiala dermatitidis*, *Fonsecaea monophora* ou *Rhinocladiella mackenziei* (Badali et al. 2008). Essa predileção pelo SNC ainda não está

clara (Kantarcioglu & de Hoog, 2003; Revankar, 2010), mas pode estar relacionada com a capacidade destes fungos produzirem substâncias carreadoras de ferro, sendo atraídos pela alta concentração deste elemento no SNC (Caligiorne, Campolina & Licinio, 2007).

Em uma revisão sobre casos de Feomicose cerebral, Horr  & de Hoog (1999), observaram que a espécie *E. dermatitidis* tem distribui o mundial. No entanto, casos associados   infec o cerebral por *E. dermatitidis* são restritos a indivíduos orientais do leste da Ásia, sugerindo possível predilec o por raça.

Em outro estudo sobre relatos de casos de Feomicose cerebral foi sugerido que a associa o de Anfotericina B, Flucitosina e Itraconazol pode levar a uma maior sobrevida dos pacientes, embora não seja muito utilizada. O Posaconazol e o Voriconazol têm apresentado bons resultados em casos disseminados causados por espécies de *Exophiala* (Revankar, 2010).

A Feomicose   caracterizada pela presença de células leveduriformes amarronzadas, hifas irregulares, ou ambas as formas no tecido do hospedeiro (Caligiorne, Campolina & Licinio, 2007).

Os medicamentos utilizados no tratamento destas micoses incluem principalmente o uso de Itraconazol, Anfotericina B, Fluconazol (Silveira & Nucci, 2001; Duarte et al. 2013), Terbinafina e Voriconazol (Duarte et al. 2013). Mas, devido a variedade de agentes etiológicos,   uma micose de difícil tratamento, sendo o mais indicado a remo o cirúrgica total da lesão, porém também com chances de recidivas. O sucesso do tratamento depende do agente etiológico e do grau de comprometimento da doença (Costa, 2010). Além disso, um diagnóstico precoce da doença   extremamente importante (Kantarcioglu & de Hoog, 2003).

2.1.3 Cromoblastomicose

A Cromoblastomicose (CBM) ou cromomicose é uma infecção crônica, de evolução lenta, que apresenta nódulos e placas verrucosas na pele e no tecido celular subcutâneo, com possível ulceração, normalmente localizada nos membros inferiores (Vicente et al. 2001; Bona et al. 2010; Correia et al. 2010; Pires et al. 2012). A lesão causada pela CBM tem aspecto seco, não provoca dor e não possui mau odor, levando o paciente, na maioria das vezes, a procurar tratamento somente quando o estágio da doença já está bastante avançado (Caligiorne et al. 1999).

Os primeiros casos da doença foram publicados por um médico alemão em 1914. No Brasil, foi descrita em 1920 por Pedroso, embora haja relatos de que Pedroso já havia observado casos da doença em 1911 (Fuchs & Pecher, 1992).

Esta micose é causada pelos gêneros *Fonsecaea*, *Phialophora*, *Cladophialophora* e *Rhinocladiella* (Matte et al. 1997; Correia et al. 2010). Estes fungos são semelhantes quanto à pigmentação, a morfologia, estrutura antigênica, propriedades fisiológicas e formação de conídios (Araújo, 2008). Atualmente o gênero *Fonsecaea* possui três espécies crípticas que podem potencialmente causar CBM, que são *F. pedrosoi*, *F. monophora* e *F. nubica* (Vicente et al. 2013). Estas espécies são morfologicamente semelhantes, mas podem desencadear patologias diferentes. Enquanto a *F. pedrosoi* e a *F. nubica* são relacionadas apenas a Cromoblastomicose, a *F. monophora* é mais oportunista e pode causar também Feomicose Cerebral (Najafzadeh et al. 2011).

A maioria dos casos da doença deve-se as espécies *F. pedrosoi* e *C. carrionii* (Matte et al. 1997; Esterre & Queiroz-Telles, 2006; Salgado, 2007; Correia et al. 2010), com alta incidência nos continentes Africano, Asiático e Americano, tendo regiões consideradas

endêmicas no Brasil, como os estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e toda a região amazônica (Silva et al. 1992; Bona et al. 2010).

Na região Amazônica, o estado do Pará concentra grande foco da doença (Silva, Souza & Rozental, 1999), além disso, de acordo com Salgado (2007), possui a terceira maior prevalência mundial com mais de 500 casos de CBM diagnosticados até 2007, ficando atrás somente da Ilha de Madagascar com mais de 2000 casos, e do Estado de Falcón, na Venezuela, com mais de 1000 casos diagnosticados. No sul de Madagascar, no norte da Venezuela (Salgado, 2007) e na Austrália (Vicente et al. 2013), que são áreas secas, a espécie mais encontrada é a *C. carrionii* (Salgado, 2007; Vicente et al. 2013), enquanto que na região amazônica, ao norte de Madagascar (Salgado, 2007) e no sul da China (Vicente et al. 2013), que são áreas úmidas, *F. pedrosoi* se constitui como a principal espécie (Salgado, 2007; Vicente et al. 2013).

O estado do Maranhão é considerado o terceiro estado com maior número de registros de CBM no Brasil (Marques et al. 2006). A doença acomete principalmente trabalhadores agrícolas em áreas tropicais e subtropicais (Vicente et al. 2001; Ribeiro et al. 2006). Os indivíduos do sexo masculino são os mais susceptíveis a acidentes envolvendo fungos causadores de CBM (Silva et al. 1992; Silva et al. 2002; Matte et al. 1997) devido ao maior contato com solo e vegetais, ocasionado por seu trabalho na agricultura (Silva et al. 1992), o que parece demonstrar uma relação desta atividade profissional com o acometimento da infecção (Silva et al. 1995).

A atividade de quebra do coco do Babaçu, obtido de uma palmeira nativa do meio-norte nordestino do Brasil, tem sido considerada um fator de risco provável para a ocorrência de CBM por *F. pedrosoi* (Marques et al. 2006). Na baixada ocidental maranhense, onde parte da população sobrevive através do extrativismo com a retirada de amêndoas do Babaçu, utilizadas na indústria regional de óleos vegetais, foram registrados

dois casos de pacientes com CBM que apresentavam lesão na região glútea, o que não é comum já que a CBM normalmente acomete mais as extremidades do corpo. Na investigação epidemiológica foi verificado que ambos os pacientes trabalhavam com a quebra de coco-babaçu (Silva et al. 1995).

Pires et al. (2012), descreveram características micológicas e epidemiológicas da CBM e suas apresentações clínicas no estado do Pará, com achados clínicos principalmente em indivíduos que viviam em áreas rurais do estado.

O diagnóstico desta micose pode ser definido por exame micológico direto com a observação de células fúngicas de parede espessa acastanhadas, chamadas células escleróticas ou muriformes, de onde podem surgir hifas escuras septadas (Queiroz-Telles et al. 2003; Salgado, 2007), e por histopatologia, através da presença dessas células escleróticas no tecido infectado (Revankar, 2010). Porém, para definir o agente etiológico é preciso realizar ainda, o isolamento do fungo em meio de cultura e o microcultivo (Salgado, 2007).

O tratamento é feito com Terbinafina (Bonifaz et al. 2001), Tiabendazol, Anfotericina B, Itraconazol e/ou crioterapia (Martinez & Tolvar, 2007). O Itraconazol é o medicamento que tem apresentado melhores resultados (Revankar, 2010). Mas apesar da medicação ser considerada eficiente, o tratamento é difícil, por ser muito longo, variando de 6 meses a mais de 3 anos e não há estudos controlados de acompanhamento de paciente durante esse período que confirmem a real taxa de cura da doença com o uso do medicamento (Salgado, 2007).

2.2 FUNGOS MELANIZADOS EM FONTES AMBIENTAIS

Estudos têm sido realizados com base no isolamento de fungos melanizados de fontes ambientais a fim de identificar o habitat natural desses fungos e sua ecologia (Vicente, 2000; Vicente et al. 2001; Salgado et al. 2004; Marques et al. 2006). Estes isolamentos podem indicar a existência sapróbia destes microrganismos em plantas, madeira, matéria orgânica em decomposição e solo (Vicente, 2000).

Sahay (2013) isolou leveduras negras de várias fontes ambientais como solo, água e diferentes partes de plantas (galhos envelhecidos, folha, flor e fruto) em diferentes localidades da cidade de Bhopal, na Índia. As folhas demonstraram-se como o nicho preferível, seguido das demais partes da planta. O solo coletado em margem de rio e a água de lagoa foram os substratos com menor número de isolados.

No Brasil, há relatos de isolamento de fungos melanizados de fontes ambientais no Maranhão, no Paraná e na região Amazônica (Cristovão et al. 1999; Vicente, 2000; Vicente et al. 2001; Salgado et al. 2004; Marques et al. 2006).

No ano de 2006, Marques et al., analisaram amostras de Babaçu, inclusive a casca do coco, e outros diferentes substratos naturais em uma vila do município de Pinheiro, no Maranhão, para verificar a presença de fungos melanizados. *Exophiala* sp. foi encontrada na maioria dos substratos, *Cladophialophora* sp. foi isolada somente em amostra de madeira em decomposição e *F. pedrosoi* foi isolada de uma amostra de casca de coco-babaçu, sugerindo mais uma vez que o coco-babaçu é uma importante fonte de infecção de Cromoblastomicose.

Vicente (2000) coletou amostras de substratos vegetais vivos e em decomposição e madeira em diferentes regiões do Paraná recuperando um total de 81 gêneros de fungos melanizados de interesse médico. A maioria dos isolados foi obtida de madeira em

decomposição, sendo estes *Cladophialophora* sp., *Exophiala* sp., *Phialophora* sp., *Rhinocladiella* sp. e *Fonsecaea* sp.

A Amazônia possui clima tropical quente e úmido, com imensa variabilidade de matéria orgânica com muitos substratos que podem favorecer o desenvolvimento dos fungos (Reis, 1982). A faixa de temperatura anual é de 24 a 26°C, com umidade relativa de aproximadamente 83% (Marques et al. 2006).

No Pará, Salgado et al. (2004) isolaram a espécie *Fonsecaea pedrosoi* de espinhos da planta *Mimosa pudica*, popularmente conhecida como “maria-fecha-a-porta”, indicando que esta planta pode ser uma fonte natural de Cromoblastomicose, pois o mesmo fungo foi encontrado na amostra da paciente, infectada após lesão traumática contra os espinhos desta planta. Estudos realizados no estado do Paraná também relataram Cromoblastomicose causada por inoculação do fungo por traumatismo com fragmentos de plantas (Vicente et al. 2001; Burjack, 2010).

Em um estudo sobre a ocorrência de fungos melanizados nas praias de Manaus (Amazonas), Cristovão et al. (1999), verificaram a presença desses microrganismos no solo de todas as praias investigadas, com isolados de *Cladosporium* sp., *Exophiala* sp. e *Phialophora* sp.

Apesar dos fungos melanizados serem encontrados no ambiente, o isolamento a partir de fontes ambientais é difícil, isolando-se pouca variedade de espécies (Satow et al. 2008; Vicente et al. 2001), pois estes fungos perdem na competitividade de crescimento frente à vários sapróbios de crescimento rápido, sendo esta uma das razões pelas quais a distribuição destes fungos ainda não é totalmente elucidada (Satow et al. 2008).

O método de flotação em óleo mineral tem sido considerado um método eficaz para o isolamento de fungos melanizados a partir de amostras ambientais, sendo utilizado em vários estudos. O uso desta técnica possibilitou o isolamento de diferentes gêneros de fungos

melanizados em vários substratos ambientais (Vicente, 2000; Vicente et al. 2001; Marques et al. 2006; Satow et al. 2008; Guerra, 2010).

O óleo mineral parece ser fundamental para o bom desempenho desta técnica, possibilitando a formação de fases distintas na suspensão, permitindo com que as células de fungos melanizados se concentrem na interfase água-óleo mineral. Porém não se sabe ao certo qual o principal fator seletivo da técnica, pois as espécies deste grupo fúngico são bastante diversificadas quanto a ecologia, fisiologia e os aspectos filogenéticos. Mas presume-se que possa estar relacionado com o fato dos fungos melanizados assimilarem hidrocarbonetos monoaromáticos, assim o óleo mineral sendo um composto feito da mistura de hidrocarbonetos da gasolina, pode agir como um fator de enriquecimento possibilitando o isolamento destes fungos (Satow et al. 2008).

Outras hipóteses são o oligotropismo, que dá a estes fungos uma vantagem competitiva frente ao crescimento na solução de óleo mineral que é pobre em nutriente ou características hidrofóbicas que mantêm os fungos na interfase da solução de óleo (Satow et al. 2008).

2.3 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS MELANIZADOS DE INTERESSE CLÍNICO

A associação de fungos melanizados com infecções humanas é conhecida desde o final do século 19, mas pela ampla diversidade de espécies, sua identificação taxonômica ainda é complexa (de Hoog et al. 2000b).

Como grande parte destes fungos são patógenos de plantas ou degradadores do material vegetal, pode-se utilizar meios de cultura à base de plantas para seu isolamento, tais como o Ágar Batata Dextrose (BDA) e o Ágar extrato de Malte (MEA) (Sutton, Rinaldi & Sanche, 2009).

Além destes, tem-se utilizado também o meio Ágar Mycosel, que é considerado um clássico de isolamento para fungos patógenos de seres humanos e que é rico em fontes de carbono e energia, acrescido de antibiótico e do quimioterápico cicloheximida para evitar a ação de fungos contaminantes de crescimento rápido (Vicente, 2000). Satow et al. (2008) observou que este meio seletivo, é um dos fatores essenciais para o isolamento de fungos melanizados, pois a cicloheximida presente no meio inibe os fungos com crescimento rápido e a elevada produção de esporos.

O Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) é o meio básico utilizado em laboratório de micologia e normalmente é usado com o antibiótico cloranfenicol, que é resistente a autoclavação, para evitar o crescimento bacteriano no meio (ANVISA, 2004).

Os isolados clínicos podem ser obtidos a partir de raspados de pele, biópsia, sangue, urina e outros tecidos (Li et al. 2010). A identificação primária da espécie de fungo melanizado é feita através da observação macroscópica da colônia e de suas características microscópicas, apresentando hifas e septos escuros (de Hoog et al. 2000b).

Microscopicamente podem ser identificados pelo tipo de esporulação que apresentam: conidiação do tipo fiálide (*Phialophora*), com estrutura em forma de jarro, formada ao longo da hifa de onde saem vários conídios; conidiação tipo cladospório (*Cladosporium*), com conidióforos que formam cadeias longas de conídios ramificando-se por brotamento apical e; conidiação do tipo acroteca (*Rhinoctadiella*), tendo estruturas alongadas, os conidióforos, gerados ao longo da hifa originando inúmeros conídios ovais na extremidade superior (acroteca) e nas laterais deste conidióforo. No entanto, as espécies podem variar na ontogenia destes conídios, dependendo das condições ambientais, o que leva a dúvidas quanto à identificação das espécies (Sidrim & Rocha, 2004; Caligiorne, Campolina & Licinio, 2007).

F. pedrosoi pode apresentar mais de duas formas de desenvolvimento, podendo ter os três tipos de conídios, mais comumente tipo cladospório, na sua forma saprofítica (Najafzadeh et al. 2011) e corpos escleróticos isolados ou ligados às hifas na sua forma parasítica (Duarte et al. 2013; Najafzadeh et al. 2011).

Os anamorfos *Dothideaceae* crescem rapidamente em meio de cultura, com hifas largas e multinucleadas e a melanização depende do estágio de desenvolvimento do fungo (Nascimento, 2013). Já os fungos da família *Herpotrichiellaceae* têm crescimento lento em meio de cultura, e alguns apresentam primeiramente características leveduriformes e depois passam a ter textura aveludada com hifas mononucleadas e talo regular, com pigmentação uniforme. As colônias filamentosas possuem aspecto escuro, variando de marrom, verde oliva e negras, apresentando hifas com septos escuros em observação microscópica (de Hoog et al. 2000a).

Os fungos do gênero *Cladophialophora* apresentam colônias pulverulentas ou lanosas com coloração verde-acinzentada a verde-olivácea. No gênero *Exophiala*, as colônias são preto-oliváceo, com centro viscoso, característica de crescimento tipo leveduriforme que com o tempo adquire formato mais aveludado ou lanoso (de Hoog et al. 2000a). Já as espécies de *Fonsecaea* apresentam colônias escuras, aveludadas e com centro elevado (Kimura, 2012).

A taxonomia e a identificação dos fungos melanizados através da análise morfológica é dificultada pelo alto grau de plasticidade morfológica e pela insuficiência na diferenciação das estruturas conidiais, que podem apresentar diferentes tamanhos e formatos na maioria das espécies (Haase et al. 1999; Vicente, 2000; Badali et al. 2008). O isolamento de cepas ambientais é mais complicado por causa do pleomorfismo e do crescimento lento do fungo, sendo a maioria das culturas obtidas de amostras clínicas (Vicente et al. 2001; Vicente et al. 2008).

Os testes sorológicos não são utilizados na rotina laboratorial para a detecção destes fungos no sangue ou tecidos (Revankar, 2010), pois a falta de sensibilidade e especificidade do antígeno pode ocasionar reações cruzadas (Minotto, 2009).

2.4 USO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS MELANIZADOS

Os métodos de análise clássicos levam muitas vezes a erros na identificação do agente patogênico, além da contaminação por outros microrganismos e de menor capacidade de diferenciação entre espécies com aspectos similares (Zeng et al. 2007; Badali, 2010; Guerra, 2010; Revankar, 2010). A correta identificação de espécies é essencial para o entendimento da relação patógeno-hospedeiro e permite que ações de controle de infecção sejam tomadas (Vicente, 2000).

Neste contexto tem sido introduzidas técnicas de biologia molecular para a detecção de microrganismos patogênicos, muitas delas já descritas para a genotipagem de fungos melanizados (Badali, 2010; Vicente, 2000; Revankar, 2010). Os dados obtidos através dos métodos moleculares possibilitam maiores informações sobre as relações genéticas e epidemiológicas entre isolados ambientais e clínicos (Badali, 2010).

A técnica de PCR visa a amplificação de fragmento específico do DNA (Vicente, 2000; Satow et al. 2008). Para estudos com fungos, a PCR consiste na amplificação de regiões do DNA ribossomal (DNAr). O DNAr contém repetições separadas pelas regiões não transcritas 18S (subunidade menor), 5.8S e 28S (subunidade maior), que normalmente não apresentam variação de sequência, ou seja, variação intra-específica e regiões internas (ITS1 e ITS2) que possuem variações na sequência e são transcritas. Assim sendo, o sequenciamento da região ITS, pelo seu alto grau de polimorfismo, tem sido bastante

utilizado em estudos de identificação, comparativos entre espécies afins e até para a descoberta de espécies ainda não descritas (Vicente, 2000; Satow et al. 2008), além de estudos filogenéticos para elucidação da ecologia e evolução dos fungos (Vicente, 2000).

Vicente et al. (2008), analisaram potenciais agentes de Cromoblastomicose no estado do Paraná, isolando cepas de amostras ambientais e comparando-as com isolados clínicos. A análise molecular revelou que a maioria das cepas ambientais encontradas pertencia à mesma Ordem daquelas já conhecidas como causadoras de doença, mas grande parte eram espécies não descritas. No ano seguinte, Badali et al. (2009), descreveram uma nova espécie de *Cladophialophora* com potencial oportunista. A cepa foi isolada da amostra clínica de uma criança imunocomprometida que apresentava uma lesão interdigital escura. Essa cepa foi caracterizada por sequenciamento da região ITS. Uma vez que o resultado não correspondeu com nenhuma das espécies já conhecidas, esta foi descrita como *Cladophialophora saturnica*.

Os genes ribossomais sequenciados são normalmente comparados com dados já publicados em um banco de dados, nomeado GenBank (Revankar & Sutton, 2010). Dados que elucidem se as estirpes ambientais e as cepas clínicas representam as mesmas espécies e genótipos continuam a ser investigados (Vicente et al. 2013).

2.5 CRESCIMENTO FÚNGICO EM DIFERENTES TEMPERATURAS

A tolerância à temperatura corporal humana é primordial para a patogenicidade do fungo, e esta capacidade pode ter sido adquirida acidentalmente durante o processo de adaptação ao habitat ambiental, como as superfícies quentes de regiões com clima semi-árido (Badali et al. 2008). A temperatura corporal, que é de 37°C, pode estar correlacionada com a temperatura máxima de crescimento (termotolerância) de espécies invasivas nas suas

escolhas quanto ao hospedeiro (de Hoog et al. 2011). A termotolerância é considerada um importante fator de virulência dos fungos melanizados (de Hoog et al. 2000b).

Espécies que crescem em torno de 27°C a 33°C podem ser capazes de causar doenças em animais de sangue frio e espécies que crescem até 40°C podem causar infecções sistêmicas em mamíferos (de Hoog et al. 2011).

Badali et al. (2008), avaliaram o crescimento de cepas de *Cladophialophora* sp. e observaram que todas tiveram um crescimento ótimo em torno de 27°C, sendo capazes de crescer até 37°C, mas não à 40°C, confirmando a natureza predominante deste gênero como sapróbio ambiental, com potencial para causar infecções superficiais em humanos, assim como os demais microrganismos oportunistas.

As espécies *E. dermatitidis*, *E. spinifera* e *E. asiatica* são capazes de crescer entre 37°C e 40°C (de Hoog et al. 2011). De acordo com Kajishima (2009) a espécie *E. dermatitidis* cresce lentamente em meio Ágar Batata à 25°C, mas pode crescer também em temperaturas elevadas como 42°C. Os clados com espécies capazes de crescerem bem em temperaturas acima de 36°C e 37°C (clado *bantiana*, *dermatitidis* e *jeanselmei*) podem causar infecções sistêmicas ou disseminadas em humanos, enquanto que os clados com espécies com temperatura máxima de crescimento entre 36°C e 37°C (clado *carrionii* e *europaea*) podem ser responsáveis por infecções cutâneas e subcutâneas (de Hoog et al. 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os fungos melanizados em amostras ambientais de áreas rurais do Amazonas com diferentes ações antrópicas e avaliar a relação desses fungos obtidos do ambiente com os fungos melanizados causadores de micoses no Amazonas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar fontes ambientais de fungos melanizados em áreas rurais no Amazonas;
- b) Identificar em nível de espécie, por meio de sequenciamento, os fungos melanizados obtidos nesse estudo a partir do ambiente e os de origem clínica depositados em Coleções de Fungos em Instituições do Amazonas;
- c) Caracterizar os fungos melanizados quanto à tolerância a altas temperaturas;
- d) Correlacionar os fungos isolados do ambiente com os fungos melanizados causadores de micose.

4. METODOLOGIA

4.1 MODELO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo transversal, descritivo e observacional.

4.2 UNIVERSO DE ESTUDO

4.2.1 Local de estudo e coleta de amostras

Para a obtenção dos fungos melanizados foram coletadas amostras de diferentes substratos ambientais: solo (floresta, peridomicílio e cultivo), plantas vivas (folhas, galhos e espinhos com pigmentos escuros) (Figura 01), material vegetal em decomposição (madeiras e folhas) e água de consumo humano. Buscou-se a coleta de substratos próximos à áreas com maior circulação de pessoas.

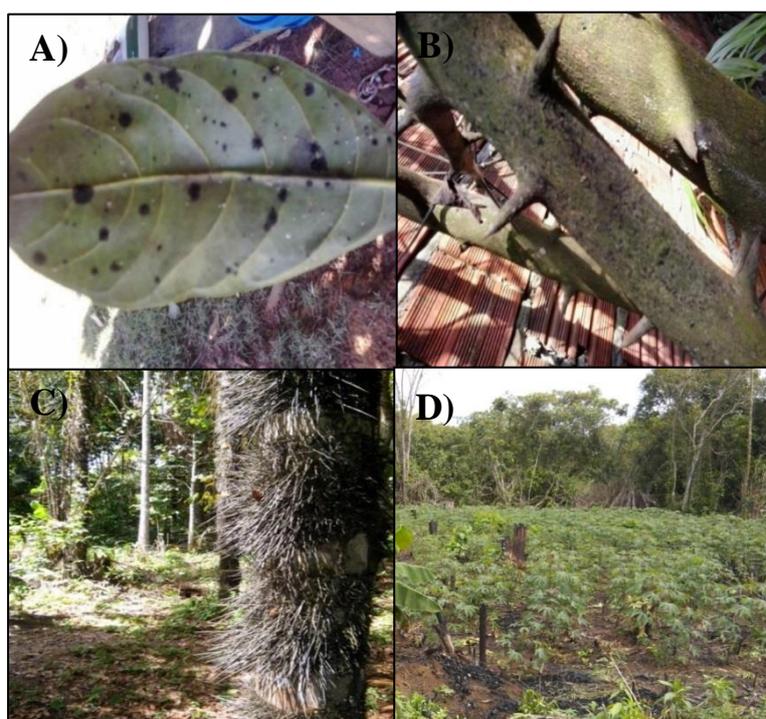


Figura 01: Substratos ambientais coletados para o estudo de fungos melanizados. Folhas com manchas escuras (A); espinhos de Laranjeira (B); espinhos de Tucumanzeiro (C); cultivo de macaxeira (D) (Marla Jalene Alves; Rosiane Rodrigues Matias).

Os solos de floresta e peridomicílio foram coletados na comunidade rural de Rio Pardo, localizada no município de Presidente Figueiredo, à 155 Km ao norte da cidade de Manaus (Amazonas). Estas amostras já haviam sido coletadas e armazenadas previamente para estudos com caráter ambiental de outros tipos fúngicos, realizados anteriormente pela equipe de Micologia do Instituto Leônidas e Maria Deane - Fiocruz Amazônia (ILMD/FIOCRUZ).

Já os demais substratos foram coletados em duas áreas rurais do município de Iranduba, localizado à 25 km da cidade de Manaus: comunidade de São Sebastião da Serra Baixa (Km 4 da estrada do Açutuba, à 30 Km de Manaus) (Figura 02) e comunidade do Lago do Limão (30 Km de Iranduba) (Figura 03). Quanto à água de consumo, foram analisadas somente amostras de casas da região do Lago do Limão, visto que estas amostras foram incluídas posteriormente no projeto em questão. As coletas procederam de maio de 2014 a janeiro de 2015.

Essas atividades estavam incluídas em projetos maiores que foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética da UFAM. As aprovações estão no Anexo I e II.



Figura 02: Comunidade de São Sebastião da Serra Baixa (Raiana Silveira Gurgel).



Figura 03: Comunidade do Lago do Limão (Raiana Silveira Gurgel; Rosiane Rodrigues Matias).

As amostras sólidas foram coletadas em sacos plásticos estéreis. Para a análise da água foram coletados 500 mL de amostra em sacos plásticos ziplock estéreis e estes foram acondicionados em caixas isotérmicas. Todas as amostras foram levadas ao Laboratório de Micologia do ILMD/FIOCRUZ onde foram processadas e analisadas.

Também foram incluídos no estudo, isolados clínicos provenientes das Coleções de Fungos do Setor de Micologia da Fundação Alfredo da Matta (FUAM), do Laboratório de Microbiologia Médica do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA) e da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD).

4.3 PROCEDIMENTOS

4.3.1 Isolamento dos fungos

Para o isolamento de amostras de água, filtrou-se 500 mL coletados através de membranas de nitrocelulose com 0,22 μm de poro. Estas membranas foram então incubadas em meio de cultura a 30°C por até 10 dias e repicadas em ASD (Kidd et al. 2007).

Para o processo de isolamento das demais amostras foi utilizada a técnica de flotação em óleo, conforme Vicente et al. (2001, 2008). Cerca de 20 gramas da amostra foram

pesados e adicionados a Erlenmeyers com 100 ml de solução salina esterilizada. Após repouso de 30 minutos foram acrescentados 20 ml de óleo mineral. A solução foi homogeneizada por agitação durante 5 minutos, ficando novamente em repouso por 20 minutos. Em seguida foi coletado 100 µl da interfase da solução e esta foi distribuída em 5 placas contendo meio de cultura Ágar Mycosel, com o auxílio da alça de Drigalsky. As amostras foram incubadas a 30°C até 4 semanas e repicadas para meio ASD.

4.3.2 Identificação morfológica dos fungos isolados

As amostras que apresentaram colônias com aspecto escuro, ou seja, sugestivo de fungos melanizados foram submetidas à técnica de microcultivo, que consistiu da utilização de lâminas como suporte para pequenos cubos de ágar ASD, nos quais em suas extremidades foram inoculados pequenos fragmentos de cultura fúngica, sendo posteriormente cobertos com lamínula. Utilizou-se água esterilizada para umidificar o papel filtro contido em cada placa (Lacaz et al., 2002).

As placas foram então incubadas a 30°C num período de 7 a 30 dias. Após este período a lamínula foi retirada cuidadosamente com auxílio de uma pinça e colocada em lâmina contendo uma gota de Lactofenol (sem conter azul de metileno) para análise microscópica.

4.3.3 Identificação molecular dos isolados

4.3.3.1 Cultura monospórica

Para a realização do procedimento de extração de DNA, primeiramente foi realizada purificação do fungo a ter o DNA extraído, através de cultivo monospórico das colônias, que se procedeu da seguinte forma: após tempo suficiente para a esporulação, parte da colônia foi coletada e adicionada em um Eppendorf contendo 1 ml de solução salina esterilizada. A solução foi deixada em repouso e ao sedimentar, coletou-se 10 µl do sobrenadante para medição da concentração de esporos na câmara de Neubauer. No caso de alta concentração de esporos a suspensão da amostra foi diluída sucessivamente até a obtenção de cerca de 3 esporos/10µl e inoculada em ASD (Teixeira, Jackisch-Matsuura & Soares, 1999). As placas foram incubadas até a obtenção da colônia, que depois foi repicada em estria e novamente incubada até o momento da extração de DNA.

4.3.3.2 Extração de DNA

Cerca de 1 cm² da biomassa do fungo foi transferida para tubo Eppendorf de 2 ml. Para a ruptura da parede celular realizou-se maceração mecânica dos fungos com a utilização de vidro triturado, devidamente esterilizado, com o auxílio de Micropistilos.

A extração de DNA baseou-se na utilização de Membrana de Sílica por meio do kit de extração “*QIAamp Tissue and Blood, Qiagen, Hilden, Germany*”, de acordo com as instruções do fabricante.

4.3.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase

Para amplificação da região ITS do DNA ribossômico, foi realizada PCR a partir dos *primers* específicos V9G (5'-TTACGTCCCTGCCCTTTGTA-3') e LS266 (5'-GCATTCCCAAACAACCTCGACTC-3'), conforme Gerrits van den Ende e de Hoog (1999). Foi feito mix da PCR para um volume final de 30 µl de reação, contendo 3 µl de DNA genômico a 20 nanogramas (ng) e as seguintes quantidades de reagentes e suas concentrações iniciais: 3 µl de solução tampão a 10X sem MgCl₂, 0,9 µl de MgCl₂ a 50 mM, 3,0 µl de dNTPs a 2 mM, 1,5 µl de cada primer, *forward* e *reverse* a 10 mM e 0,36 µl de *Taq* DNA polimerase a 5U/µl volume de água ultrapura suficiente para completar os 30 µl, ou seja, 16,74 µl água ultrapura.

Foram utilizadas as seguintes condições de termociclagem: um ciclo de desnaturação inicial por 5 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 35 segundos a 94°C, com 30 segundos a 52°C de anelamento e 1 minuto a 72°C para extensão, com extensão final de 72°C por 7 minutos. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de Agarose 1,5% corado com SYBR[®] *Safe DNA Gel Stain* em tampão TBE 1x, juntamente com marcador de peso molecular 100 pb *DNA Ladder (Invitrogen™)* e corante *6x Orange Loading Dye*, visualizados em um transiluminador de luz UV.

4.3.3.4 Reação de Sequenciamento

O DNA amplificado foi purificado com PEG 8000 (Polietilenoglicol) (ANEXO II), para a retirada de impurezas como proteínas e enzimas, antes da reação de sequenciamento que foi realizada utilizando-se os *primers* universais ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), como

descrito por White et al. (1990). A reação de sequenciamento foi feita utilizando-se o kit “*BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*” (*Applied Biosystems*) de acordo com instruções do fabricante. O volume final da reação foi de 10 µl contendo: 5 µl de água ultrapura, 2,0 µl do *primer* específico a 3,3 mM, 0,5 µl de BigDye, 2,0 µl de tampão e 0,5 µl do produto amplificado (15 - 20 ng).

As condições da reação de sequenciamento procederam da seguinte forma: desnaturação por 1 minuto a 95°C seguido de 20 ciclos de desnaturação a 95°C por 10 segundos, hibridização a 55°C por 15 segundos e 60°C por 2 minutos seguidos de 10 ciclos de desnaturação a 95°C por 10 segundos, hibridização a 55°C por 15 segundos e 60°C por 3 minutos e extensão final por 7 minutos. Após esse procedimento foi realizada a purificação da reação de sequenciamento conforme anexo (ANEXO IV).

A eletroforese capilar foi realizada em sequenciador *ABI 3130 Genetic Analyzer*.

4.3.4 Análise do crescimento a 37°C e 40°C

Para a observação do crescimento fúngico em altas temperaturas foi realizada uma suspensão da amostra em 1 mL de solução salina e, em seguida 100 µL dessa suspensão foram dispersados em placas contendo meio ASD (Neufeld, 1999). Cada isolado foi testado em duplicata (para cada temperatura) e incubado durante 1 semana a 30°C (controle da viabilidade do fungo), 37°C e 40°C.

4.4 ANÁLISE DOS RESULTADOS OBTIDOS E CORRELAÇÃO ENTRE OS ACHADOS AMBIENTAIS E CLÍNICOS

As amostras que apresentaram colônias escuras em meio de cultura e estruturas micromorfológicas características de fungos melanizados foram submetidas a PCR e sequenciamento de DNA. A PCR foi considerada positiva quando os produtos de amplificação tiveram o tamanho estimado, apresentando aproximadamente 1.000 a 1.500 pb.

As sequências *Foward* e *Reverse* obtidas pelo sequenciamento, na forma de eletroferogramas, foram alinhadas com o auxílio do programa *Geneious* versão 6.0.6, para obtenção da sequência consenso que foi depositada no software *BioMICS* (<http://www.cbs.knaw.nl/collections/BioMICSSequences.aspx>) do Centraalbureau voor Schimmelcultures-Fungal Biodiversity Centre (CBS-KNAW), para comparação com sequências de referência depositadas no banco de dados de fungos melanizados.

As amostras que apresentaram morfologia positiva para espécies consideradas patogênicas com confirmação molecular foram analisadas quanto ao crescimento a 37°C e 40°C para avaliar possível patogenicidade do fungo.

O relacionamento filogenético dos isolados ambientais e clínicos foi reconstruído através dos programas *Geneious* 9.0 e *MrBayes* v.3.2.2 para análise da similaridade genética entre as espécies.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO DE FUNGOS MELANIZADOS DE AMOSTRAS AMBIENTAIS

Foram coletadas 213 amostras ambientais, destas, 85 foram de solo (peridomicílio, floresta e plantação), 40 de plantas vivas (folhas, galhos e espinhos), 77 de água de consumo, 6 de madeira em decomposição e 5 de folhas em decomposição. A distribuição dos substratos coletados, o total de amostras coletadas e o número de amostras positivas para fungos melanizados podem ser observados no Quadro 01.

Das 213 amostras analisadas, em 57 houve crescimento de fungos melanizados. No entanto somente em 45 destas obteve-se isolados recuperados devido à ocorrência de contaminações por outros fungos e/ou bactérias. Foram obtidas 139 colônias de fungos melanizados, que após visualização da morfologia foram agrupadas (dentro da mesma amostra ambiental) aquelas que apresentaram as mesmas características morfológicas selecionando-se uma colônia do agrupamento para os estudos posteriores. Dessa forma, foram selecionados 58 fungos melanizados.

Substrato	Números de Amostras Coletadas	Número de Amostras Positivas
Solo de Floresta	40	4
Solo de peridomicílio	40	12
Solo de Plantação	5	1
Planta viva (Espinhos)	20	16
Planta viva (folhas)	10	5
Planta viva (galhos)	10	5

Água de consumo	77	11
Madeira em decomposição	6	2
Folha em decomposição	5	1
TOTAL	213	57

Quadro 01 – Substratos coletados, total de amostras analisadas e número de amostras positivas para fungos melanizados.

A técnica de flotação em óleo mineral demonstrou bom desempenho, possibilitando o isolamento de várias colônias de fungos melanizados. Como pode ser observado na figura 04, as placas com amostras processadas, provenientes de espinhos e madeira em decomposição apresentaram pouco crescimento de outros fungos e/ou bactérias, permitindo maior número de isolados a partir dessas amostras. Já as amostras de solo de cultivo e galho apresentaram acentuada contaminação por outros microrganismos, impossibilitando maior número de isolados a partir destes substratos.

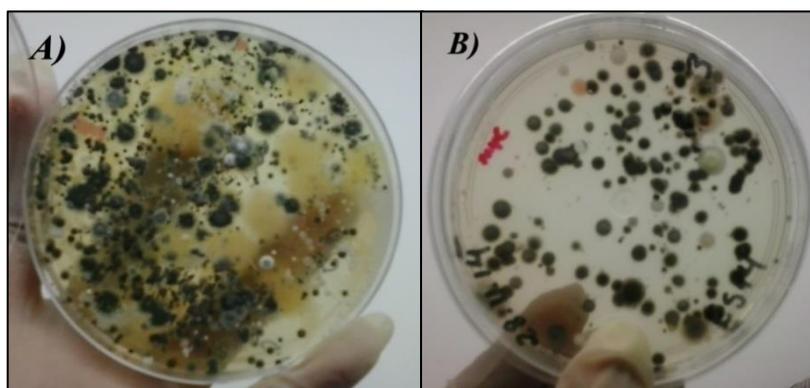


Figura 04: Placas com crescimento fúngico em Ágar Mycosel após processamento das amostras ambientais. Placa com amostra de madeira em decomposição (A); placa com amostra de galho (B).

A Tabela 01 mostra de forma detalhada os substratos coletados, seus respectivos códigos de identificação e fungos isolados.

Local	Substrato	Código	Fungos Isolados
	SOLO		
		F40	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>
	Floresta	F72B	<i>Exophiala</i> sp.
		F72F	Fungo melanizado
		F125	<i>Cladophialophora immunda</i>
Rio Pardo		Q22	<i>Cladophialophora</i> sp.
		Q72	Fungo melanizado
		Q78	<i>Cladophialophora</i> sp.
	Quintal	Q125	<i>Cladophialophora</i> sp.
		Q161	<i>Cladophialophora</i> sp.
		Q217	<i>Cladophialophora</i> sp.
	FOLHA		
	Cupuaçuzeiro (<i>Theobroma grandiflorum</i>)	FL8	Fungo melanizado, <i>Coniosporium</i> sp.
Lago do Limão	Biribazeiro (<i>Rollinia mucosa</i>)	FL9	<i>Coniosporium</i> sp.
	Açaizeiro (<i>Euterpe olearacea</i>)	FL10	Fungo melanizado <i>Exophiala</i> sp.
	Mangueira (<i>Mangifera indica</i>)	FL12	<i>Coniosporium</i> sp., <i>Cyphellophora guyanensis</i>
	GALHO		
	Limoeiro (<i>Citrus aurantifolia</i>)	GL6	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
Lago do Limão	Biribazeiro (<i>Rollinia mucosa</i>)	GL8	<i>Cladophialophora</i> sp.
	Ingazeiro (<i>Inga edulis Mart</i>)	GL9	<i>Cyphellophora</i> sp.

 ESPINHO

	Laranjeira (<i>Citrus sinensis</i>)	ES7	Fungo melanizado
	Limoeiro (<i>Citrus aurantifolia</i>)	ES8	<i>Exophiala brunnea</i>
	Maria-fecha-a-porta (<i>Mimosa pudica</i>)	ES9	<i>Exophiala</i> sp. Fungo melanizado
	Maria-fecha-a-porta (<i>Mimosa pudica</i>)	ES10	<i>Cyphellophora</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp, Fungo melanizado
	Jurubeba (<i>Solanum paniculatum</i>)	ES11	<i>Cladophialophora</i> sp.
	Laranjeira (<i>Citrus sinensis</i>)	ES12	<i>Cladophialophora</i> sp., <i>Exophiala</i> sp., Fungo melanizado, <i>Cyphellophora</i> <i>guyanensis</i>
	Laranjeira (<i>Citrus sinensis</i>)	ES14	<i>Cyphellophora</i> <i>guyanensis</i> , <i>Cladosporium</i> <i>cladosporioides</i> , <i>Cyphellophora</i> sp., Fungo melanizado; espécie de <i>Pleosporales</i>
Lago do Limão	Tucumanzeiro (<i>Astrocaryum aculeatum</i>)	ES17	<i>Exophiala</i> <i>oligosperma</i> , <i>Cyphellophora</i> sp., Fungo melanizado, Fungo melanizado (levedura)
	Tangerineira (<i>Citrus reticulata</i>)	ES19	Fungo melanizado, <i>Coniosporium</i> sp.
	Tucumanzeiro (<i>Astrocaryum aculeatum</i>)	ES20	<i>Cladosporium</i> sp.
	Laranjeira (<i>Citrus sinensis</i>)	ES21	<i>Coniosporium</i> sp., Fungo melanizado
		ES22	<i>Cladophialophora</i>

Laranjeira (<i>Citrus sinensis</i>)		sp., <i>Exophiala jeanselmei</i> , Fungo melanizado, <i>Coniosporium</i> sp.
MADEIRA EM DECOMPOSIÇÃO		
Lago do Limão	Madeira	MD3 <i>Cladophialophora</i> sp., <i>Fonsecaea brasiliensis</i>
ÁGUA DE CONSUMO		
Lago do Limão	Caixa d'água	A1 <i>Hortaea werneckii</i>
		A2 <i>Hortaea werneckii</i>
		A3 <i>Hortaea werneckii</i>
		A4 <i>Hortaea werneckii</i>
		A5 <i>Exophiala oligosperma</i>
	Poço artesiano	A6 <i>Hortaea werneckii</i>
		A9 <i>Curvularia lunata</i>
		A10 <i>Curvularia</i> sp.
		A11 <i>Curvularia</i> sp.

Tabela 01: Substratos coletados e respectivos fungos isolados.

Foram isolados 8 gêneros de fungos melanizados: *Cladophialophora*, *Cladosporium*, *Cyphellophora*, *Coniosporium*, *Fonsecaea*, *Exophiala*, *Curvularia* e *Hortaea*.

Dentre todos os substratos analisados obteve-se maior número de isolados a partir de espinhos de planta viva, diferentemente de outro estudo realizado na cidade de Bhopal, na Índia, cujos isolados melanizados em sua maioria foram obtidos das folhas (Sahay, 2013). Esse resultado merece destaque pelo fato de que através dos espinhos há maior possibilidade de trauma e conseqüente inoculação dos fungos que estão presentes.

Neste estudo isolou-se *Cladophialophora* sp. de diferentes substratos: solo de quintal, folha e galho de Biribazeiro, espinhos de Jurubeba e duas amostras de Laranjeiras e madeira em decomposição. *Cladophialophora immunda* foi obtida a partir de solo de

floresta. Vicente et al. (2008), também isolou *Cladophialophora immunda* a partir de detritos vegetais e tronco de palmeira de Jerivá, além de *Cladophialophora* sp. de troncos envelhecidos de Canela e de Cambará no estado do Paraná. Marques et al. (2006) encontrou *Cladophialophora* sp. em amostra de madeira em decomposição, no estado de Pinheiro, no Maranhão.

Cladosporium é o gênero mais comum vivendo como saprófita, segundo Asan et al. (2003), principalmente onde há muita matéria orgânica. *Cladosporium* sp. foi observado em espinhos da planta Maria-fecha-a-porta e de Tucumanzeiro. A espécie *C. sphaerospermum* foi isolada de solo de floresta e *C. cladosporioides* de galho de Limoeiro e espinho de Laranjeira. *Cladosporium* sp. também já foi encontrado em solo de praias de Manaus, Amazonas, no Brasil, solo de montanha, pastagens e do deserto frio em áreas próximas a fonte do Rio Amarelo na China (Cristovão et al. 1999; Pan et al. 2008). *C. sphaerospermum* também já foi evidenciado em amostras de solo em Guangdong, na China (Hu et al. 2011) e em detritos vegetais de jardins públicos no Cairo, no Egito (Zaki, et al. 2011).

Apesar de não ter sido isolado de água no presente trabalho, é um fungo considerado frequente em ambientes aquáticos (Asan et al. 2003). *Cladosporium* spp. já foram isoladas de água de abastecimento de um Hospital Universitário, na Bélgica (Hayette, et al. 2010) e em Braga, em Portugal (Gonçalves et al. 2006). *C. sphaerospermum* e *C. herbarum* foram isolados de água de abastecimento público na Noruega (Hageskal et al. 2006), assim como *C. cladosporioides*, que também foi encontrado em 3 amostras de diferentes marcas de água mineral, comercializadas por empresas de São Paulo, no Brasil (Pontara et al. 2011).

Cyphellophora sp. foi isolada de galho de Ingazeiro e de espinhos de Maria-fecha-a-porta, Laranjeira e Tucumanzeiro. *C. guyanensis* foi encontrada em folha de mangueira e espinho de Laranjeira. A mesma espécie já foi relatada no Brasil em palmeira de

Tucumanzeiro, em madeira envelhecida e no telhado da casa de um paciente (Feng et al. 2012a).

O gênero *Coniosporium* sp. foi evidenciado em folhas de Cupuaçuzeiro, Biribazeiro e Mangueira e em espinhos de Tangerineira e duas amostras de Laranjeiras. Fungos deste gênero são encontrados causando manchas escuras em folhas de plantas, e também em madeira envelhecida (Li et al. 2008).

Uma espécie de *Fonsecaea* foi isolada a partir de uma amostra de madeira em decomposição, sendo esta *Fonsecaea brasiliensis*. No estado do Paraná, assim como neste estudo, foram identificadas *Cladophialophora* sp. e *Fonsecaea* sp. em madeira em decomposição (Vicente, 2000). A espécie *F. pedrosoi* também foi encontrada em material vegetal em decomposição por Vicente et al. (2001) e em espinho da planta Maria-fecha-a-porta no estado do Pará por Salgado et al. (2004). *Fonsecaea* também já foi observada em ervas medicinais de *Peumus boldus* (Boldo) e *Matricaria chamomilla* (Camomila) no estado da Paraíba, no Brasil (Santos et al. 2013).

No presente trabalho foram isoladas espécies de *Exophiala* a partir de diferentes fontes ambientais, mas constatou-se a dificuldade do isolamento devido a menor habilidade competitiva frente a outros fungos com crescimento mais rápido, e também a dificuldade quanto a identificação pela morfologia não só deste gênero, mas de vários gêneros de fungos melanizados. De Hoog et al. (2011) já haviam relatado essas dificuldades para as espécies de *Exophiala*.

No nosso estudo, *Exophiala* sp. foi isolada a partir de solo de floresta, folha de Açaizeiro e espinhos da planta Mari-fecha-a-porta e de Laranjeira. *E. jeanselmei* também foi identificada em espinho de Laranjeira. *E. brunnea* foi encontrada em espinho de Limoeiro e *E. oligosperma* em espinho de Tucumanzeiro e água de consumo (caixa d'água). Em outros trabalhos, *Exophiala* sp. também foi encontrada em ervas medicinais de *Peumus boldus*

(Boldo), *Pimpinella anisum* (erva-doce) e *Matricaria chamomilla* (Camomila), comercializadas na cidade de Campinha Grande, na Paraíba, Brasil (Santos et al. 2013). *E. brunnea* já foi isolada a partir de solo (Papendorf, 1976).

Para de Hoog et al. (2011) a presença de espécies do gênero *Exophiala* é relativamente comum em ambientes aquáticos pobres em nutrientes, desde água potável municipal, piscinas, fontes termais e água do Oceano Ártico. Biedunkiewicz & Schulz (2012) analisaram amostras de água de torneira para verificar a presença de espécies patogênicas pertencentes ao gênero *Exophiala*, identificando *E. castellani*, *E. spinifera* e *E. jeanselmei*. Nishimura et al. (1987) isolou *E. jeanselmei* e *E. dermatitidis* em água de banho doméstico e em instalações de balneários públicos no Japão. Também há relato da presença de *E. dermatitidis* em casas de banho à vapor e sauna na Holanda e Eslovênia (Matos et al. 2002).

Há uma maior facilidade em isolar fungos a partir de águas de superfície do que a partir de águas subterrâneas, o que pode estar relacionado com o fato de haver maior quantidade de matéria orgânica em água de superfície, além da diferença na acidez e do teor de cálcio entre ambas. Apesar do tratamento de água aparentemente reduzir o número de microrganismos presentes, algumas espécies de fungos melanizados são particularmente capazes de sobreviver a este processo e são capazes de sobreviver neste ambiente, mesmo este sendo pobre em nutrientes, devido a sua tolerância oligotrófica (DEFRA, 2011). Além disso, os fungos melanizados secretam a melanina que lhes proporciona maior resistência, além de vantagem competitiva frente aos processos de tratamento de água (Langfelder et al. 2003).

Curvularia sp. foi isolada de duas amostras de água (poço artesiano), assim como *C. lunata*. Verma, Singh & Sight (2013) também isolaram espécies de *Curvularia*, inclusive *C. lunata*, em amostras de água de lagos que servem para o fornecimento de água potável,

atividades domésticas e piscicultura na cidade de Bhopal, em Madhya Pradesh na Índia. Em outra cidade Indiana, Tiruchirappalli, em Tamil Nadu, também foi reportada a presença de *C. lunata* em sistemas de água doce (Smily et al. 2014). Em um estudo realizado por Pontara et al (2011), foi verificado a presença de *Curvularia* spp. em uma amostra de água mineral, de marca empresarial comercializada em São Paulo, no Brasil. *C. lunata* também foi encontrada em amostra de solo de jardim no Cairo, Egito (Zaki et al. 2011) e solo de cultivo de Batata em Guangdong, na China (Hu et al. 2011), e causando manchas escuras na folha da planta Jurubeba (Assunção et al. 2006) e doença em Gengibre Abacaxi (*Tapeinochilus ananassae*) no estado de Alagoas, Brasil (Furtado et al. 2007). Além disso, *Curvularia* sp. já foi encontrada em erva de *Peumus boldus* (Boldo) (Santos et al. 2013). *C. affinis* foi isolada causando mancha em folhas (Huang et al. 2004) e em solo (Zhang et al. 2012).

O ambiente salino, tal como água do mar é o nicho natural da espécie *Hortaea werneckii* (Zalar, de Hoog & Gunde-Cimerman, 1999). Porém neste estudo, a espécie foi identificada em 4 amostras de água de consumo (caixa d'água), ou seja, água doce. Cantrell, Casillas-Martínez & Molina (2006) encontraram *C. lunata* e *H. werneckii*, em água hipersalina de lagoas superficiais de água do mar criadas para produção de NaCl em Cabo Rojo, Porto Rico. *H. werneckii* também foi encontrada em amostras de água hipersalina do Mar Morto, no Oriente Médio (Mbata, 2008).

5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS MELANIZADOS AMBIENTAIS E DE ORIGEM CLÍNICA

Foram analisados os isolados com colônias de coloração esverdeada, amarronzadas ou negras e com reverso escuro, filamentosas, leveduriformes e colônias que inicialmente se apresentaram na forma leveduriforme, mas com o passar dos dias revelaram característica filamentosa (Figura 5).

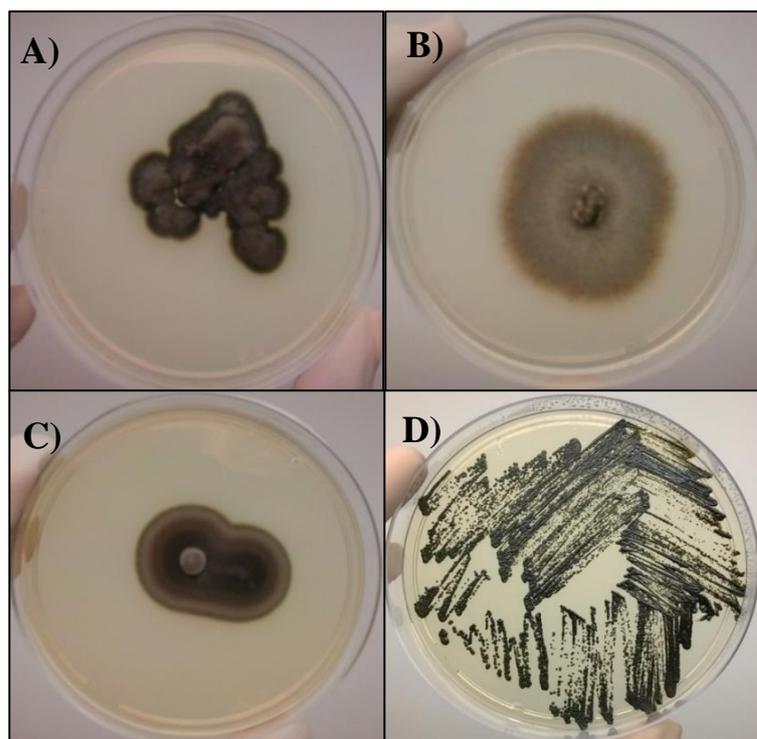


Figura 05: Colônias em meio de cultura. *Cyphellophora guyanensis* (A), *Curvularia lunata* (B), *Coniosporium* sp. (C) e *Hortaea werneckii* (D).

A identificação micromorfológica foi realizada com auxílio de chave de identificação através do “Atlas of Clinical Fungi” (de Hoog et al. 2014). O microcultivo foi realizado para os isolados ambientais e permitiu melhor observação das estruturas fúngicas (Figura 06).

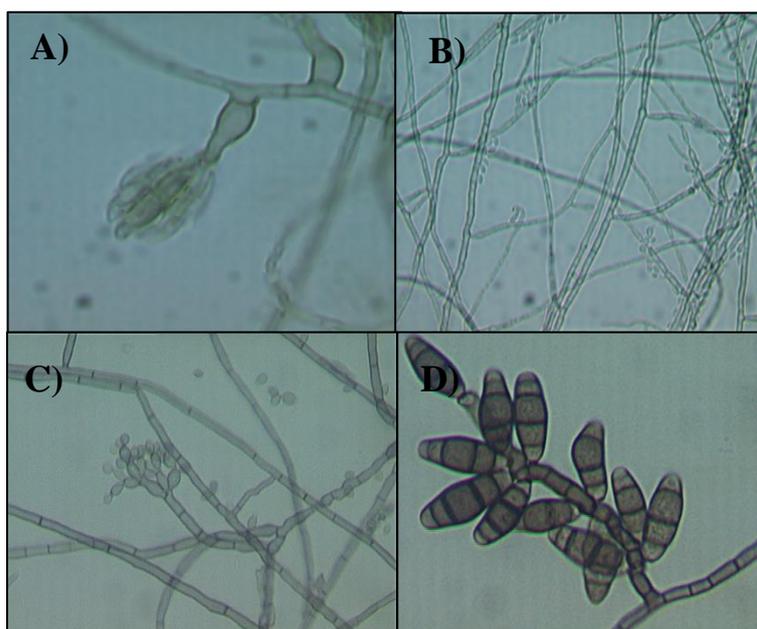


Figura 06: Micromorfologia dos isolados. *Cyphellophora* sp.-100x (A), *Exophiala oligosperma* – 40x (B); *Fonsecaea brasiliensis* – 40x (C), *Curvularia* sp. – 100x (D).

Os isolados clínicos utilizados na pesquisa e seus respectivos locais de depósito estão dispostos no quadro 02. Estes foram previamente identificados pela morfologia nos laboratórios onde estavam originalmente depositados.

COLEÇÃO MICOLÓGICA	CÓDIGO DA AMOSTRA E IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA
Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA (Isolados de infecções subcutâneas)	B-05 (<i>Fonsecaea</i> sp.), HC.241 (<i>Exophiala</i> sp.), B-07 e B-44 (<i>Cladosporium</i> sp.)
Fundação Alfredo da Mata – FUAM (isolados de pacientes com Cromoblastomicose)	E.R.A 964/14, J.A 703/12, 1401, R.A.M 557/05, D.C.R 659/44 e M.R.F 715 (<i>Fonsecaea pedrosoi</i>)
Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado – FMT-HVD (isolados de pacientes com Cromoblastomicose)	1156 e 5696 (<i>Fonsecaea pedrosoi</i>)

Quadro 02: Isolados clínicos provenientes de Coleções Micológicas do Amazonas.

Os 58 fungos melanizados ambientais e os isolados clínicos foram submetidos à análise molecular por sequenciamento da região ITS. Essa região é utilizada para a análise molecular de fungos melanizados por apresentar maior taxa de mutação do que 18S, 28S do DNAr (Abliz et al. 2004). Desta forma, os isolados foram primeiramente submetidos à extração de DNA e posterior amplificação pelos primers V9G e LS266, que amplifica a região ITS1 - 5,8S - ITS2 do DNAr. A eletroforese em gel de agarose revelou bandas em uma altura de 900 a 1500 pb (figuras 07, 08 e 09). Apesar dos iniciadores de escolha terem sido bem-sucedidos na amplificação da maioria dos isolados, alguns não amplificaram, sugerindo necessidade de modificações nas condições da PCR ou problemas na qualidade do DNA extraído.

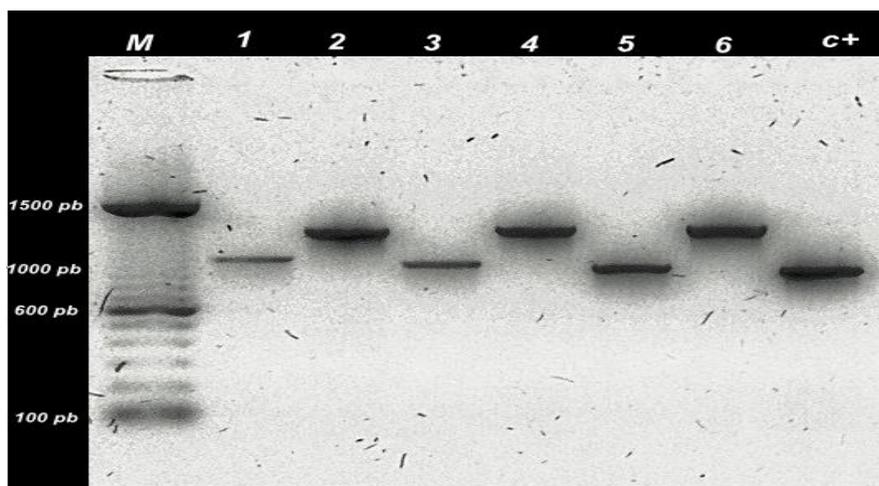


Figura 07: Gel de Agarose dos isolados clínicos provenientes da FUAM. Em seqüência: Marcador Ladder 100pb (M), ERA 964/14 (não sequenciado) (1), *F. pedrosoi* (2), *K. epidermidis* (3), *F. pedrosoi* (4), *Cladosporium* sp. (5), *F. pedrosoi* (6) e Controle positivo – *Candida albicans* (6).



Figura 08: Gel de Agarose dos isolados clínicos provenientes da FMT-HVD e isolados ambientais. Em seqüência: Marcador Ladder 100pb (M), 5696 (não sequenciado) (1), *F. pedrosoi* (2); Isolados do INPA: *F. pedrosoi* (3), *C. sphaerospermum* (4), *Cladosporium* sp. (5), *C. sphaerospermum* (6); Marcador Ladder 100pb (M), isolados ambientais: *Fonsecaea brasiliensis* (7), *Cladophialophora* sp. (8), *C. lunata* (9), *Curvularia* sp. (10), ES14-5D (fungo melanizado) (11) e Marcador Ladder 100pb.

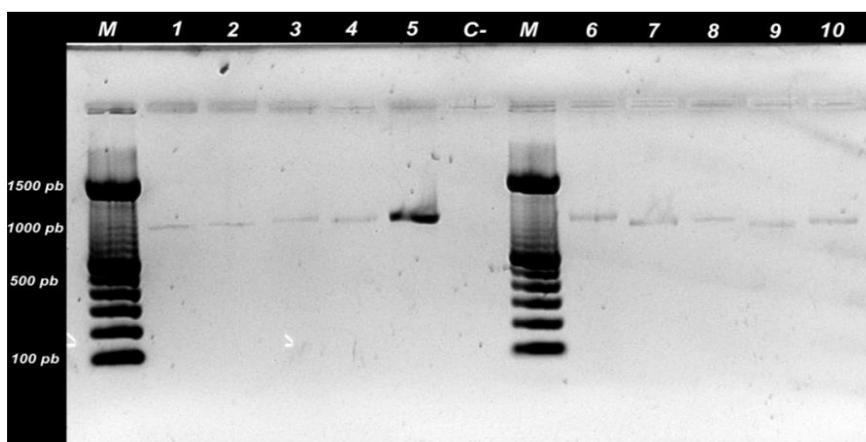


Figura 09: Gel de Agarose dos isolados ambientais. Em seqüência: Marcador Ladder 100pb (M), *H. werneckii* (1), *E. oligosperma* (2); F72B1 (*Exophiala* sp.) (3), *C. guyanensis* (4), *E. brunnea* (5), Controle negativo, Marcador Ladder 100pb (M), *C. immunda* (6), Q72-4 (fungo melanizado) (7), *C. sphaerospermum* (8), *C. cladosporioides* (9), *E. jeanselmei* (10), *C. guyanensis* (11).

Desta forma, somente 43 isolados ambientais foram submetidos à reação de sequenciamento. A identificação morfológica permitiu a caracterização destes isolados em nível de gênero, enquanto o sequenciamento possibilitou a identificação em nível de espécie de 17 isolados.

É de suma importância à utilização de um banco de dados confiável para a análise do sequenciamento de DNA e esta deve conter precisão taxonômica e uma amplitude filogenética, com sequências de fungos patogênicos conhecidos e também sequências de parentes próximos e de fungos saprófitas morfológicamente semelhantes. O banco de dados mais comumente usado é o Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> BLAST), mas apesar deste banco conter um enorme número de sequências a partir de diversas fontes, sua disponibilidade como uma fonte aberta em si possibilita muitos depósitos com nomes de fungos incorretos ou imprecisos e sequências incompletas. Além disso, à medida que a pesquisa taxonômica progride, muitos nomes de espécies tornaram-se obsoletos e muitas espécies podem apresentar nomes diferentes para sua fase assexuada (anamorfo) e sexuada (teleomorfo), não havendo tais atualizações no Genbank (Balajee, Sigler & Brandt, 2007).

Bases de dados mais restritas funcionam como uma alternativa para a não utilização de bases abertas como o Genbank, já que estas contêm somente sequências de isolados com identificação bem validada fenotipicamente e taxonomicamente, pois há um maior controle sobre a qualidade das sequências e estas podem ser atualizadas periodicamente (Balajee, Sigler & Brandt, 2007). Em tais bases de dados inclui-se o banco de dados da CBS (<http://www.cbs.knaw.nl/collections/BioloMICSSequences.aspx>), que possui mais de 100.000 cepas de fungos e bactérias e foi o banco de dados utilizado neste estudo.

Desta forma, as sequências obtidas foram analisadas com pesquisa nos bancos de dados de fungos melanizados do CBS (alinhamentos FUNCBS, UNITED, Yeast,

FUNSTRAI, Indoor, ITSSeq, Bipolaris, PJ, FunBOLD, PYCC) utilizando-se a ferramenta *BioMICS*. As sequências de estudo foram comparadas com sequências de referência depositadas neste banco. Foram consideradas confiáveis valores acima de 95% de similaridade para a identificação dos isolados. O quadro 03 mostra os fungos melanizados ambientais e clínicos identificados em nível de espécie por sequenciamento da região ITS e dados da comparação com a cepa de referência.

Amostra	Identificação por ITS				
	Espécie	Cepa referência	Similaridade (%)	Score (%)	Overlap (%)
F125	<i>Cladophialophora immunda</i>	CBS 109797	97,2	683,93	100
F40	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	CBS 114065	100	1071,43	100
FL12-2A	<i>Cyphellophora guyanensis</i>	Q766433	100	847,95	71,48
GL6-4A	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	JQ768317	100	885,99	100
ES8-5B	<i>Exophiala brunnea</i>	CBS 587.66	99,58	740,17	100
ES12-1A	<i>Cyphellophora guyanensis</i>	JQ766435	100	757,61	100
ES14-3C	<i>Cyphellophora guyanensis</i>	JQ766434	100	760,78	92,65
ES14-5F	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	DTO 109-A1	100	1047,66	100
ES17-2A	<i>Exophiala oligosperma</i>	DTO 244-B8	99,73	1157,02	100
ES22-5A	<i>Exophiala jeanselmei</i>	AJ866273	100	977,92	94,19
MD3-1A	<i>Fonsecaea brasiliensis</i>	CBS 126866	100	892,53	100
A1	<i>Hortaea werneckii</i>	CBS 132931	99,05	660,92	100
A3	<i>Hortaea werneckii</i>	CBS 132931	100	622,89	98,24
A4	<i>Hortaea werneckii</i>	CBS 126986	100	976,33	87,23
A5	<i>Exophiala oligosperma</i>	CBS 132765	100	797,236	98,62

A6	<i>Hortaea werneckii</i>	CBS 126987	100	711,64	100
A9	<i>Curvularia lunata</i>	JX960594	97,75	903,42	94,1
1156*	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	CBS 671.66	99,82	900,25	92,07
B-05*	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	AB733173	100	971,58	100
B-07*	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	MIT51165	100	811,501	71,56
HC241*	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	MIT51165	100	811,50	100
1401*	<i>Knufia epidermidis</i>	EU730589	100	859	87.25
JA 103/12*	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	CBS 129306	100	797,23	100
MRF715*	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	CBS 129306	100	900,25	100
RAM 557/05*	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	AB091205	100	1012,7	100

Quadro 03: Fungos melanizados ambientais e clínicos* identificados em nível de espécie por sequenciamento da região ITS.

Entre os isolados obtidos do solo, F125 foi morfológicamente similar a *Cladophialophora* sp. e molecularmente compatível com a espécie *Cladophialophora immunda*. Outro isolado, F40, revelou-se semelhante com *Cladosporium* sp. pela morfologia, e pela análise molecular mostrou-se similar com *Cladosporium sphaerospermum*. O isolado F72B, foi identificado apenas a nível de gênero através da morfologia e sequenciamento, com similaridade para *Exophiala* sp.

O gênero *Cladophialophora* pertence ao filo *Ascomycota*, subfilo *Ascomycotina*, classe *Pezizocomycotina*, ordem *Chaetothyriales* e família *Herpotrichiellaceae* (de Hoog et al. 2014). O gênero compreende um grupo de espécies com bastante significância clínica. Espécies de *Cladophialophora* possuem características morfológicas semelhantes, o que dificulta sua diferenciação (Abliz et al. 2004).

A espécie *C. immunda* recebeu esse nome devido a sua preferência por ambientes poluídos (Badali et al. 2008). Esta espécie tem crescimento moderadamente lento em meio de cultura, com colônia verde-olivácea escura aveludada, com borda bem definida.

Microscopicamente, possui hifas finas de cor hialina à marrom-pálido que originam conidióforos marrons-pálidos eretos e longos, com ou sem ramificações, septados, e com células conidiogênicas ramificadas de parede lisa e pigmentada, e com conídio unicelular catenulado, sub-hialino à marrom-pálido de parede lisa ou ligeiramente verrucosa, estreitando para as extremidades com cicatrizes pigmentadas pálidas; clamidósporos normalmente ausentes; sem teleomorfo conhecido (de Hoog et al. 2014).

Filogeneticamente a maior parte das espécies deste gênero pertence a um grupo monofilético que compreende duas clades, *Carrionii* (ex: *C. carrioni*, *C. yegresii*) e *Bantiana* (ex: *C. bantiana*, *C. saturnica*, *C. devriesii*) (Badali et al. 2008). Além disso, várias espécies anteriormente classificadas como *Cladosporium* passaram a fazer parte deste gênero (de Hoog et al. 2014), como por exemplo *C. bantiana* que era anteriormente identificada como *Cladosporium bantianum* (Ajantha & Kulkarni, 2011). A análise molecular revelou que anamorfos morfológicamente semelhantes à *Cladophialophora* estão próximos a *Dothideales* e *Capnodiales* (Badali et al. 2008).

O isolado F72F de solo de floresta e o isolado de solo de quintal Q72 não puderam ser identificados pela morfologia, por não haver visualização de estruturas de frutificação, e a análise molecular revelou apenas pertencerem ao Filo *Ascomycota*, ordem *Chaetothyriales*, já o isolado Q22 foi identificado como *Cladophialophora* sp. Os demais isolados (Q78, Q125, Q161, Q184 e Q217) foram identificados apenas através da morfologia como *Cladophialophora* sp., pois não houve amplificação do DNA pelos primers V9G e LS266.

Quanto aos isolados de folhas, o isolado de Açaizeiro (FL10-1A) foi identificado morfológicamente como *Exophiala* sp. e pelo sequenciamento não foi possível determinar gênero e espécie. A análise molecular mostrou a presença de *Coniosporium* sp. em folhas de Cupuaçuzeiro (FL8-2A), de Biribazeiro (FL9-1A), de Mangueira (FL12-1A), além dos isolados de espinhos de Laranjeiras (ES22-5B, ES21-3A e ES21-3B) e de Tangerineira

(ES19-5A). Também se evidenciou a presença de *Cyphellophora guyanensis* em folhas de Mangueira (FL12-2A). Os isolados de espinhos de Laranjeira, ES12-1A e ES14-3C, também foram identificados como *C. guyanensis*.

O gênero *Cyphellophora* pertence ao filo *Ascomycota*, subfilo *Ascomycotina*, classe *Pezizocomycotina*, ordem *Chaetothyriales* e família *Herpotrichiellaceae*. As colônias são geralmente espalhadas e acinzentadas. As hifas possuem paredes finas e escuras, as células conidiogênicas são fiálides intercalares trazendo colaretes laterais finos, ocasionalmente lateralmente ou terminalmente em hifas com colarete apical. Os conídios têm parede fina, inicialmente hialina, tornando-se marrons, septados, em linha reta ou curvada, fusiforme em forma de foice (de Hoog et al. 2014). Filogeneticamente, espécies de *Cyphellophora* e *Phialophora* formam o clado *Europea* (Feng et al. 2012b).

Outros isolados de espinhos, ES9-1A (Maria-fecha-a-porta) e ES22-3B (Laranjeira) revelaram semelhança com *Exophiala* sp. pela morfologia. O sequenciamento mostrou similaridade do isolado de espinho de Limoeiro (ES8-5B) com *E. brunnea*, do isolado de Laranjeira (ES22-5A) com *E. jeanselmei* e do isolado de Tucumanzeiro (ES17-2A) com *E. oligosperma*. Também se verificou a presença de *E. oligosperma* no isolado de água de consumo de caixa d'água (A5).

Exophiala pertence ao filo *Ascomycota*, subfilo *Ascomycotina*, classe *Pezizocomycotina*, ordem *Chaetothyriales* e família *Herpotrichiellaceae*. A maioria das colônias é restrita, viscosa no centro devido ao crescimento leveduriforme, lisa na margem, e tornando-se muitas vezes lanosa ou aveludada, preta-olivácea. As células conidiogênicas são intercalares cilíndricas, ou livres em forma de balão, com zonas aneladas relativamente estreitas e curtas, conídios hialinos de parede fina, muitas vezes cadeias de células esféricas são formadas, e cadeias de células de hifas em forma de barril podem estar presentes. Clamidosporos ou corpos muriformes podem ser formados (de Hoog et al. 2014).

De acordo com de Hoog (1993) espécies do gênero *Exophiala* tem uma forte plasticidade morfológica determinada por condições ambientais, o que lhes permite mudar rapidamente do crescimento leveduriforme, que se dispersa por meio de água, para o crescimento filamentosos e vice-versa. Estas variações morfológicas muitas vezes dificultam a identificação destes fungos em nível de espécie (Porteous, 2003; de Hoog et al. 2014).

Em nível molecular encontrou-se heterogeneidade do complexo *E. jeanselmei*, levando a descrição dos segregados *E. oligosperma*, *E. xenobiótica*, *E. lecanii-corni* e *E. heteromorfa* (de Hoog et al. 2014). *E. brunnea* era considerada sinônimo de *E. salmonis* por razões morfológicas, mas dados moleculares revelaram distinta distância entre as espécies (de Hoog et al. 2011). Zeng et al. (2007) estudou espécies de *Exophiala* com importância clínica verificando grande distância filogenética entre quase todas as espécies analisadas, mesmo aquelas com bastante semelhança morfológica e fisiológica. Cada espécie de *Exophiala* estava claramente individualizada em um ramo independente na árvore filogenética.

Outra espécie de fungo melanizado, *C. cladosporioides*, também foi evidenciada em um isolado de espinho de Laranjeira (ES14-5F). A mesma espécie foi observada em um isolado de galho de Limoeiro (GL6-4A). Além disso, *Cladosporium* sp. também foi encontrado em um isolado de espinho de Tucumanzeiro (ES20-4A).

Os isolados ES11-1A e ES22-2A, de espinhos de Jurubeba e Laranjeira respectivamente, foram determinados pela análise molecular como sendo *Cladophialophora* sp. Para dois isolados de Laranjeira, ES14-5D e ES14-5H, só foi possível através do sequenciamento determinar a ordem a que pertencem, *Chaetothyriales* e *Pleosporales* respectivamente. Outros achados da análise do sequenciamento dos isolados de espinhos (ES17-1A, ES21-1A, ES22-3A) foram inconclusivos.

Os demais isolados de espinho foram identificados somente a nível de gênero através da análise morfológica, sugestiva de *Exophiala* sp. (ES9-1B, ES12-4A, ES22-3B) *Cyphellophora* sp. (ES10-3B, ES17-1B) e *Cladophialophora* sp. (ES12-2A). Nos demais visualizou-se somente hifas escuras sugestivas de fungo melanizado (ES9-1A, ES12-4B, ES14-1D, ES14-1I, ES14-2A, ES14-3B, ES14-4B, ES14-1A, ES19-3B).

Quanto aos fungos isolados da água de consumo (caixa d'água), 4 isolados mostraram-se compatíveis com *Hortaea werneckii* (isolados A1, A3, A4 e A6) através da morfologia e análise molecular. O isolado A2 mostrou-se semelhante a *H. werneckii* através da morfologia.

Hortaea werneckii pertence ao filo *Ascomycota*, subfilo *Ascomycotina*, classe *Pezizocomycotina*, ordem *Capnodiales* e família *Capnodiaceae*. Possui colônias restritas, macias e viscosas, preto-oliváceas. Microscopicamente apresenta hifas que tornam-se densamente septadas na maturação, com parede marrom e espessa e conídios hialinos que tornam-se oliváceo-palidos (de Hoog et al. 2014). É considerada muito próxima ao gênero *Hormonema*, habitante de plantas. Porém, a espécie foi classificada como pertencente ao gênero *Exophiala* após causar a micose chamada de Tinea nigra em seres humanos (de Hoog, 1993), mas atualmente *Exophiala werneckii* está no gênero *Hortaea* (de Hoog et al 2014). Seu ciclo de vida pode incluir fase tipo leveduriforme, hifas e crescimento meristemático e sua propagação pode ser influenciada por condições ambientais (de Hoog, 1993).

Os fungos obtidos de água de poço artesiano mostraram similaridade com o gênero *Curvularia*. O isolado A9 apresentou similaridade com *C. lunata* (A9) e os isolados A10 e A11 tiveram a sua identificação indefinida para espécie por apresentarem resultados aproximados entre *C. affinis* e *C. lunata*.

O gênero *Curvularia* pertence ao filo *Ascomycota*, subfilo *Ascomycotina*, classe *Pezizocomycotina*, ordem *Pleosporales* e família *Pleosporaceae*. Possui colônias negras, expandidas e com hifas aéreas. Os conidióforos são eretos, marrons, multicelulares, produzindo conídio em ordem simpodial, cicatrizes escuras conidiais, conídio elipsoidal e muitas vezes curvado com 3 ou 4 septos. *C. lunata* possui o teleomorfo *Cochliobolus* (de Hoog et al. 2014).

O isolado de madeira em decomposição MD3-1A apresentou similaridade com *Fonsecaea brasiliensis* pela morfologia e sequenciamento e MD3-1B foi identificado apenas pela morfologia como *Cladophialophora* sp. *F. brasiliensis* é uma espécie descrita recentemente por Vicente et al. (2012) e muito próxima ao gênero *Cladophialophora*.

Em relação aos isolados clínicos obtidos de Coleções de Fungos obteve-se os seguintes resultados com o sequenciamento da região ITS: os isolados da FUAM (JA 103/12, MRF715 e RAM 557/05) mostraram similaridade com *Fonsecaea pedrosoi*, resultado compatível com a identificação micromorfológica, assim como os isolados clínicos do INPA (B-05) e da FMT-HVD (1156).

Fonsecaea pertence ao filo *Ascomycota*, subfilo *Ascomycotina*, classe *Pezizocomycotina*, ordem *Chaetothyriales* e família *Herpotrichiellaceae*. Possui colônia restrita, aveludada à cotonosa, preto-olivácea. Células em brotamento ausentes, conidióforo pobremente diferenciado pálido à preto-oliváceo, conídio sem septos crescendo em cadeia curta ou ramificada (de Hoog et al. 2012). Dados moleculares revelaram que *C. compacta* pode ser uma variedade displásica de *F. pedrosoi* (Abliz et al. 2003; de Hoog et al. 2014).

O isolado 1401, também da FUAM, foi identificado pela análise molecular como *Knufia epidermidis*. O gênero *Knufia* pertence ao filo *Ascomycota*, subfilo *Ascomycotina*, classe *Pezizocomycotina*, ordem *Chaetothyriales* e família *Herpotrichiellaceae*. Suas colônias são aveludadas, de cor preta ou marrom escuro a cinza oliváceo com reverso escuro

e crescimento lento. Na microscopia observa-se micélio regularmente e densamente septado, profusamente ramificado em ângulos quase certos, preto-oliváceo ou marrom escuro, com parede lisa ou não. Células gradualmente inchadas com parede muito espessa, conídios formados pela liberação de células formando inchaços elipsoidais ou quase esféricos com parede lisa. Células verdadeiramente muriformes ausentes (de Hoog et al. 2014).

A análise filogenética de *Knufia* indicou que espécies deste gênero eram muito próximas de espécies do gênero *Coniosporium*, o mesmo foi observado quanto ao compartilhamento das mesmas características morfológicas (Tsuneda, Hambleton & Curraha, 2011). A espécie *K. epidermidis* chamava-se *Coniosporium epidermidis* e, recebeu nova nomenclatura em 2008 (de Hoog et al. 2014).

Já os isolados clínicos B-07 e HC241, ambos do INPA, foram identificados como *C. sphaerospermum*. O gênero *Cladosporium* pertence ao filo *Ascomycota*, subfilo *Ascomycotina*, classe *Pezizocomycotina*, ordem *Capnodiales* e família *Cladosporiaceae*. Possui colônia espalhada, verde acinzentada à verde-olivácea com reverso escuro. Conidióforos normalmente presentes, eretos, marrons, com cicatrizes conidiais marron-escuras, conídios de uma a quatro células, marrons-escuro, de parede fina à verrucosa, de onde surgem cadeias ramificadas (de Hoog et al. 2014). Na natureza é um fungo ubíquo, produzindo conídios em cadeia, facilmente levados pelo ar (Asan et al. 2003).

O isolado DCP 659/44 teve resultado molecular indefinido, sendo identificado apenas como *Cladosporium* sp. (similaridade com *C. halotolerans*, *C. sphaerospermum* e *C. cladosporioides*). O mesmo ocorreu com outro isolado clínico (B-44), este proveniente da Coleção de Fungos do INPA, que mostrou ser similar tanto com *C. sphaerospermum* quanto com *C. cladosporioides*. Tal fato se explica pela dificuldade de identificação a nível de espécie devido a grande quantidade de espécies, já que este gênero é um dos mais amplos e heterogêneos entre os melanizados e, suas estruturas são difíceis de distinguir.

Recentes avanços em pesquisas de taxonomia filogenética apontaram a existência de espécies crípticas dentre isolados fúngicos morfologicamente indistinguíveis. Nestes casos de complexos intimamente relacionados são necessários métodos baseados em genotipagem para a diferenciação de tais espécies (Balajee, Sigler & Brandt, 2007).

C. cladosporioides é subdividido em um vasto número de microtaxons e linhagens quase que indistinguíveis morfologicamente (de Hoog et al. 2014), dentre elas estão *C. australiense*, *C. chalastosporoides* e *C. gamsianum* (Bensch, 2010). *C. herbarum* forma um complexo subdividido em pequenas espécies baseadas em mínimas diferenças morfológicas (de Hoog et al. 2014) e baixa distância molecular cuja diferença é revelada apenas por análise de multilocus. São alguns: *C. herbarum* s. Str. (*D. tassiana*), *C. macrocarpum* (*D. macrocarpa*) e *C. bruhnei* (*D. allicina*), tendo *Davidiella* como teleomorfo conhecido (Schubert et al. 2007). Já *C. sphaerospermum* subdividi-se em pequenas espécies que podem ser bem diagnosticadas com beta-tubulina (de Hoog et al. 2014). A maioria dessas espécies tipo *Cladosporium* mostram a halotolerância como característica recorrente, sendo algumas destas *C. dominicanum*, *C. psychrotolerans*, *C. velox*, *C. spinulosum* e *C. halotolerans* (Zalar et al. 2007).

Dois isolados clínicos, sendo um da FUAM (D.C.R 659/44) e um da FMT-HVD (5696), obtiveram sequências com baixa resolução e estas não foram analisadas no Banco de Dados do CBS, necessitando de novo sequenciamento.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FUNGOS MELANIZADOS QUANTO AO CRESCIMENTO EM TEMPERATURA DE 37°C E 40°C

Dos isolados testados, 14 apresentaram crescimento a 37°C. Entre eles, 5 isolados de *Cladophialophora* sp. (Q22, Q125, Q161, Q217, MD3-1B), 1 isolado de *Cyphellophora* sp. (ES17-1B), 1 isolado de *F. brasiliensis* (MD3-1A), 1 isolado de fungo melanizado sem identificação (ES14-3B), 3 isolados de *H. werneckii* (A1, A2 e A3) (Figura 10), 2 isolados

de *Curvularia* sp. (A10 e A11) e 1 isolado de *C. lunata* (A9). Porém, não houve crescimento a 40°C de nenhum dos isolados. De acordo com Satow (2008) os isolados que crescem a 37°C, mas não a 40°C em sua maioria são espécies sapróbias com algum potencial oportunista em seres humanos.

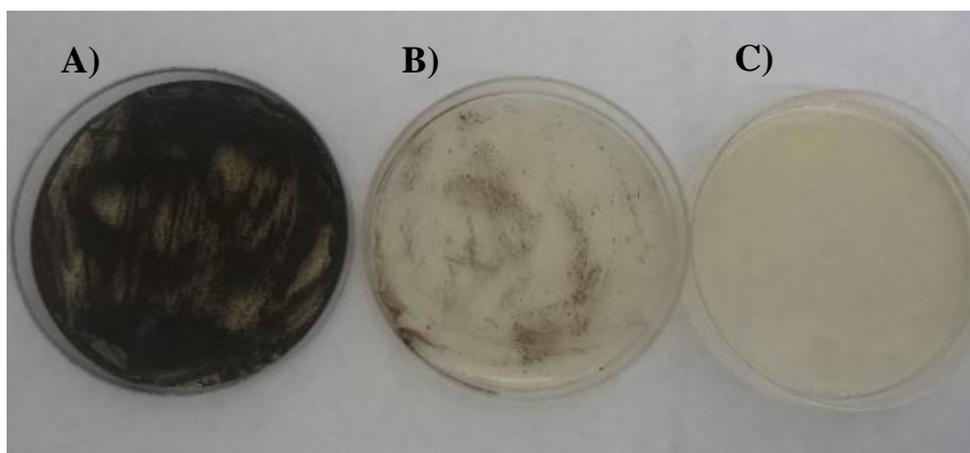


Figura 10: Teste de termotolerância para *Hortaea werneckii* (A1). Crescimento em temperatura ambiente (A), 37°C (B) e 40°C (C).

Badali et al. (2008) testou várias espécies de *Cladophialophora* e, assim como no presente estudo, nenhum isolado apresentou crescimento a 40°C, todas obtiveram crescimento ideal até 30°C. Vicente et al. (2001), também evidenciou a ausência de crescimento de um fungo conhecido por crescer à 40°C, *C. bantiana*. A temperatura máxima de crescimento da *C. immunda* é de 37 °C (de Hoog et al. 2014), não havendo crescimento a 40°C (Badali et al. 2008). Entretanto, o único isolado de tal espécie obtido neste estudo não foi testado quanto a termotolerância, pois a colônia apresentou retardo no crescimento e não havia possibilidade de repiques.

Além disso, nenhum dos isolados de *Exophiala* apresentaram crescimento a 37°C neste estudo. No entanto, uma das espécies isoladas, *E. jeanselmei*, é considerada termofílica, ou seja, normalmente cresce a uma temperatura mais elevada (Porteous et al. 2003) e de acordo com Liu (2011) cresce a 37°C. Este dado pode indicar uma melhor adaptação do fungo às condições saprófitas. Para de Hoog et al. (2011) outra espécie, *E. brunnea*, cresce no máximo até 33°C, o que corrobora com o resultado obtido neste trabalho.

Satow (2008) selecionou cepas de fungos melanizados para o teste de temperaturas entre 25°C a 37°C, observando que o melhor crescimento ocorreu entre 30-33°C, indicando que os isolados eram mesófilos. Nenhum dos isolados cresceu a 40°C. Cresceram a 37°C cepas de *E. xenobiotica*, *Cladophialophora* sp. e *C. minourae*.

Um isolado de *Cyphellophora* sp. apresentou crescimento a 37°C, porém os isolados de *C. guyanensis* não cresceram a tal temperatura. Para Feng et al. (2012b) esta espécie apresenta crescimento máximo à 33°C.

De acordo com Vicente et al. (2012) a temperatura máxima de crescimento de espécies de *Fonsecaea* isoladas de Caranguejo, inclusive *F. brasiliensis* é de 36°C. Porém o isolado de *F. brasiliensis* obtido no presente estudo apresentou crescimento a 37°C. Desta forma este isolado poderia ser capaz de sobreviver em hospedeiro humano.

A espécie *H. werneckii* geralmente cresce a 36°C (de Hoog, 1993), mas também pode crescer 37°C (de Hoog et al. 2014). Em 2011, Liu afirmou que *E. dermatitidis* e *E. werneckii* (atualmente *Hortaea werneckii*) crescem também a 40°C (Liu, 2011). Ambos os isolados de *H. werneckii* testados apresentaram crescimento a 37°C, mas não a 40°C.

5.4 FUNGOS MELANIZADOS AMBIENTAIS X FUNGOS MELANIZADOS CLÍNICOS

Foi feita uma árvore filogenética dos isolados ambientais e dos isolados clínicos (Figura 11). A partir da análise dessa árvore verificou-se que a maioria dos isolados estudados estão próximos a sua cepa de referência. Mas, pode-se destacar que todos os isolados clínicos de *F. pedrosoi* ficaram agrupados, com exceção de 1 isolado (FMT-1156). O isolado de *E. jeanselmei* (ES22-5A) está mais próximo da cepa de referência de *E. oligosperma* do que de *E. jeanselmei*. Sabe-se que *E. jeanselmei* é uma espécie com heterogeneidade e dela foi segregada a espécie *E. oligosperma*. *K. epidermidis* (1401) foi confirmada pela análise de similaridade, mas na árvore não ficou agrupada com a cepa de referência. Este isolado está num clado com vários isolados com diferentes espécies que não ficaram próximas das cepas de referência. Dessa forma, para estes isolados mais estudos incluindo outros genes poderão auxiliar para uma melhor análise filogenética.

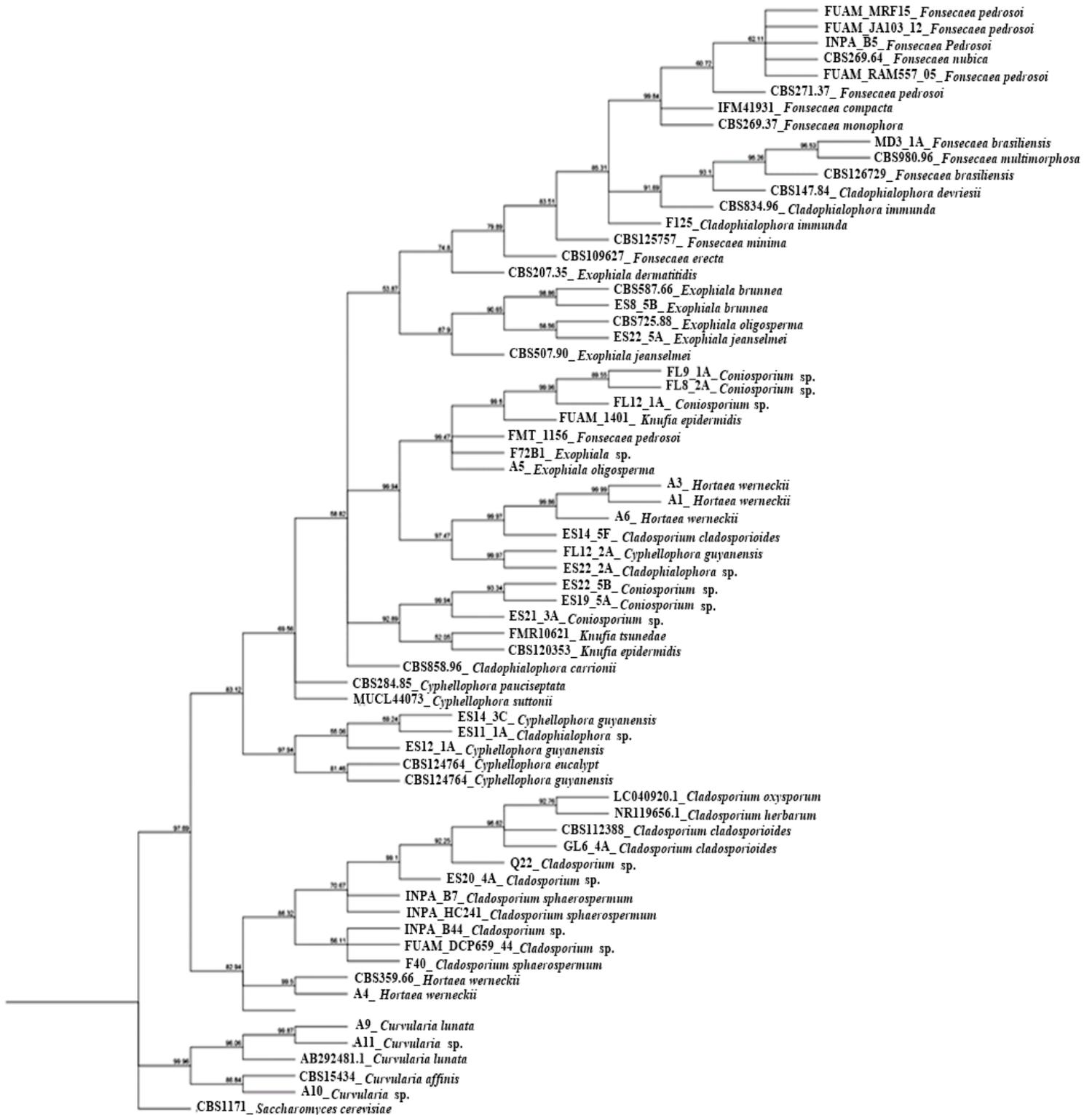


Figura 11: Árvore filogenética dos fungos melanizados ambientais e clínicos a partir da região Espaçadora Interna Transcrita (ITS). O modelo de substituição usado foi o HKY85, com variação gamma (4), 1.000.000 de gerações. Software Geneious 9.0 e plugin MrBayes 3.2.

Todas as espécies identificadas de substratos ambientais neste estudo, por análise molecular, são conhecidas como agentes causadores de doenças em humanos, exceto *F. brasiliensis*, *C. guyanensis* e *E. brunnea*.

F. pedrosoi é a principal responsável pelos casos de Cromoblastomicose na região Amazônica (Silva, Souza & Rozental, 1999; Salgado, 2007). *F. brasiliensis*, apesar de pertencer ao mesmo gênero, somente foi encontrada causando doença em caranguejo (Vicente et al. 2012).

O gênero *Knufia* está envolvido com infecções cutâneas leves que podem ser assintomáticas (de Hoog et al. 2014) e já foi isolado a partir de uma infecção tipo tinea nigra do pé de um paciente. Supõe-se que este fungo pode ser comum em amostras cutâneas, no entanto, não é descartado como possível contaminante (Li et al. 2008). Mas ao que tudo indica, no presente trabalho, esta espécie está sendo isolada pela primeira vez de uma amostra clínica de um paciente com lesão semelhante à Cromoblastomicose. No entanto, trata-se uma espécie nova e mais dados serão necessários para tal confirmação.

A aparente facilidade com que os fungos melanizados causam infecções oportunistas favorece a hipótese de que há compartilhamento de fatores necessários para seu crescimento e dispersão em seu nicho natural, que também facilitam sua sobrevivência no interior do corpo de invertebrados (de Hoog, 1993). No hospedeiro humano, o fungo normalmente entra através de inoculação traumática (Vicente et al. 2008), podendo permanecer no local do trauma por crescimento de hifas, causando lesão local ou se disseminar para outras partes do corpo pela capacidade de reprodução por brotamento, levando a micoses mais graves (de Hoog, 1993).

A presença de melanina, a formação de parede celular espessa, o crescimento meristemático, a potencial presença de fase leveduriforme, a presença de formas adicionais de conidiogênese, termotolerância, adesão, hidrofobicidade e a produção de polissacarídeos extracelulares são características ecológicas importantes destes fungos (de Hoog, 1993).

Vicente et al. (2008) também estudaram amostras ambientais e clínicas (Cromoblastomicose) no estado do Paraná, sul do Brasil, isolando a partir das amostras clínicas, agentes etiológicos tradicionais de Cromoblastomicose (*F. pedrosoi* e *F. monophora*). Porém, a análise molecular revelou que os isolados ambientais eram outros fungos melanizados e em sua maioria, espécies ainda não descritas. O estudo foi realizado com pacientes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR).

O gênero *Cladophialophora* tem sido associado à infecções da pele, disseminadas e também cerebrais. No entanto, todas as espécies deste gênero causam uma micose específica (Badali et al. 2008): *C. immunda* está relacionada a infecção cutânea (de Hoog et al. 2014), *C. carrionii* causa Cromoblastomicose e *C. bantiana* é o mais comum e perigoso fungo neurotrópico capaz de provocar Feomicose cerebral (Ajantha & Kulkarni, 2011).

Já *Cyphellophora* é um gênero que causa micose em pele e unhas (Feng, et al. 2013). Mas, *C. guyanensis* foi encontrada apenas em materiais vegetais ou substratos não-biológicos (Gao et al. 2015).

Espécies de *Exophiala* são responsáveis por uma variedade de enfermidades, inclusive Fibrose cística (Packeu et al. 2012). Espécies termofílicas tais como *E. dermatitidis* e *E. spinifera* foram descritas a partir de infecções sistêmicas em seres humanos (de Hoog et al. 2011). *E. jeanselmei* tem sido envolvida com Eumicetoma, Feomicose cutânea e também Cromoblastomicose e *E. dermatitidis* é um conhecido agente capaz de causar infecção de comprometimento cerebral (Ajantha & Kulkarni, 2011) na Ásia (Matos, et al. 2002).

A espécie *E. oligosperma*, encontrada em amostra de água de consumo neste estudo, já foi encontrada causando Feomicose (Levy et al. 2015), Micetoma, Rinossinusite e infecção cerebral (de Hoog et al. 2014). A significância da água de consumo como via de exposição de espécies de fungos patogênicos não é bem conhecida (DEFRA, 2011) e esta não é descrita como fonte de infecção desses microrganismos (Nucci et al. 2002). Os possíveis problemas

de saúde causados pela presença de fungos em água potável devem estar relacionados à micotoxinas, patogenia em animais e alergias (Gonçalves, 2006).

Um estudo sugeriu a possibilidade da ingestão fúngica como possível fonte de infecção por *E. dermatitidis*, após revelar a presença do fungo em 12 de 2300 amostras de fezes de indivíduos sadios e outros com doença subjacente em Aachen, na Alemanha, Ljubljana, na Eslovênia e Gouda, na Holanda. A espécie foi isolada consecutivamente das fezes diarréicas de uma paciente leucêmica alemã por um período de 3 semanas, o que leva a crer que possivelmente *E. dermatitidis* é capaz de persistir no intestino por longo período em pacientes com predisposição (de Hoog et al. 2005).

E apesar do transporte intestinal de *E. dermatitidis* ainda não ter um significado clínico conhecido, em outro estudo Matos et al. (2002) mostraram a presença de *E. dermatitidis* em casas de banho de vapor e saunas. Nunca foi relatado transporte deste fungo por meio do ar ou vapor de água e não se sabe como tal espécie entra nestas instalações. Desta forma, ressaltou-se novamente a possibilidade de transporte intestinal assintomático e dispersão via transporte anal por humanos (de Hoog et al. 2005).

Neste contexto, outro dado importante ocorreu em um hospital do Rio de Janeiro, onde se isolou *E. jeanselmei* tanto de amostras de pacientes de alto risco com fungemia nosocomial como também da água deionizada da farmácia usada para preparo das soluções antissépticas em um hospital do Rio de Janeiro, Brasil. A análise molecular mostrou relação muito próxima entre os isolados e após suspensão do uso da água deionizada nenhum outro caso de infecção ocorreu na instituição (Nucci et al. 2002).

Além disso, o gênero *Exophiala* tem sido relacionado com infecções em animais aquáticos de sangue frio, como Peixes, Rãs, Sapos, Tartarugas e Caranguejos, assim como em mamíferos como os seres humanos, porém não há relatos de infecções em répteis e aves, que

são animais com vida estritamente terrestre (de Hoog et al. 2011). *E. oligosperma* já foi isolada de lesão de Feomicose da carapaça de uma Tartaruga (Stringer et al. 2009).

O gênero *Curvularia* está associado com Ceratite e Sinusite alérgica (de Hoog, et al. 2014; Kredics et al. 2015). A espécie *C. lunata*, também isolada de água, já foi associada a Onicomiose (Fraenza et al. 2015) e também a Sinusite alérgica (Cavanna et al. 2014), Feomicose subcutânea (Vásquez-del-Mercado, Lammoglia e Arenas, 2013) e Feomicose cerebral (Carter & Boudreaux, 2004). Em 2007, Garg et al. relataram um raro caso de Eumicetoma causado por *Curvularia lunata* na Índia. Outro caso também foi reportado no Sudão, no ano de 1973 (Mahgoub, 1973).

O gênero *Cladosporium* é frequentemente encontrado como um contaminante (de Hoog et al. 2014). Mas tem sido relacionado com Rinite alérgica, Asma (Menezes et al. 2004) e Pneumonite de hipersensibilidade (Kurup, Zacharisen & Fink, 2005). No ano de 2013, Chen et al. relataram o primeiro caso de Meningite aguda (Feomicose cerebral) causada por *C. sphaerospermum*. *C. sphaerospermum* já foi implicado em caso de Úlcera córnea e lesão brônquica e tem sido isolado de lesões de pele e Onicomiose. *C. cladosporioides* é um sapróbio comum transportado pelo ar, frequentemente tido como contaminante. Já foi relatado em caso de infecção pulmonar, infecção cutânea e Feomicose (de Hoog et al. 2014). No nosso trabalho somente a espécie *C. sphaerospermum* foi identificada tanto de amostras clínicas quanto de uma amostra ambiental.

Um estudo realizado no município de Esperatinópolis, Zona dos Cocais, no Maranhão, Brasil, que objetivou avaliar a relação da atividade extrativista de exploração do coco babaçu com a presença de fungos patogênicos, revelou a existência de *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. em várias partes do babaçu e *Cladosporium* sp. na concavidade do coco, assim como em amostras clínicas da conjuntiva de mulheres que trabalhavam como quebradeiras de coco

babaçu. *Cladophialophora* sp. também foi isolada de conjuntiva e *Curvularia* sp. de unha (Nascimento et al. 2014).

Outros estudos também apontaram a presença de *Cladosporium* sp. em amostra de conjuntivas de pacientes portadores de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) no estado de São Paulo (Cha et al. 1990; Santos et al. 1999) e em indivíduos aparentemente saudáveis em São Paulo, Brasil (Cha et al. 1990) e em Babol, no Irã (Soleymani, Sefidgar & Mashmool, 2010).

Fungos melanizados oportunistas em humanos são quase que exclusivamente membros da família *Herpotrichiellaceae* (de Hoog, 1993). Porém, a espécie *H. werneckii*, que pertence a ordem *Dothideales*, cujos fungos são normalmente encontrados em folhas de plantas (de Hoog, 1993) é responsável pela Feomicose superficial e rara Tinea nigra (Nogueira & Junior, 2012). Zalar, de Hoog & Gunde-Cimerman (1999), através de estudo filogenético revelaram que há semelhança ecológica de fatores aparentemente essenciais entre o ambiente salino e o sal da pele humana, o que confirma a hipótese de que este fungo é um comensal alóctone de pele humana, podendo ser transmitido diretamente para as mãos humanas a partir de ambientes salinos, sem haver uma patogenicidade especializada do fungo. Desta forma, a Tinea nigra ocorre por adesão lipofílica à pele humana salgada (Gottlich et al. 1995).

Para de Hoog (1993) a micose também pode ser explicada pela osmotolerância ao invés da patogenicidade. Tal espécie exibe um ciclo de vida complicado, aparentemente adequado para uma sobrevivência tanto em água salgada quanto em ambientes secos, mas somente indivíduos com elevados níveis de sal em suas mãos poderiam desenvolver a micose.

6. CONCLUSÃO

- Nas amostras ambientais estudadas foram isoladas 7 espécies de fungos melanizados (*C. immunda*, *C. sphaerospermum*, *C. cladosporioides*, *E. oligosperma*, *E. jeanselmeii*, *H. werneckii* e *C. lunata*) que já foram citadas na literatura como agentes etiológicos de micoses em humanos;
- A maioria dos isolados foi obtida a partir de espinhos de plantas e o substrato com maior diversidade de fungos recuperados foi espinho de Laranjeira.
- A água de consumo humano é um importante reservatório de fungos melanizados com potencial patogênico;
- A análise molecular por sequenciamento da região ITS não foi suficiente para identificar vários fungos melanizados e não foi capaz de diferenciar alguns isolados de *Cladosporium* entre espécies;
- Isolados de *Cladophialophora* sp., *Cyphellophora* sp., *F. brasiliensis*, fungo melanizado sem identificação, *H. werneckii*, *Curvularia* sp. e *C. lunata* mostraram crescimento a 37°C, demonstrando capacidade de sobrevivência em temperatura corporal humana.
- A identificação molecular dos isolados clínicos obtidos de coleções micológicas de fungos de Manaus (Amazonas) confirmou a identificação morfológica da maioria dos isolados. Porém, dois isolados identificados como *F. pedrosoi* pela morfologia, apresentaram similaridade com *Cladosporium* sp. e *K. epidermidis*.
- *Knuffia epidermidis* é uma espécie conhecida apenas por causar lesões leves em humanos, indicando a possibilidade da presença desta espécie pela primeira vez como causa de lesão semelhante à Cromoblastomicose em Manaus (Amazonas);

- Entre os isolados clínicos estudados somente a espécie *C. sphaerospermum* foi encontrado no ambiente;
- Este trabalho evidencia que os substratos ambientais estudados podem ser fontes de infecção para a ocorrência de micoses causadas por fungos melanizados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABLIZ P, et al. Rapid identification of the genus *Fonsecaea* by PCR with specific oligonucleotide primers. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003; 41 (2); 873 - 8756.

ABLIZ P, et al. Specific oligonucleotide primers for identification of *Cladophialophora carrionii*, a causative agent of chromoblastomycosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004; 42 (1): 404 - 407.

AFSARIAN MH, et al. *Phaeohyphomycosis* due to dematiaceous fungi; a Review of the literatures. *Journal Mazand University of Medical Science*, 2012; 22 (92): 109 - 135.

AJANTHA GS, KULKARNI RD. *Cladophialophora bantiana*, the neurotropic fungus - a Mini Review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 2011; 5 (6): 1301 -1306.

ALVIANO DS, et al. Differentiation of *Fonsecaea pedrosoi* mycelial forms into sclerotic cells is induced by platelet-activating factor. *Research in Microbiology*, 2003; 154 (10): 689 - 695.

ALVIANO DS, et al. Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* induces production of human antifungal antibodies and enhances the antimicrobial efficacy of Phagocytes. *Infection and Immunity*. 2004; 72 (1): 229 - 237.

ANVISA. Manual de Microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde. Edição comemorativa para o IX Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar, 2004; módulo VII, Salvador.

ARAÚJO DP. Determinação das concentrações plasmáticas e teciduais de Itraconazol em pacientes com Cromoblastomicose. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Da Saúde.

ASAN A, et al. Isolation, identification and seasonal distribution of airborne and waterborne fungi in Terkos Lake (Istanbul-Turkey). *Journal of Basic Microbiology*, 2003; 43 (2): 83 - 95.

ASSUNÇÃO IP, et al. Ocorrência de *Curvularia lunata* em Jurubeba no estado de Alagoas. *Summa Phytopathologica*, 2006; 32 (4): 386 - 387.

BADALI H, et al. Biodiversity of the genus *Cladophialophora*. *Studies in Mycology*, 2008; 61: 175 - 191.

BADALI H, et al. *Cladophialophora saturnica* sp. nov., a new opportunistic species of *Chaetothyriales* revealed using molecular data. *Medical Mycology*, 2009; 47 (Special issue): 51 - 62.

BADALI H. Biodiversity, pathogenicity and antifungal susceptibility of *Cladophialophora* and relatives. 2010. 149 f. Tese de Doutorado, University Van Amsterdam, Faculty of Science, Amsterdam.

BALAJEE SA, SIGLER L, BRANDT ME. DNA and the classical way: Identification of medically important molds in the 21st century. *Medical Mycology*, 2007; 45: 475 - 490.

BENSCH K. Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (*Davidiellaceae*, *Capnodiales*). *Studies in Mycology*, 2010; 67: 1 - 94.

BIEDUNKIEWICZ B, SCHULZ U. Fungi of the genus *Exophiala* in tap water - potential etiological factors of phaeohyphomycoses. *Medical Mycology*, 2012. Disponível em: <http://www.oalib.com/paper/2363740#.VhQ4BvIViko>.

BONA E, et al. Chromoblastomycosis in Santa Catarina state, Brazil. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 2010; 62 (3): 254 - 6.

BONIFAZ A, et al. Chromoblastomycosis: clinical and mycologic experience of 51 cases. *Mycoses*, 2001; 44: 1 - 7.

BONIFAZ A, et al. Eumycetoma caused by *Cladophialophora bantiana* successfully treated with Itraconazole. *Medical Mycology*, 2009; 4: 111 - 114.

BURJACK JR. Produção de extrapolissacarídeos e polissacarídeos de parede celular de leveduras negras de interesse clínico. 2010. 75 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) Universidade Federal do Paraná, Departamento de Patologia Básica, Curitiba.

CALIGIORNE RB, et al. Fungos dematiáceos: fungos melanizados que afetam animais, plantas e o homem. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. 1999; 11: 22 - 25.

CALIGIORNE RB, CAMPOLINA SC, LICINIO P. Biodiversidade e taxonomia de fungos melanizados, patógenos humanos. *Micologia: avanços no conhecimento: V Congresso Brasileiro de Micologia*, 2007; 354 - 357. Recife, Pernambuco.

CANTRELL SA, CASILLAS-MARTÍNEZ L, MOLINA M. Characterization of fungi from hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular techniques. *Mycological Research*, 2006; 962 - 970.

CARTER E, BOUDREAUX C. Fatal cerebral Phaeohyphomycosis due to *Curvularia lunata* in an immunocompetent patient. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004; 42 (11): 5419 - 5423.

CAVANNA C, et al. Allergic fungal rhinosinusitis due to *Curvularia lunata*. *New Microbiologica*. 2014; 37 (2): 241 - 5.

CHA SB, et al. Microbiota fúngica conjuntival de pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, 1990; 53 (2): 80 - 90.

CHEN, et al. Acute Meningitis caused by *Cladosporium sphaerospermum*. *American Journal of the Medical Sciences*. 2013; 346 (6): 523-525.

CHOWDHARY A, PERFECT J, DE HOOG GS. Black molds and melanized yeasts pathogenic to humans. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2015; 5 (8): 1 - 21.

CORREIA RTM, et al. Chromoblastomycosis: study of 27 cases and review of medical literature. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 2010; 85 (4): 448 - 54.

COSTA RO. Feohifomicose subcutânea. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 2010; 85 (5): 727 - 728.

CRISTÓVÃO DE, et al. Ocorrência de fungos da família *Dematiaceae* de solo arenoso das praias mais frequentadas de Manaus – Amazonas - Brasil. 1999. Resumo. XX Congresso Brasileiro de Microbiologia. Salvador, Bahia.

DEFRA. A Review of fungi in drinking water and the implications for human health. Department for Environment Food and Rural Affairs (DEFRA). 2011; 164-190. Disponível em: <http://dwi.defra.gov.uk/research/completed-research/reports/dwi70-2-255.pdf>

DE HOOG GS. Evolution of black yeasts: possible adaptation to the human host. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1993; 63: 105 - 109.

DE HOOG GS. Significance of fungal evolution for the understanding of their pathogenicity, illustrated with agents of Phaeohyphomycosis. *Mycoses*, 1997; 40 (2): 5 - 8.

DE HOOG GS, et al. Atlas of Clinical Fungi, 2nd ed. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre Utrecht, the Netherlands and Universitat Rovira i Virgili Reus, 2000a. Spain.

DE HOOG GS, et al. Black fungi: clinical and pathogenic approaches. *Medical Mycology. Supplement 1*, 2000b; 38: 243 - 250.

DE HOOG GS, et al. Intestinal prevalence of the neurotropic black yeast *Exophiala (Wangiella) dermatitidis* in healthy and impaired individuals. *Mycoses*, 2005; 48: 142 - 145.

DE HOOG GS, et al. Waterborne *Exophiala* species causing disease in cold-blooded animals. *Persoonia*, 2011; 27: 46-72.

DE HOOG GS. Ecology and phylogeny of black yeast-like fungi: diversity in unexplored habitats. *Fungal Diversity*, 2014; 65: 1 - 2.

DE HOOG GS, et al. Atlas of clinical fungi: the ultimate bench tool for diagnostic. 2014.

DIXON DM, POLAK-WYSS A. The medically important dematiaceous fungi and their identification. *Mycosis*, 1991; 34 (3): 1 - 18.

DUARTE APM, et al. *In Vitro* Susceptibility of environmental isolates of *Exophiala dermatitidis* to five antifungal drugs. *Mycopathologia*, 2013; 175: 455-461.

ESCOBAR AMV, CASTRO NC. Micetoma. *Revista Ces Medicina*, 2008; 22 (1): 71 - 78.

ESPINEL-INGROFF A, et al. Evaluation of the API 20C yeast identification system for the differentiation of some dematiaceous fungi. *Journal of Clinical Microbiology*, 1989; 27 (11): 2565 - 2569.

ESTERRE P, QUEIROS-TELLES F. Management of chromoblastomycosis: novel perspectives. *Current Opinion in Infectious Disease*, 2006; 19: 148 - 152.

FENG P, et al. *Cyphellophora* and its relatives in *Phialophora*: biodiversity and possible role in human infection. *Fungal Diversity*, 2012a; 65 (1): 17 - 45.

FENG P, et al. In vitro activities of nine antifungal drugs against 81 *Phialophora* and *Cyphellophora* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012b; 56 (11): 6044 - 6047.

FENG P, et al. Identification and typing of isolates of *cyphellophora* and relatives by use of amplified fragment length polymorphism and rolling circle amplification. *Journal of Clinical Microbiology*, 2013; 51 (3); 931 - 937.

FRAENZA LB, et al. Onicomycosis por *Curvularia lunata var. aerea*: presentación de un caso clinic. *Revista Argentina de Microbiologia*. 2015; 47 (1): 54 - 56.

FUCHS J, PECHER S. Partial suppression of cell mediated immunity in Chromoblastomycosis. *Mycopathologia*, 1992; 119 (2): 73 - 76.

FURTADO DCM, et al. Ocorrência de *Curvularia lunata* e *Curvularia eragrostidis* em *Tapeinochilus ananassae* no Estado de Alagoas. *Summa Phytopathologica*, 2007; 33 (2): 201.

GAO L, et al. Three new species of *Cyphellophora* (*Chaetothyriales*) associated with sooty blotch and flyspeck. *Plos One*, 2015; 10 (9): 1 - 21.

GERRITS VAN DEN ENDE AHG, DE HOOG GS. Variability and molecular diagnostics of the neurotropic species *Cladophialophora bantiana*. *Studies in Mycology*, 1999; 43: 151 - 162.

GONÇALVES AB. Survey and significance of filamentous fungi from tap water. *International Journey of Hygiene and Environmental Health*, 2006; 209: 257 - 264.

GOTTLICH E, et al. Cell-surface hydrophobicity and lipolysis as essential factors in human tinea nigra. *Mycoses*, 1995; 38: 489 - 494.

GUERRA RS. Prospecção das espécies de fungos melanizados associados à doença do Carangueijo Letárgico (DCL) no litoral do estado da Bahia. 2010. 45 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia), Universidade Federal do Paraná, Departamento de Patologia Básica, Curitiba.

HAASE G, et al. Phylogenetic inference by SSU gene analysis of members of the *Herpotrichiellaceae* with special reference to human pathogenic species. *Studies in Mycology*, 1999; 43: 80 - 97.

HAGESKAL G, et al. Diversity and significance of mold species in Norwegian drinking Water. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006; 7586 - 7593.

HARRIS JE, et al. *Exophiala spinifera* as a cause of cutaneous Phaeohyphomycosis: case study and review of the literature. *Medical Mycology*, 2009; 47: 87 - 93.

HAYETTE MP, et al. Filamentous fungi recovered from the water distribution system of a Belgian university hospital. *Medical Mycology*, 2010; 48: 969 - 974.

HORRÉ R, DE HOOG GS. Primary cerebral infections by melanized fungi: a review. *Studies in Mycology*, 1999; 43: 176 - 193.

HU X, et al. Phylogenetic analysis of dematiaceous fungi isolated from the soil of Guangdong, China. *African Journal of Microbiology Research*, 2011; 5 (20); 3310 - 3316.

HUANG JB, et al. First Report of leaf spot caused by *Curvularia affinis* on *Festuca arundinacea* in Hubei, China. *Plant Disease*, 2004; 88 (9): 253.

IBRAHIM-GRANET O, BIEVRE C, JENDOUBI M. Immunochemical characterization of antigens and growth inhibition of *Fonsecaea pedrosoi* by species-specific IgG. *Journal of Medical Microbiology*, 1988; 26: 217 - 222.

KAJISHIMA AK. Estudo da biogênese dos melanossomas e o controle da síntese da melanina pelo inibidor triciclazol nos fungos demáceos *fonsecaea pedrosoi* e *wangiella dermatitidis*. 2009. 22 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia), Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Colegiado de Ciências Biológicas e da Saúde, Rio de Janeiro.

KANTARCIOGLU AS, DE HOOG GS. Infections of the central nervous system by melanized fungi: a review of cases presented between 1999 and 2004. *Mycoses*, 2003; 47: 4 - 13.

KEJŽAR A, et al. Melanin is crucial for growth of the black yeast *Hortaea werneckii* in its natural hypersaline environment. *Fungal Biology*, 2013; 117 (5), 368 - 379.

KIDD SE, et al. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the pacific northwest of the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007; 73(5): 1433 - 1443.

KIMURA TFE. Análise da capacidade migratória de células dendríticas na Cromoblastomicose experimental. 2012. 81 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Farmácia), Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo.

KREDICS L, et al. Filamentous fungal infections of the cornea: a global overview of epidemiology and drug sensitivity. *Mycoses*, 2015; 58: 243 - 260.

KURUP VP, ZACHARISEN MC, FINK JN. Hypersensitivity Pneumonitis. *The Indian journal of Chest Diseases & Allied Sciences*, 2005; 48; 115 - 128.

LACAZ et al. Tratado de Micologia Médica Lacaz. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 2002; 44 (5), São Paulo.

LANGFELDER K, et al. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 2003; 38 (2): 143 - 158.

LEVY AC, et al. A case of phaeohyphomycosis caused by *Exophiala oligosperma* in a renal transplant patient successfully treated with posaconazole. *American Journal of Infectious Diseases*, 2015; 11 (1): 15 - 19.

LI DM, et al. *Coniosporium epidermidis* sp. nov., a new species from human skin. *Studies in Mycology*, 2008; 61: 131 - 136.

LI DM, et al. Fatal *Exophiala* infections in China, with a report of seven cases. *Mycoses*, 2010, 54: 136 - 142.

LIU D. Molecular detection of human fungal pathogens. CRC Press, 2011; 248 - 249.

MACHOUART M, et al. Use of ribosomal introns as new markers of genetic diversity in *Exophiala dermatitidis*. *Fungal Biology*, 2011; 115: 1038 - 1050.

MAHGOUB ES. Mycetomas caused by *Curvularia lunata*, *Madurella grisea*, *Aspergillus nidulans*, and *Nocardia brasiliensis* in Sudan. *Sabouraudia*, 1973; 11 (2): 179 - 82.

MARQUES SG, et al. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the shell of the babassu coconut (*Orbignya phalerata* Martins) in the Amazonic region of Maranhão, Brazil. *Japanese Journal of Medical Mycology*. 2006; 47: 305 - 311.

MARTINEZ RL, TOLVAR LJM. Chromoblastomycosis. *Clinics in Dermatology*, 2007; 25: 188 - 194.

MATOS T, et al. High prevalence of the neurotrope *Exophiala dermatitidis* and related oligotrophic black yeasts in sauna facilities. *Mycoses*, 2002; 45: 373 – 377.

MATTE SMW, et al. Cromoblastomicose no Rio Grande do Sul: relato de 12 casos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 1997; 30 (4): 309 - 311.

MBATA TI. Isolation of fungi in hyper saline dead sea water. *Sudanese Journal of Public Health*, 2008; 3 (4): 170 - 172.

MENEZES EA, et al. Airborne fungi isolated from Fortaleza city, state of Ceará, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical De São Paulo*, 2004; 46 (3): 133 - 137.

MINOTTO R. Respostas polares à infecção pela Cromoblastomicose antes e após as terapias. 2009. 111 f. Tese (Doutorado em Medicina: Ciências Médicas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Porto Alegre.

NAJAFZADEH MJ, et al. Genetic diversity and species delimitation in the opportunistic genus *Fonsecaea*. *Medical Mycology*, 2011; 47 (special issue): 17 - 25.

NASCIMENTO MDSB, et al. Eco-epidemiologic study of emerging fungi related to the work of babaçu coconut breakers in the state of Maranhão, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2014; 47 (1): 74 - 78.

NASCIMENTO MMF. Ecologia molecular de leveduras negras. 2013. 82 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia), Universidade Federal do Paraná, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Curitiba.

NEUFELD PM. Manual de micologia médica: técnicas básicas de diagnóstico. Programa Nacional de Controle de Qualidade, 1999; 74 -75, Rio de Janeiro.

NISHIMURA K, et al. Fungi in bathwater and sludge of bathroom drainpipes. 1. Frequent isolation of *Exophiala* species. *Mycopathologia*, 1987; 97: 17 - 23.

NOGUEIRA NQ, JÚNIOR EPN. Tinea nigra na cidade de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. *Revista Científica da Faculdade de Medicina de Campo*, 2012; 7 (2); 20 - 24.

NUCCI M, et al. Nosocomial outbreak of *Exophiala jeanselmei* fungemia associated with contamination of hospital water. *Clinical Infectious Diseases*, 2002; 34: 1475 - 80.

PACKEU A, et al. Molecular typing and antifungal susceptibility of *Exophiala* isolates from patients with cystic fibrosis. *Journal of Medical Microbiology*, 2012; 61: 1226 - 1233.

PAN HQ, et al. Diversity analysis of soil dematiaceous hyphomycetes from the Yellow river source area: I. *Journal of Zhejiang University Science*, 2008; 9 (10): 829 - 834.

PAPENDORF MC. The soil mycoflora of an *Acacia* karroo community in the western Transvaal. *Bothalia*, 1976; 12 (1): 123 - 127.

PARENTE et al. Subcutaneous phaeohyphomycosis in immunocompetent patients: two new cases caused by *Exophiala jeanselmei* and *Cladophialophora carrionii*. *Mycoses*, 2009; 54: 265 - 269

PINTO MR, BARRETO-BERGTER A, TABORDA CP. Glycoconjugates and polysaccharides of fungal cell wall and activation of immune system. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2008; 39: 195 - 208.

PIRES CAA, et al. Clinical, epidemiological and mycological report on 65 patients from the eastern Amazon region with chromoblastomycosis. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 2012; 87 (4): 555 - 60.

PONTARA AV, et al. Microbiological monitoring of mineral water commercialized in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2011; 42: 554 - 559.

PORTEOUS, et al. Identification of *Exophiala mesophila* Isolated from treated dental unit waterlines. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003; 41 (8); 3885 - 3889.

QUEIROZ-TELLES, et al. Subcutaneous mycoses. *Infectious Disease Clinics of North America*, 2003; 17: 59 - 85.

QUEIROZ-TELLES F, et al. Mycoses of implantation in Latin America: an overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Medical Mycology*, 2011; 49: 225 - 36.

REFAI M, EL-YAZID HÁ. Monograph on dematiaceous fungi: a guide for description of dematiaceous fungi of medical importance, diseases caused by them, diagnosis and

treatment. Department of microbiology, faculty of veterinary medicine, Cairo University 2014. Disponível em:

http://scholar.cu.edu.eg/?q=hanem/files/monograph_on_dematiaceous_fungi.pdf

REIS NR. Morcegos da região de Manaus e suas relações com fungos patogênicos. Semina, 1982; 12 (3): 255 - 262.

REVANKAR SG. Dematiaceous fungi. Mycosis, 2007; 50 (2): 91 - 101.

REVANKAR SG. Clinical and treatment aspects of brown-black fungi. Current Fungal Infect Report, 2010; 4: 46 - 51.

REVANKAR SG, SUTTON DA. Melanized fungi in human disease. Clinical Microbiology, 2010; 23 (4): 884 - 928.

REVANKAR SG. Epidemiology of black fungi. Current Fungal Infect Report, 2012; 6: 283 - 287.

RIBEIRO EL, et al. Cromoblastomicose: doença presente na realidade populacional brasileira. Revista Brasileira de Análises Clínicas, 2006; 38 (3): 189 - 192.

ROZENTAL S, ALVIANO CS, SOUZA W. The in vitro susceptibility of *Fonsecaea pedrosoi* to activated macrophages. Mycopathologia, 1994; 126: 85 - 91.

SAHAY S. Environment-isolates of black yeasts from Ekant Park. Biomedical & Pharmacology Journal, 2013; 6 (2): 395 - 397.

SALGADO CG, et al. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of Chromoblastomycosis. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 2004; 46 (1).

SALGADO CG. Amazônia: desafio nacional: SBPC 2007: Simpósio patologia tropical. Anais da 59ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 2007. Belém, Pará. Disponível em: <http://www.sbpcnet.org.br/livro/59ra/pdf/Salgado.pdf>

SANTOS PM, et al. Microbiota fúngica conjuntival: estudo comparativo entre pacientes com AIDS, pacientes infectados pelo HIV e pacientes HIV-negativos antes da era do HAART. Arquivos Brasileiros de Oftalmologia, 1999; 62 (6): 731 - 734.

SANTOS RL, et al. Contaminação fúngica de plantas medicinais utilizadas em chás. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 2013; 34(2): 289 - 293.

SATOW MM, et al. Selective factors involved in oil flotation isolation of black yeasts from the environment. Studies in Mycology, 2008; 61: 157 - 163.

SATOW MM. Avaliação do método de Iwatsu et al., (1981) para isolamento de leveduras negras do solo, degradadoras de hidrocarbonetos. 2008. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”, Instituto Unesp de Biociências - Rio Claro, São Paulo.

SCHUBERT K, et al. Biodiversity in the *Cladosporium herbarum* complex (*Davidiellaceae*, *Capnodiales*), with standardisation of methods for *Cladosporium* taxonomy and diagnostics. Studies in Mycology, 2007; 58: 105 - 156.

SIDRIM JJC, ROCHA MFG. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Guanabara-Koogan, 2004; 102 - 110 e 193 - 203.

SILVA ACCM, et al. Cromoblastomicose produzida por *Fonsecaea pedrosoi* no estado do Maranhão. i – aspectos clínicos, epidemiológicos e evolutivos. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 1992; 25 (1): 37 - 44.

SILVA CMP, et al. O Babaçu (*orbignya phalerata martins*) como provável fator de risco de infecção humana pelo agente da Cromoblastomicose no estado do Maranhão, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 1995; 28 (1): 49 - 52.

SILVA JP, SOUZA W, ROZENTAL S. Chromoblastomycosis: a retrospective study of 325 cases on Amazonic region. Mycopathologia, 1999; 143: 171 - 175.

SILVA JP, et al. Comparison of *Fonsecaea pedrosoi* sclerotic cells obtained in vivo and in vitro: ultrastructure and antigenicity. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2002; 33: 63 - 69.

SILVEIRA F, NUCCI M. Emergence of black moulds in fungal disease: epidemiology and therapy. Current opinion in Infectious Diseases, 2001; 14: 679 - 684.

SMILY JMB, et al. Fungal abundance and diversity in two contrasting freshwater systems of Tiruchirappalli, Tamil Nadu, India. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 2014; 3 (7): 817 - 828.

SOLEYMANI A, SEFIDGAR AA, MASHMOOL M. Fungal normal flora of conjunctiva in healthy individuals in Babol, northern Iran. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 2010; 12 (2): 198 - 199.

STRINGER EM, et al. Phaeohyphomycosis of the carapace in an alibaba tortoise (*geochelone gigantea*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 2009; 40 (1): 160 - 167.

SUTTON DA, RINALDI MG, SANCHE SE. Dematiaceous fungi. *Clinical Mycology*. Elsevier. 2009, 2 (14): 329 - 354.

TALHARI S, et al. Micoses profundas na Amazônia - estudo dos casos diagnosticados em Manaus, estado do Amazonas, no período de 1973 a 1978. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 1980; 55(3).

TALHARI S, et al. Deep mycoses in Amazon region. *International Journal of Dermatolatology*. 1988; 27 (7): 481 - 4.

TEIXEIRA MFS, JACKISCH-MATSUURA AB, SOARES CSS. *Micologia médica manual de laboratório*. Editora da Universidade do Amazonas, 1999; 28.

TSUNEDA A, HAMBLETON S, CURRAH BRS. The anamorph genus *Knufia* and its phylogenetically allied species in *Coniosporium*, *Sarcinomyces*, and *Phaeococcomyces*. *Botany*, 2011, 89 (8): 523 - 536.

VÁSQUEZ-DEL-MERCADO E, LAMMOGLIA L, ARENAS R. Subcutaneous phaeohyphomycosis due to *Curvularia lunata* in a renal transplant patient. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 2013; 30 (2): 116 - 118.

VERMA P, SINGH S e SINGH R. Seven species of *Curvularia* isolated from three lakes of Bhopal. *Advances in life science and technology - selected from International Conference on Recent Trends in Applied Sciences with Engineering Applications*, 2013; 8.

VICENTE, VA. Isolamento e caracterização de fungos da Cromoblastomicose. 2000. 181 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola), Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, São Paulo.

VICENTE VA, et al. Isolation of *Herpotrichellacious* fungi from the environment. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2001; 32: 47 - 5.

VICENTE VA, et al. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. *Studies in Mycology*, 2008; 61: 137 - 144.

VICENTE VA, et al. Black yeast-like fungi associated with lethargic crab disease (LCD) in the mangrove-land crab, *Ucides cordatus* (*Ocypodidae*). *Veterinary Microbiology*, 2012; 158: 109 - 122.

VICENTE VA, et al. Environmental siblings of black agents of human Chromoblastomycosis. *Fungal Diversity*. 2013.

WHITE TJ, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, USA, 1990.

ZAKI SM, et al. Biodiversity of Phaeohyphomycotic agents in public gardens in Cairo vicinities, Egypt. *Journal of Basic & Applied Mycology*, 2011; 2: 29 - 36.

ZALAR P. et al. Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments. *Studies in Mycology*, 2007; 58: 157 - 183.

ZALAR P, DE HOOG GS, GUNDE-CIMERMAN N. Ecology of halotolerant dothideaceous black yeast. *Studies in micology*, 1999; 43: 38 - 48.

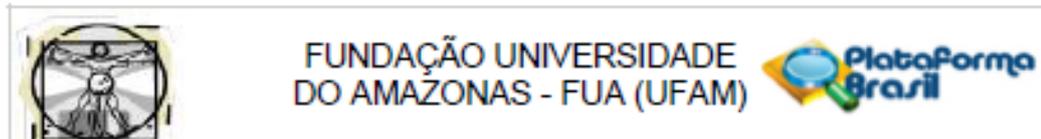
ZALAR P. et al. Dishwashers - a man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens. *Fungal Biology*, 2011; 115 (10); 997 - 1007.

ZENG JS, et al. Spectrum of clinically relevant *Exophiala* species in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007; 45 (11): 3713 - 3720.

ZHANG H, et al. Two new metabolites from a soil fungus *Curvularia affinis* strain HS-FG-196. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2012; 14 (11).

ZOLNERKEVIC I. O lado negro das leveduras. *Revista Unesp Ciência*, 2011, 21: 26 - 28.

ANEXO I



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ASPECTOS SOCIOAMBIENTAIS E AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS CLÍNICAS E AMBIENTAIS NA COMUNIDADE RURAL SERRA BAIXA, MUNICÍPIO DE IRANDUBA - AM

Pesquisador: ANI BEATRIZ JACKISCH MATSUURA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 03511712.2.0000.5020

Instituição Proponente: CENTRO DE PESQUISAS LEONIDAS E MARIA DEANE - FUNDACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 127.040

Data da Relatoria: 22/10/2012

Apresentação do Projeto:

RESUMO: Trata-se de um estudo integrado da avaliação de aspectos sociais e biológicos na comunidade rural Serra Baixa no município de Iranduba - Amazonas, especificamente das condições socioambientais e de patógenos provenientes de fezes da população e do ambiente peridomiciliar (água e solo). O conhecimento dos principais patógenos causadores de doenças nessa comunidade possibilitará determinar ações para a diminuição da prevalência destes, dentre essas ações, é levar maior conhecimento a população através dos Agentes de Saúde que serão capacitados. Além de conhecer a realidade atual dessa comunidade e criar indicadores sobre o processo saúde-doença espera-se que futuramente essas informações contribuam para determinar alterações advindas da construção da Ponte Rio Negro.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Estudar aspectos socioambientais da comunidade rural Serra Baixa no município de Iranduba/AM, observando principalmente as condições sanitárias e a identificação de patógenos dentre a população e no ambiente.

Objetivo Secundário:

Analisar as condições socioambientais e econômicas, visando identificar fatores que podem estar influenciando no processo saúde-doença da comunidade; Avaliar o acesso das pessoas da comunidade aos serviços de saúde e de saneamento básico; Conhecer as representações da

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.057-070

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-5130

Fax: (92)3305-5130

E-mail: cep@ufam.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
DO AMAZONAS - FUA (UFAM)



população sobre os aspectos relacionados às condições de vida da população e os impactos gerados na saúde; Avaliar a qualidade da água consumida pela comunidade com base na quantificação de coliformes totais e termotolerantes (fecais); Investigar os agentes bacterianos patogênicos provenientes de fezes diarreicas dos moradores selecionados para o estudo; Estimar a prevalência da Infecção por enteroparasitas na comunidade; Estudar a microbiota presente no solo e água com o intuito de avaliar potenciais fontes de infecção de fungos patogênicos; Identificar taxonomicamente espécies fúngicas patogênicas dos gêneros *Cryptococcus*, *Aspergillus* e dermatófitos Isolados do solo e/ou da água; Propor estratégias que visem à melhoria da qualidade de vida da população da área de estudo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

As coletas poderão dar um leve desconforto, sem maiores riscos. Mas se porventura houver, estes serão minimizados pelo pesquisador. Todo o material utilizado na coleta será descartável, esterilizado e seguro, obedecendo às normas de vigilância sanitária. Este estudo contribuirá para o conhecimento dos principais patógenos causadores de doenças na comunidade e possibilitará determinar ações para a diminuição da prevalência destes.

Benefícios:

Este estudo contribuirá para o conhecimento dos principais patógenos causadores de doenças na comunidade e possibilitará determinar ações para a diminuição da prevalência destes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

METODOLOGIA: Estudo descritivo e de pesquisa-ação com a finalidade de conhecer a prevalência de organismos patogênicos dentre a população

e o ambiente e, as condições sócioambientais da comunidade. **Local:** A comunidade de Serra Baixa está localizada a 3° 12' 4" Sul, 60° 10' 42"

Oeste a 30Km de Manaus, na zona rural do município de Iranduba, área metropolitana de Manaus. Tem acesso atualmente por via terrestre. Possui

uma população de aproximadamente 230 famílias e em torno de 1000 habitantes. **Levantamento socioambiental:** A metodologia adotada nesta etapa

do estudo será a pesquisa-ação, cuja concepção e realização ocorre em associação com ações que visem à solução de problemas coletivos,

envolvendo os pesquisadores e os atores sociais inseridos no problema de forma cooperativa e participativa.

As ações e os problemas investigados

Endereço: Rua Teresina, 4950		CEP: 69.057-070
Bairro: Adrianópolis		
UF: AM	Município: MANAUS	
Telefone: (92)3305-5130	Fax: (92)3305-5130	E-mail: cep@ufam.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
DO AMAZONAS - FUA (UFAM)



devem ser definidos a partir do interesse e das necessidades identificadas, envolvendo a produção de conhecimentos (Thiolent, 2000). Serão utilizadas como técnicas de pesquisa: questionários, entrevistas, grupo focal, mapa falante para identificação de problemas e anseios e a observação participante. Os dados serão analisados a partir de uma abordagem quanti-qualitativa. a) Primeira fase: Serão investigados e analisados dados secundários sobre aspectos econômicos, sociais, ambientais e sobre o perfil de saúde (morbidade e mortalidade). A partir destes dados será feito um diagnóstico situacional da comunidade. b) Segunda fase: Trabalho de campo: O trabalho de campo será precedido de reunião com a comunidade local para apresentação dos objetivos da pesquisa. Nesta fase será realizado o estudo qualitativo com a utilização das técnicas de observação participante, reuniões, grupo focal e entrevistas semi-estruturadas, cujo objetivo será descrever a realidade a partir da fala dos próprios comunitários, aqui denominados sujeitos da pesquisa, privilegiando a compreensão dos seus significados e explicações (Trajano et al., 1998). A realização de reuniões comunitárias, aplicação de questionários e entrevistas será documentada com o auxílio de gravador e máquina fotográfica, gerando arquivos em formatos digitais. Levantamento parasitológico, bacteriológico e micológico: Exame parasitológico: Isolamento bacteriano das fezes diarreicas: Análise da água consumida pela comunidade: Quantificação de coliformes totais e termotolerantes (fecais) e Análise de fungos Análise do solo peridomiciliar: Análise de fungos - dermatófitos e Isolamento de Cryptococcus e Aspergillus Identificação dos fungos Tipagem molecular das espécies de fungos isoladas Análise dos parasitas no solo: Análise de poeira domiciliar. CRONOGRAMA: Adequado. ORÇAMENTO: Adequado

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto: adequado. TCLEs: adequados. Termo de anuência (aqui referido como "autorização condicionada"): suficiente.

Recomendações:

utilizar nomenclatura conforme norma para o termo de anuência.

Endereço: Rua Teresina, 4950
Bairro: Adrianópolis CEP: 69.057-070
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)3305-5130 Fax: (92)3305-5130 E-mail: cep@ufam.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
DO AMAZONAS - FUA (UFAM)



Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto de relevância científica, e proposta adequadamente apresentada. Recomenda-se aprovação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O presente protocolo recebeu parecer pela pendência quando a análise anterior. A pesquisadora atendeu às solicitações do CEP ajustando o protocolo ao que prevê a Res. CNS 196/96.

MANAUS, 21 de Outubro de 2012

Assinador por:

Pedro Rodolfo Fernandes da Silva
(Coordenador)

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.057-070

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-5130

Fax: (92)3305-5130

E-mail: cep@ufam.edu.br

ANEXO II



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ASPECTOS SOCIOAMBIENTAIS, EPIDEMIOLÓGICOS E AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS CLÍNICAS E AMBIENTAIS NA COMUNIDADE RURAL DO LIMÃO, MUNICÍPIO DE IRANDUBA/ AM - PARTE II

Pesquisador: ANI BEATRIZ JACKISCH MATSUURA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 41067414.6.0000.5020

Instituição Proponente: CENTRO DE PESQUISAS LEONIDAS E MARIA DEANE - FUNDACAO

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.016.748

Data da Relatoria: 08/04/2015

Apresentação do Projeto:

Trata-se da resposta ao Parecer No. 946.044 03/02/2015. O projeto é um estudo epidemiológico, transversal, integrado de avaliação de aspectos sócio ambientais, epidemiológicos e biológicos. O objetivo principal é diagnosticar as condições sanitárias, sociais e ambientais, o perfil socioeconômico e a susceptibilidade dos moradores na comunidade rural do Limão, município de Iranduba/AM, associando-as com a presença de patógenos causadores de doenças, com vistas a contribuir para implantação de medidas de prevenção e controle destes agravos. O projeto pertence à Grande Áreas do Conhecimento (CNPq) Grande Área 2. Ciências Biológicas, Grande Área 4. Ciências da Saúde e Grande Área 6. Ciências Sociais Aplicadas. A pesquisadora responsável é pesquisadora Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura do CPqLMD/Fiocruz-Amazônia.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Estudar aspectos socioambientais da comunidade rural do Limão no município de Iranduba – AM, priorizando as condições sanitárias e a identificação de patógenos dentre a população e no ambiente.

Objetivo Secundário:

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.057-070

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-5130

Fax: (92)3305-5130

E-mail: cep@ufam.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
DO AMAZONAS - FUA (UFAM)



Continuação do Parecer: 1.016.748

- Analisar as condições socioambientais e econômicas, visando identificar fatores que podem estar influenciando no processo saúde-doença da comunidade;
- Conhecer as ações sobre os aspectos relacionados às condições de vida da população e os impactos gerados na saúde;
- Avaliar a qualidade da água consumida pela comunidade com base na quantificação de coliformes totais e termotolerantes (fecais);
- Identificar os principais enteroparasitas na comunidade;
- Estudar a micobiota presente no solo e água com o intuito de avaliar potenciais fontes de infecção de fungos patogênicos;
- Identificar taxonomicamente espécies fúngicas patogênicas dos gêneros *Cryptococcus*, *Aspergillus* e dermatófitos isolados do solo e/ou da água;
- Investigar os agentes bacterianos patogênicos provenientes de fezes diarreicas dos moradores selecionados para o estudo;
- Propor estratégias que visem à melhoria da qualidade de vida da população da área de estudo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo a pesquisadora responsável, nesta versão:

Riscos:

As coletas poderão dar um leve desconforto, sem maiores riscos. Mas se porventura houver, estes serão minimizados pelo pesquisador. Todo o material utilizado na coleta será descartável, esterilizado e seguro, obedecendo às normas de vigilância sanitária. Existe risco referente à perda do anonimato devido à utilização dos dados na entrevista e na ficha epidemiológica e, ainda, risco de constrangimentos/desconfortos no momento da visita à residência, devido ao conteúdo dos questionários e os dados observados pelo pesquisador na casa e na rua (Observação participante). Como forma de minimizar estes riscos e desconfortos, será assegurado que os entrevistadores serão treinados para garantir ao máximo o sigilo dos participantes; o questionário poderá ser respondido fora da casa. Após o término do trabalho de campo e análise dos dados, serão destruídos os questionários, fichas epidemiológicas e gravações com os dados dos moradores obtidos no estudo.

Benefícios:

Este estudo contribuirá para o conhecimento dos principais patógenos causadores de doenças na comunidade e possibilitará determinar ações para a diminuição da prevalência destes.

Endereço: Rua Teresina, 4950
 Bairro: Adrianópolis CEP: 69.057-070
 UF: AM Município: MANAUS
 Telefone: (92)3305-5130 Fax: (92)3305-5130 E-mail: cep@ufam.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
DO AMAZONAS - FUA (UFAM)



Continuação do Parecer: 1.016.748

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A equipe de pesquisa é formada por Antônio Alciney da Silva Baileiro, Josy Caldas da Silva, Katia Maria da Silva Lima, Lisiane Lappe dos Reis, Luciete Almeida Silva, Ormezinda Celeste Cristo Fernandes e Sônia de Oliveira.

Trata-se de um estudo epidemiológico descritivo, transversal baseado em dados primários (entrevistas e diagnósticos de amostras clínicas e ambientais), com a finalidade de conhecer a prevalência de organismos patogênicos dentre a população e as condições socioambientais da comunidade.

Serão obtidas amostras de água, solo e material clínico procedentes da comunidade rural do Limão localizada a 30Km de Manaus, zona rural do município de Iranduba, área metropolitana de Manaus, bem como de seus habitantes. As amostras serão coletadas em duas etapas, uma durante o período da seca e outra no período da vazante, entre janeiro de 2015 a junho de 2017. Serão visitadas 100 casas em cada etapa com previsão de 596 participantes. A amostragem para a seleção de residências, neste estudo, ocorrerá de forma aleatória simples, na qual os participantes serão selecionados por rua, respeitando condições, concernentes a cada protocolo de isolamento dos microrganismos. As pessoas que concordarem assinarão o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Se forem, crianças, as sorteadas essas só serão incluídas mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos pais ou responsáveis. Serão excluídos da pesquisa as pessoas ou as crianças em que os pais ou responsáveis, por quaisquer motivos, não concordarem com a participação. Assim como, aqueles que tiverem ingerido medicação para tratamento da parasitose.

A metodologia adotada no Levantamento socioambiental será a pesquisa-ação: serão utilizadas como técnicas de pesquisa: questionários, entrevistas, grupo focal, mapa falante para identificação de problemas e anseios e a observação participante. Os dados serão analisados a partir de uma abordagem quanti-qualitativa. Serão investigados e analisados dados secundários sobre aspectos econômicos, sociais, ambientais e sobre o perfil de saúde (morbidade e mortalidade). A partir destes dados será feito um diagnóstico situacional da comunidade. O trabalho de campo será precedido de reunião com a comunidade local para apresentação dos objetivos da pesquisa. Nesta fase será realizado o estudo qualitativo com a utilização das técnicas de observação participante, reuniões, grupo focal e entrevistas semi-estruturadas, cujo objetivo será descrever a realidade a partir da fala dos próprios comunitários, aqui denominados sujeitos da pesquisa, privilegiando a "compreensão dos seus significados e explicações" (Trajano et al., 1998). A realização de reuniões comunitárias, aplicação de questionários e entrevistas será documentada com o auxílio de

Endereço: Rua Teresina, 4950
Bairro: Adrianópolis CEP: 69.057-070
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)3305-5130 Fax: (92)3305-5130 E-mail: cep@ufam.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
DO AMAZONAS - FUA (UFAM)



Continuação do Parecer: 1.016.748

gravador e máquina fotográfica, gerando arquivos em formatos digitais.

Quanto ao Levantamento parasitológico, bacteriológico e micológico Incluirá Exame parasitológico, Isolamento bacteriano das fezes diarreicas (fezes serão coletadas dos indivíduos com sintomas de quadro clínico de diarreia no Posto de Saúde da comunidade através do auxílio de profissionais de saúde). A Análise da água consumida pela comunidade Incluirá: Análise bacteriológica (serão coletados 100 ml das amostras de água de consumo de cada domicílio selecionado para pesquisa, de poços comunitários ou individuais e caixas d' água), Quantificação de coliformes totais e termotolerantes (fecais), Análise de fungos e Análise do solo peridomiciliar (com Análise de fungos, Isolamento de dermatófitos, Isolamento de *Aspergillus*, Identificação dos fungos, Tipagem molecular das espécies de fungos isoladas, Conservação das culturas, Análise dos parasitas no solo, Análise de poeira domiciliar).

Além disso, foi declarado que serão utilizadas fontes secundárias de dados (prontuários, dados demográficos, etc).

O Cronograma de Execução foi readequado no protocolo e prevê o Levantamento socioambiental para início em 04/05/2015 e término em 01/12/2015, e as demais etapas junto aos participantes com início em 01/06/2015 e término em 01/06/2016.

O Orçamento Financeiro está detalhado e no valor total de R\$ 199.894,32, contando com o financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM, por meio de projeto aprovado no Edital PROEP/2014, conforme comprovante anexado em 27/12/2014 14:13:11, Decisão No. 154/2014 do Conselho Diretor da FAPEAM.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de Rosto: ADEQUADA. Assinada pela pesquisadora responsável e pelo Diretor Substituto do Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane/Floacruz Amazônia, DR. Felipe Gomes Naveca.

Termo de Anuência: ADEQUADOS. Em arquivo Autorização secretárioelider.pdf, apensado ao protocolo em 27/12/2014 14:06:08, foram apresentados dois documentos: 1) Termo de Anuência do líder comunitário da Comunidade Rural do Limão, Sr. Enio Ferreira da Cunha; 2) Documento com cabeçalho do CPLMD de solicitação de autorização para a realização da pesquisa e solicitação de dados assinado por um membro da equipe de pesquisa, no qual o Secretário Municipal de Saúde de Iranduba, Sr. Antônio Alves de Lima Filho, deu despacho de "autorizo o projeto" com assinatura e carimbo. No arquivo Carta de anuencia secretario de Iranduba.pdf de 26/03/2015 17:15:09 consta a anuência do Secretário Municipal de Saúde, Sr. Josimar Martins Marinho, em papel com timbre da instituição.

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.057-070

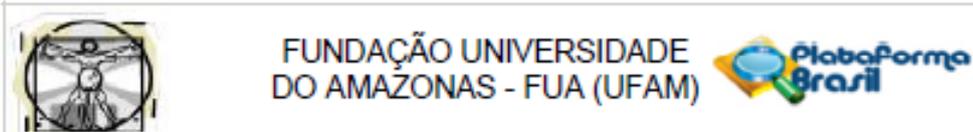
UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-5130

Fax: (92)3305-5130

E-mail: cep@ufam.edu.br



Continuação do Parecer: 1.016.748

Instrumentos de Coleta de Dados: ADEQUADOS. Foi apresentado o Roteiro de grupo focal, Roteiro de entrevista e Instrumento de Coleta de Dados.

TCLE: ADEQUADOS. Foram apresentados o TCLE onde o adulto se manifesta quanto a sua participação, O TCLE para pais/responsáveis e o Termo de Assentimento, todos com as solicitações de correções do parecer anterior.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O presente projeto apresenta relevância social e científica e atende as exigências Resolução 466/2012-CNS.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

MANAUS, 09 de Abril de 2015

Assinado por:
Ellana Maria Peretra da Fonseca
(Coordenador)

Endereço: Rua Teresina, 4950
Bairro: Adrianópolis CEP: 69.057-070
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (92)3305-5130 Fax: (92)3305-5130 E-mail: cep@ufam.edu.br

ANEXO III

Purificação com PEG

1. Transfira o volume da PCR para tubo de 1,5mL e adicione o mesmo volume de PEG a 20%;
2. Agite suavemente em vórtex por 10 segundos e incube a 37°C por 15 minutos;
3. Após incubação centrifugue a 2500 RCF (6000 rpm) por 15 minutos a temperatura ambiente;
4. Descarte o sobrenadante e adicione 125 µL de etanol 80% gelado e em seguida centrifugue a 1450 RCF (4500 rpm) por 2 minutos;
5. Descarte o sobrenadante (Com cuidado, pois o pallet estará na parede do *Eppendorf*) e deixe secando a 37°C por 15 minutos (ou 60°C por 10 minutos) para a remoção de resíduos de etanol (Não desvirar o tubo, mantendo-o virado para baixo);
6. Certifique a ausência de resíduos de etanol e adicione água livre de nuclease, sendo adicionado o mesmo volume de PCR;
7. Agite em vortex por 10 segundos e armazene a amostra a -20°C

ANEXO IV

Purificação da reação de sequenciamento

1. Remova a placa do termociclador e centrifugue por 1 minuto a 2000 RCF;
2. Adicione quantidades iguais de EDTA 125 mM e acetato de sódio 3M (pH 5,2) necessárias para a quantidade de poços utilizados na placa e pipete 2 μ L dessa solução em cada poço;

Obs: tenha certeza que esta solução foi adicionada em todos os poços.

3. Adicionar 25 μ L de EtOH 100% gelado em cada um dos poços;]

Obs: homogeneizar a placa em movimentos de cima para baixo.

4. Sele a placa com Strips e misture por inversão (4X);
5. Incube por 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz;

Obs: Cobrir com papel alumínio.

6. Centrifugue a 2000 RCF por 45 minutos;

Obs: IMPORTANTE o próximo passo deve ser feito imediatamente. Se não for possível, então faça um spin da placa por mais 2 minutos antes de recomeçar.

7. Inverta a placa e faça um Spin até 180 RCF por 1 minuto, removendo em seguida a placa da centrífuga;

Obs: antes de inverter a placa, despreze o conteúdo na pia junto com uma leve batida na mesa. Após essa centrifugação, programa-la para a temperatura de 4°C.

8. Adicione 35 μ L de EtOH a 70°C em cada um dos poços;
9. Centrifugue a 15 minutos à 4°C e 1650 RCF;

Obs: caso tenha esquecido a programação a 4°C, adicione o FAST temperatura;

10. Inverta a placa e faça um spin até 180 RCF por 1 minuto, removendo em seguida a placa da centrífuga

Obs: Comece a contar o tempo assim que o rotor começar a se mover;

11. Incube a placa a 52°C por 15 minutos, cobrir com papel alumínio (Termociclador);
12. Se não for colocar no sequenciador imediatamente, congele a placa seca ao abrigo da luz;
13. No momento de sequenciar ressuspender com 10 µL de formamida Hi-Di levando a placa ao agitador (Vortex) de placa seguido de um Spin;
14. Aqueça a placa 95°C por 1 minuto (no termociclador), monte e coloque no sequenciador.